

## 4.3 GAIA. AKTIBITATEAK

Ingurumen naturalen mikroorganismoen ezaugarriak

- Konposaketa ezezagunaren komunitate mixtoak.
- Dentsitate baxuak (zenbateko zaila).
- Substratuen eskuragarritasun baxua.
- Aktibitate-maila baxuak (honek zailtasunak eragin, zaila kuantifikatzeko).
- Aktiboen portzentai aldakorrak (zaila egiten zaigu aktiboa dena ezagutzea eta kuantifikatzea).

Teknika fisiologikoen ezaugarriak: normalean ur edo orokorrean ingurumen naturaletan erabiltzen diren metodologiak neurtzeko ezaugarri hauek beteko dituzte.

- Oso sentikorrak: aktibitatea baxua delako. Horregatik radioisotopoak eta fluorokromoak erabiltzen dira.
- Inkubazio-denbora motzak eman behar zaie.
- Laginaren gutxiengo manipulazioa.

### AKTIBITATEAK

- **Aktibitatea erreala:** *in situ*-ko baldintzak ez dira saioan zehar aldatzen. Lagina hartu, eta ezer aldatu gabe kuantifikatu (benetako aktibitatea). Hala ere, hau neurtzea zaila izaten da, horregatik askotan potentziala kalkulatu da.
- **Aktibitate potentziala:** aktibitatea neurtzerakoan baldintza bat edo gehiago aldatzen dira: elikagaien kontzentrazioa, inkubazio-tenperatura, populazioen ezabapena, substratu ez-ohikoa, botila efektua...

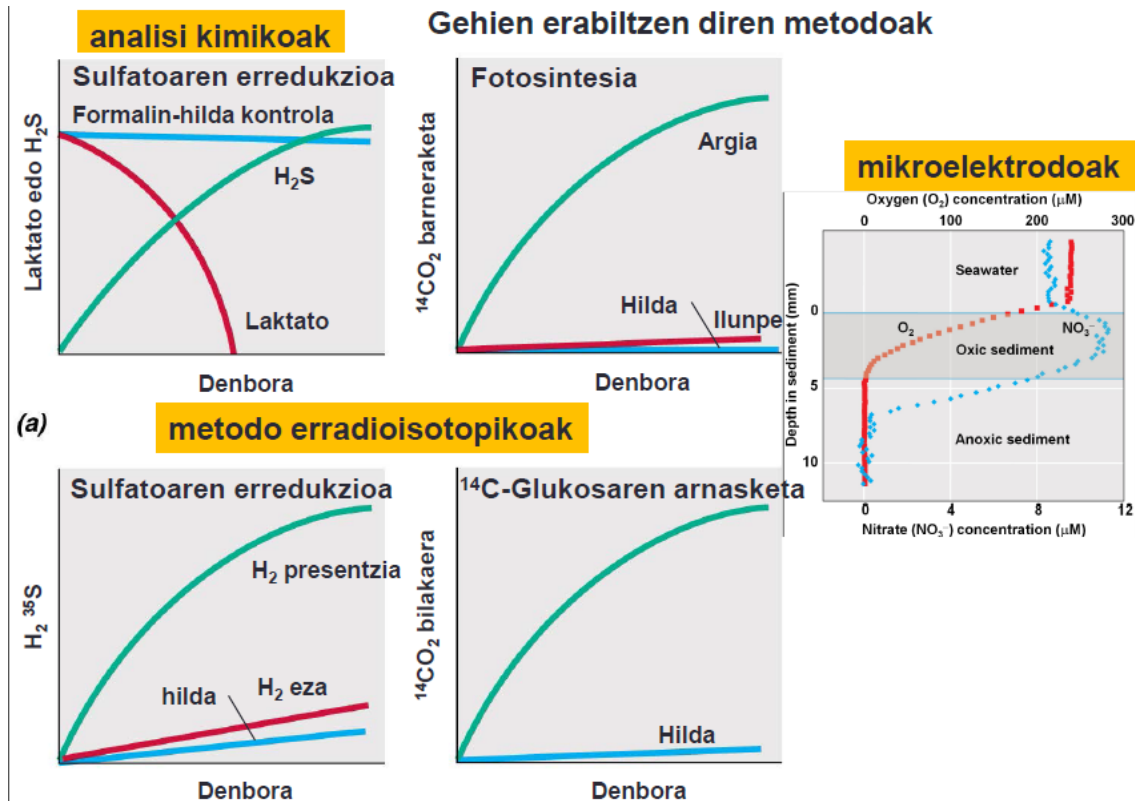
Aktibitatea bi maila ezberdinetan kalkulatu daiteke:

- Populazio-mailan: populazioaren aktibitatea, komunitatea osoak egindakoa (CO<sub>2</sub>-aren ekoizpena).
- Zelula mailan:
  - Aktibitate bat daukaten zelulen zenbakia edo proportzioa (Adb. Arnastu egiten duten zelulen zenbakia edo proportzioa). Ikustea zeintzuk diren aktiboen proportzioa.
  - Zelularen aktibitatea (Adb. Zelula baten arnasketa). Zelula bakoitzak zein aktibitate daukan.

Kuantifikaziorako gehien erabiltzen diren metodoak: analisi kimikoak, metodo erradioisopotopikoak (erradioaktibitatea dute) eta mikroelektrodoak dira.

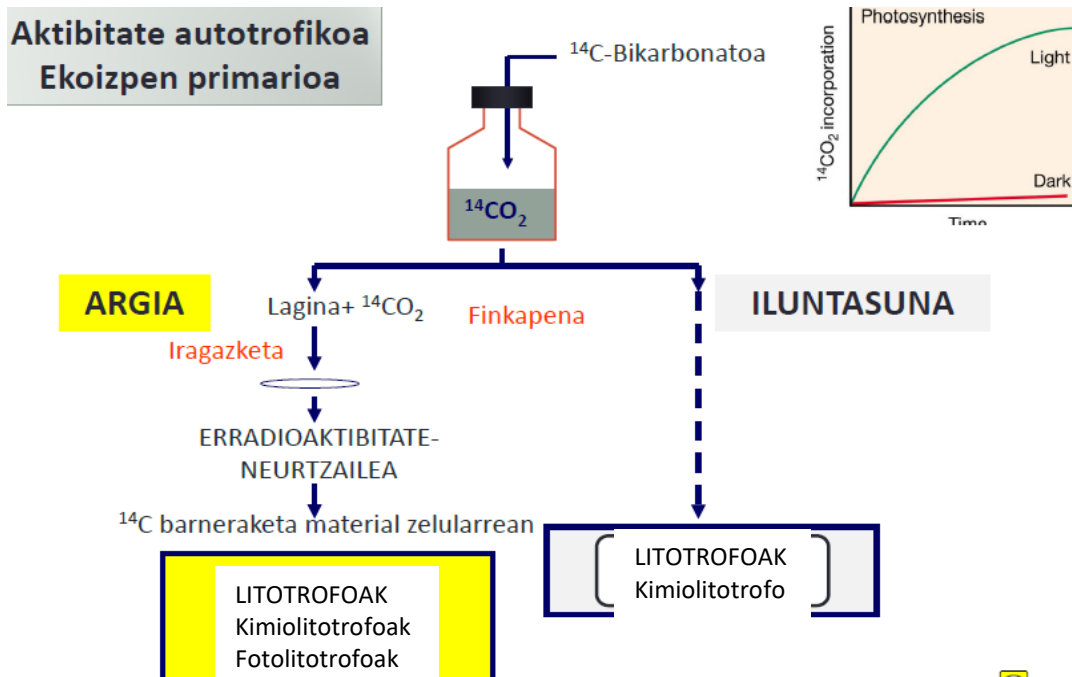
Irudian, analisi kimikoa erabiltzen da, kasu honetan interesatzen zaigu jakitea nola egiten duen sulfatoaren erredukzioa. Posible daukagu kuantifikatzea nola desagertzen den laktikoa (substratua) medioan. Eta sulfatoa erabiltzean, sulhidrikoaren kontzentrazioa beraz, aktibitatea neurtu daiteke.

Metodo erradioisotopoen bidez, adibidez, sufrea erradioaktiboki markatu daiteke eta horrela mikroorganismoak barneratu duen sufrea kantitatea kuantifikatu daiteke.



### Aktibitatea autotrofikoa

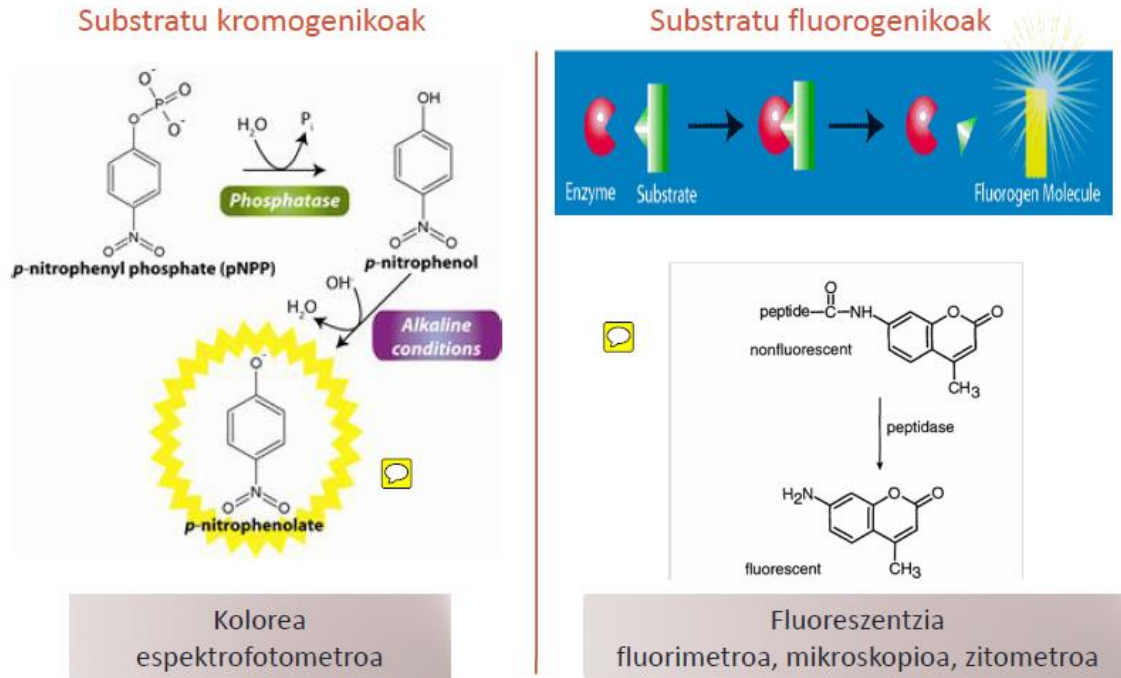
Guk askaturiko  $CO_2$  asko itsasoan geratzen da, beraz hau kuantifikatzeko metodo hau egokia da. Lehenengo lagina hartu eta bikarbonatoarekin markatu egiten da. Ondoren argitan eta ilunpean inkubatu egingo da lagina. Argipean kimiolitotrofoak zein fotolitotrofoak hazi egiten dira. Ilunpean, aldiz, bakarrik kimiolitotrofoak. Kenketa eginda posible da jakitea fotolitotrofoek barneratutako  $CO_2$ a.



### Ahalmen heterotrofikoa

Guk jakin nahi dugunaren arabera behatuko duguna ezberdina izango da. Konposatu organikoen erabilera:

- **Aktibitate entzimatikoa**



Beste batzuk: Substratu erradioaktiboak ...

Espektrofotometroaren bidez kolorea neurtzen da edo lotura bat puskatzean askatzen den fluoreszentzia neurtu daiteke.

- **Deshidrogenasa** aktibitatea

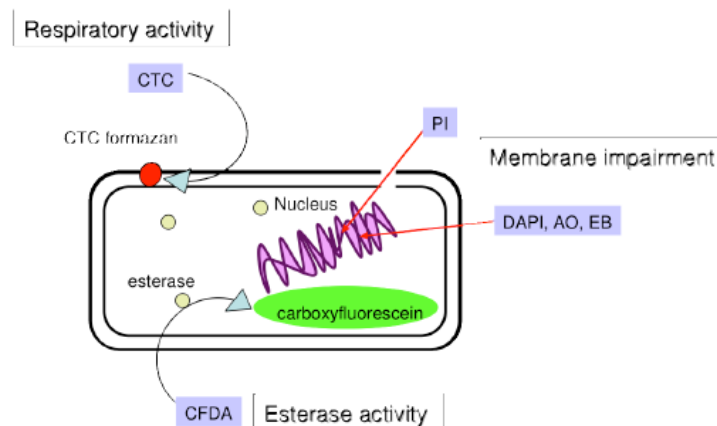
**CTC**

5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride

- **Esterasa** aktibitatea

**karboxifluoreszeina diazetatoa**

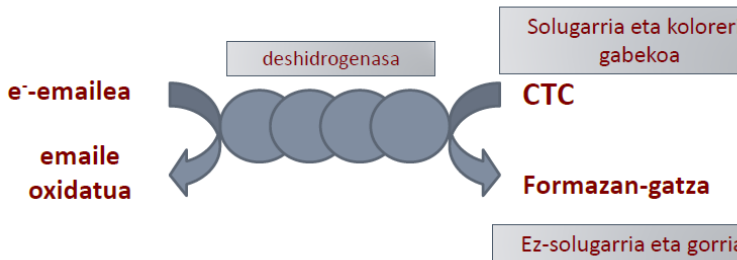
Substratu fluorogeniko lipofilikoak karga ioniko gabe



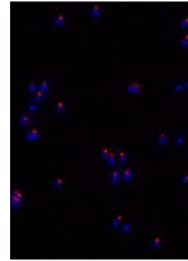
CTC erreduzitu egiten da formazan-gatzean, honek kolorea emango du eta guk hau neurtuko dugu. Horrela abiadura neurtu dezakegu, populazioak daukan DH aktibitatea. Zelula jakin bateko DH aktibitatea bakterio gorriak adierazten dute. Esterasen kasuan berdina gertatzen da, fluoreszeinak kolorea askatuko du.

### Deshidrogenasa aktibitatea

- CTC: 5-ziano-2,3-ditoliltetrazolio kloruroa
- CTF: 3-ziano-1,5-ditolilformazan



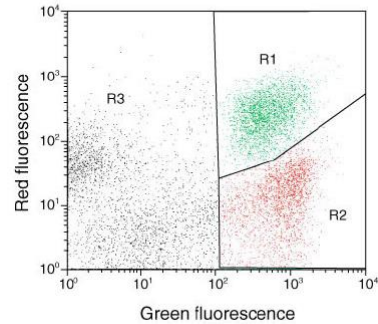
CTC + eplifluoreszentzia-mikroskopia



**EGK aktiboa duten zelulen portzentaia**

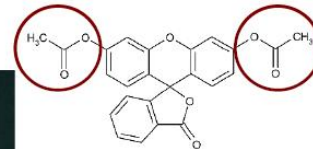
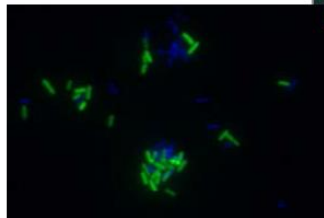
### Deshidrogenasa aktibitatea

BacLight™ RedoxSensor™ CTC Vitality Kit + fluxu-zitometria

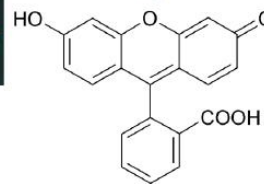


### Esterasa aktibitatea

**Estearasa aktibitatea duten zelulen portzentaia**



fluoreszeina diazetatoa

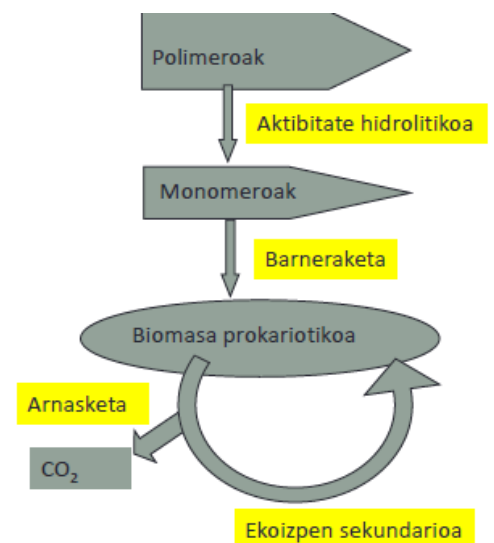


fluoreszeina

- **Aktibitate heterotrofikoa:** mikroelektrodoak, erradioaktiboki markaturiko substratuen barneraketa: asimilazioa/arnasketa, mikroautoradiografia.

Konposatu organiko baten degradazioa aztertuko dugu. Substratu organikoaren degradazioan urrats batzuk eman behar dira.

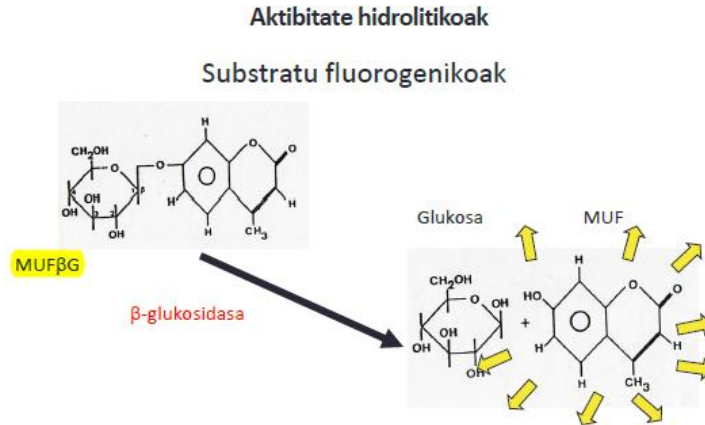
1. Aktibitate hidrolitikoa. Behin substratua txikituta dagoela (monomeroetan)
2. Barneratu → hau kuantifikatu daiteke.
3. Erabilera bi motatakoa:
  - a. biomasa handitu
  - b. ekoizpen sekundarioa
  - c. arnasketa + CO<sub>2</sub>



### Nola kuantifikatu?

- Aktibitate hidrolitikoak

Substratu fluorogenikoak: MUF $\beta$ G, MUF taldea loturik duten substratuak. MUF askatzean fluoreszentzia askatuko du. Ondorioz glukosaren aktibitatea kuantifikatuko dugu.

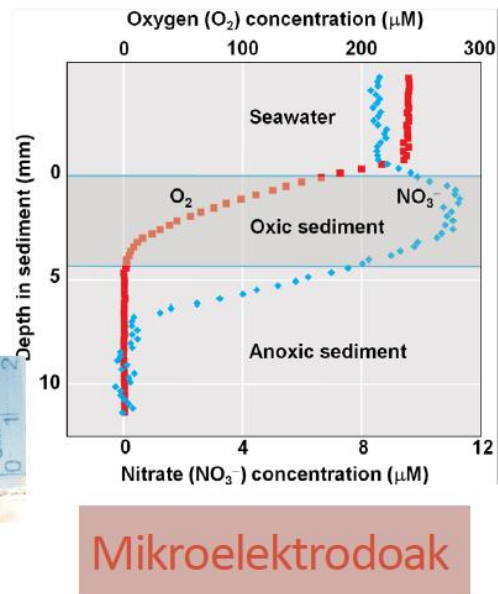
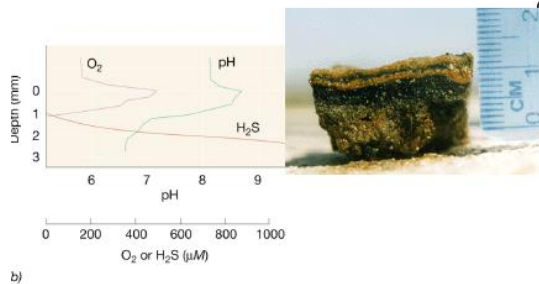


### Aktibitate potentzial heterotrofikoa

- Barneraketa eta degradazioa

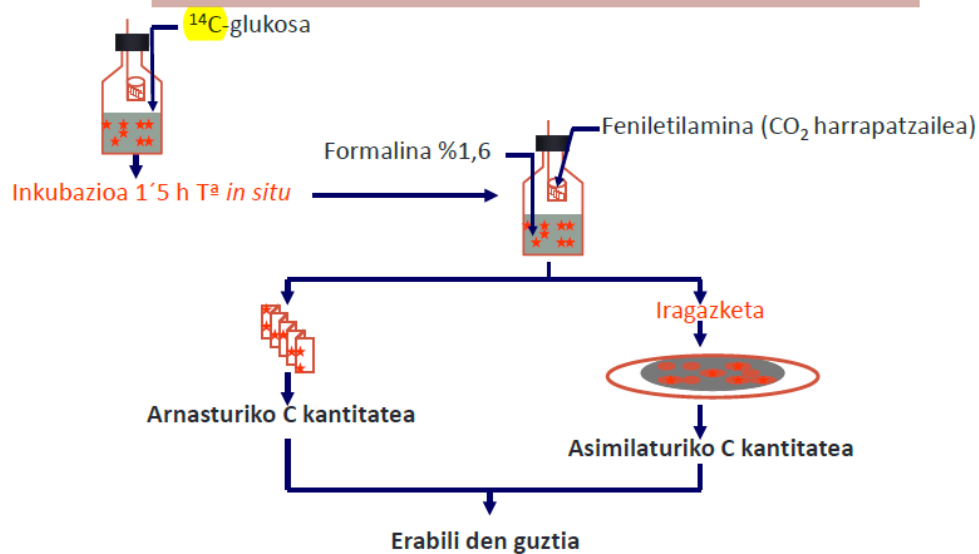
Batzuetan CO<sub>2</sub>aren askapena kuantifikatzeko edo substratu organiko bat erabiltzean O<sub>2</sub> kontsumitzen da, beraz O<sub>2</sub> kontzentrazioaren jaitsiera neurtu daiteke, normalean mikroelektrodoen bidez.

- Elektrodo txikiak detektatzeko O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>S, pH
- Mutur-diametroa: 2-100 $\mu$ m
- Neurriak 50-100 $\mu$ m-eko



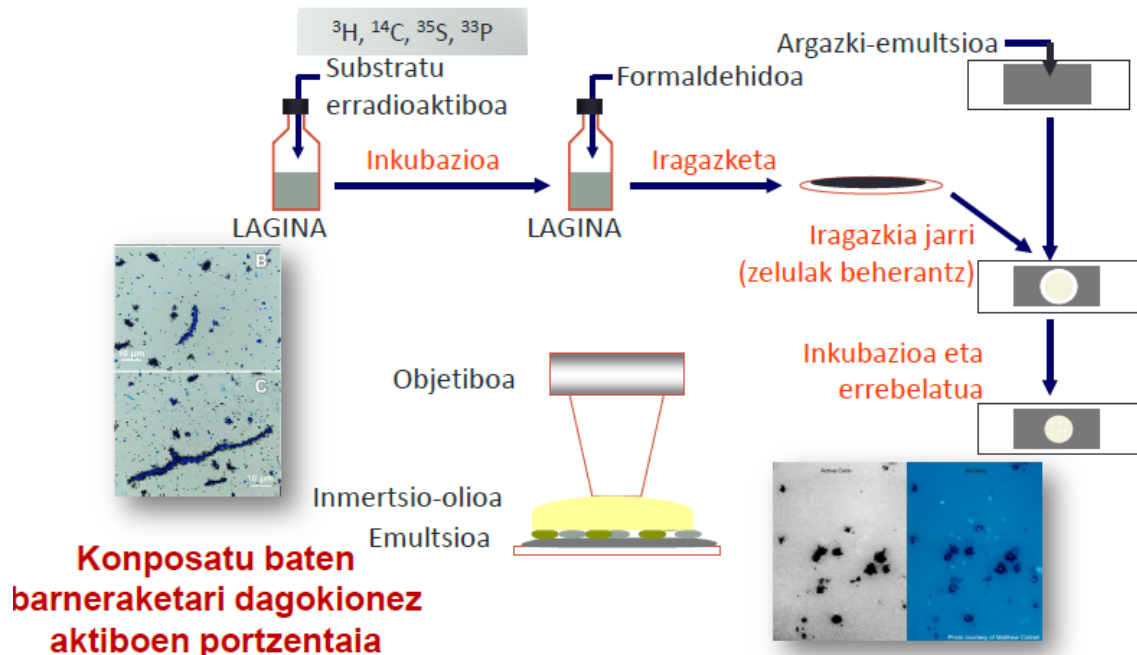
- Erradioaktiboki markaturiko substratuen barneraketa- eta arnasketa-abiaduraren neurria: <sup>14</sup>C-materia organikoa, <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> eta mikroautoradiografia bidez.

Erradioaktiboki markaturiko substratuen barneraketa:  
1. Hartze-abiadura/arnasketa-abiadura



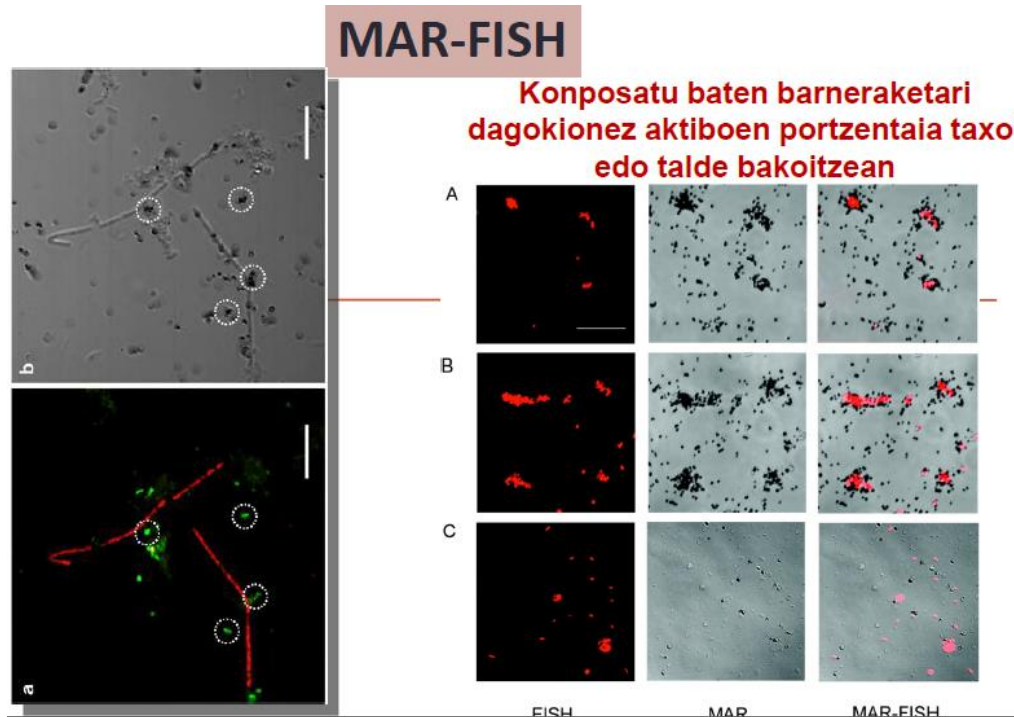
Gehien erabiltzen den erradiaktibitate mota. Glukosa markatu egingo dugu  $^{14}\text{C}$ -rekin eta inkubatu. Garrantzitsua da inkubazioa motza izatea, bestela beste motatako mikroorganismoek erabili dezakete substratu hori, eta guk nahi ez dugun mikroorganismoak hazi daitezke. Formalina: mikroorganismoak fixatzeko erabiliko da. Feniletilamona:  $\text{CO}_2$ a xurgatzen du (kopatxoa). Ondoren likidoa iragaztean, erabilitako glukosa itsatsita gertuko da eta markatua dagoenez kolorea emango du, honek erabilitako C kantitatea adieraziko du. Askaturiko C kantitatea kopatxoan geratu den  $\text{CO}_2$ aren bidez neurtuko da.

Erradioaktiboki markaturiko substratuen barneraketa:  
2. Mikroautoerradiografia (MAR)



Mikroskopia bidez, zelula beltzak ikusten baditugu, substratua erabili duela adieraziko du.

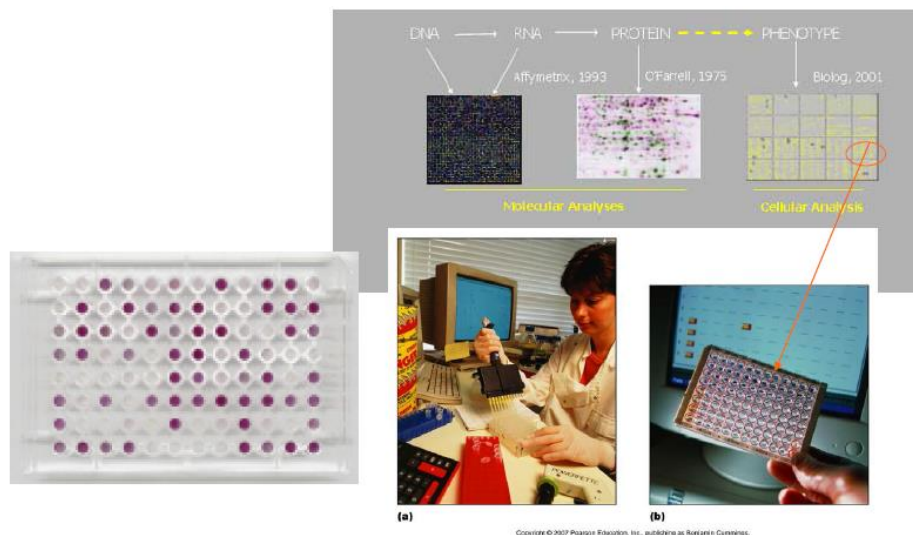




MAR-FISH teknikak, bi teknika barneratzen ditu. Fish teknikan, zunda fluoreszente bat erabiliko da, guk nahi dugun bakterioekin hibridatuko dena (adb.  $\alpha$ -proteobakterioak) eta Mar teknika bidez, substratu markatua erabiltzen duten bakterioak markatuta geratuko dira.

- **Profil metabolikoa. Biolog.**

Substratu ezberdinak daude plakaren putzu bakoitzean, prozesua gertzean, substratua erabiltzen badu kolore ezberdina agertuko da edo substratu ez badu erabiltzen ez da kolorerik ikusiko.



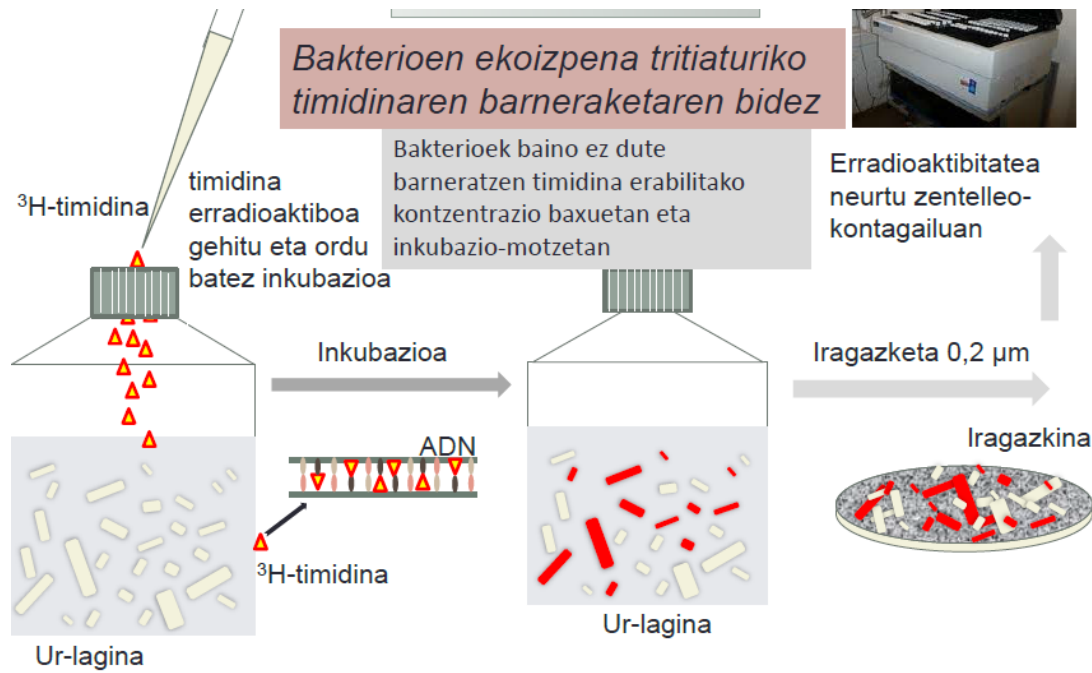
- **Entzima-saioak**

**Hazkuntza/biomasa berriaren sorrera**

Ekoizpen sekundarioa neurtzeko nahiko zaila izaten da, bi teknika ezberdin erabiltzen dira:

**$^3\text{H}$ -timidinaren barneraketa** (azido nukleikoetan): Zatitzen diren zelulek ADN sintetizatzen dute, berez, timidina barneratzen dute. Bakarrik azido nukleikoetan kokatzen da. Bakarrik azido nukleikoetan gertatuko da timidinaren barneraketa inkubazio denbora txikia bada.

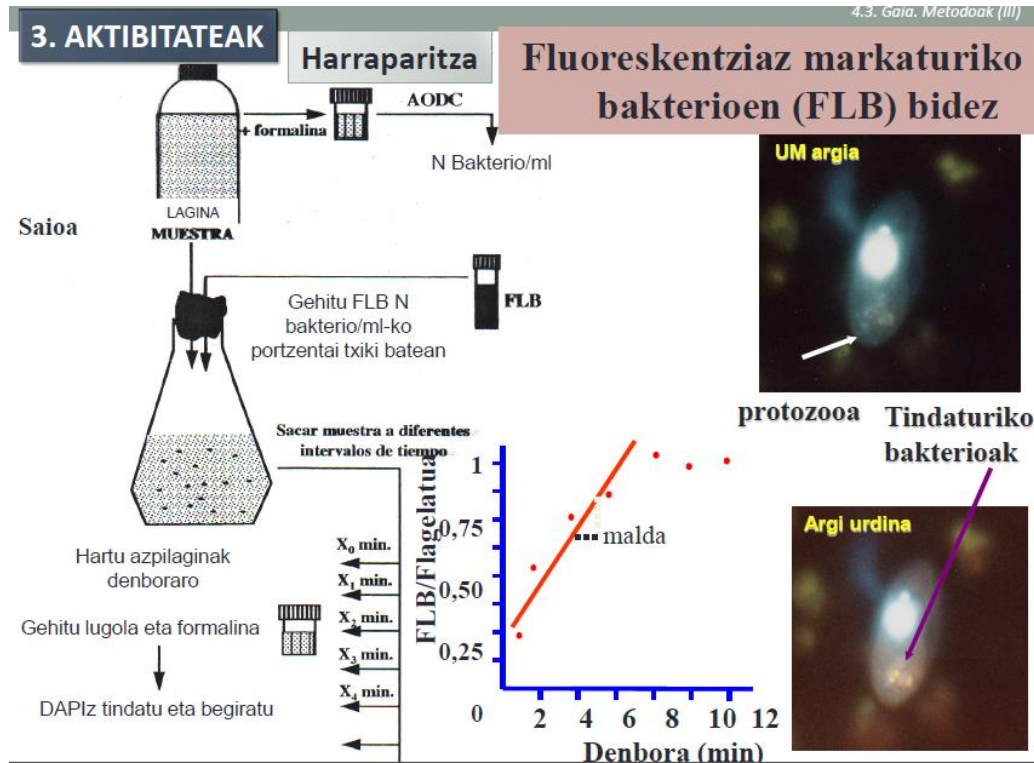
**$^3\text{H}$  ala  $^{14}\text{C}$ -leuzinaren barneraketa** (proteinetan): Hazkuntza azkarreko zelulek proteinak sintetizatzen dituzte, eta berez leuzina barneratzen dute azkarrago hazkuntza moteleko zelulek baino. Bakarrik proteinetan kokatzen da.

**Harrapartza-aktibitatea**

Harraparien presentzia eta eza bakterio-hazkuntzan aldaketa: inhibitzaile metabolikoak

Markaturiko partikulen ingestioa: latexko bolak, kolorez markaturiko bakterioak, erradioaktiboki markaturiko bakterioak eta **fluoreszentziaz markaturiko bakterioak**. Adibidez, legamia markatuko da, hau izango delako mikroorganismoak jango duena. Horrela, mikroorganismoaren barnean zenbat legami dagoen kuantifikatu daiteke. Denbora aurre joan hala, bakterioak legami gehiago jango du eta denbora ezberdinetan neurtuz, malda kalkulatu dugu. Protozoa asetzan, malda maximora iritsiko da.





### Bakterioen hilkortasuna

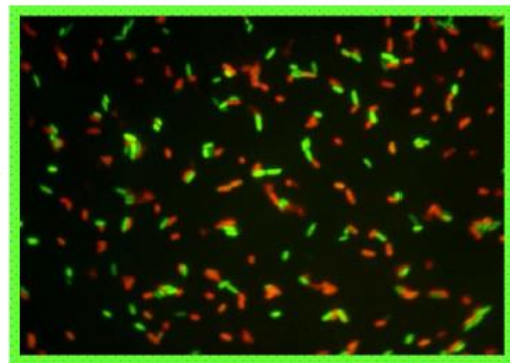
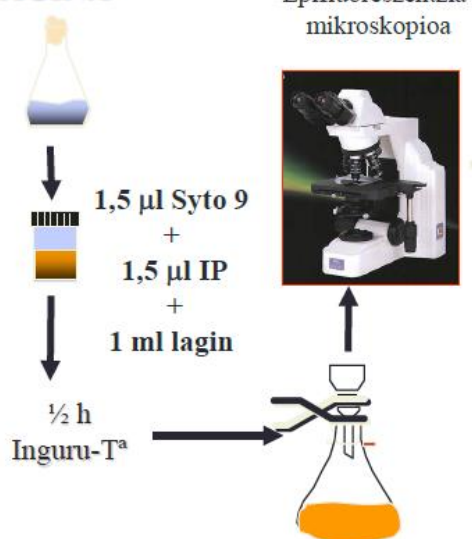
Live/Dead teknika erabiliz, mintza hondatuta duten bakterioak gorritz tindatuko dira eta ondo dauden bakterioak berdez.

### Kit Live/Dead BacLight

- SYTO9 – Zelula guztiak tindatzen ditu berdez
- Propidio Ioduroa – Mintza damututa duten bakterioak baino ez ditu tindatzen gorritz

### Mintz plasmatisikoaren osotasuna

#### LAGINA

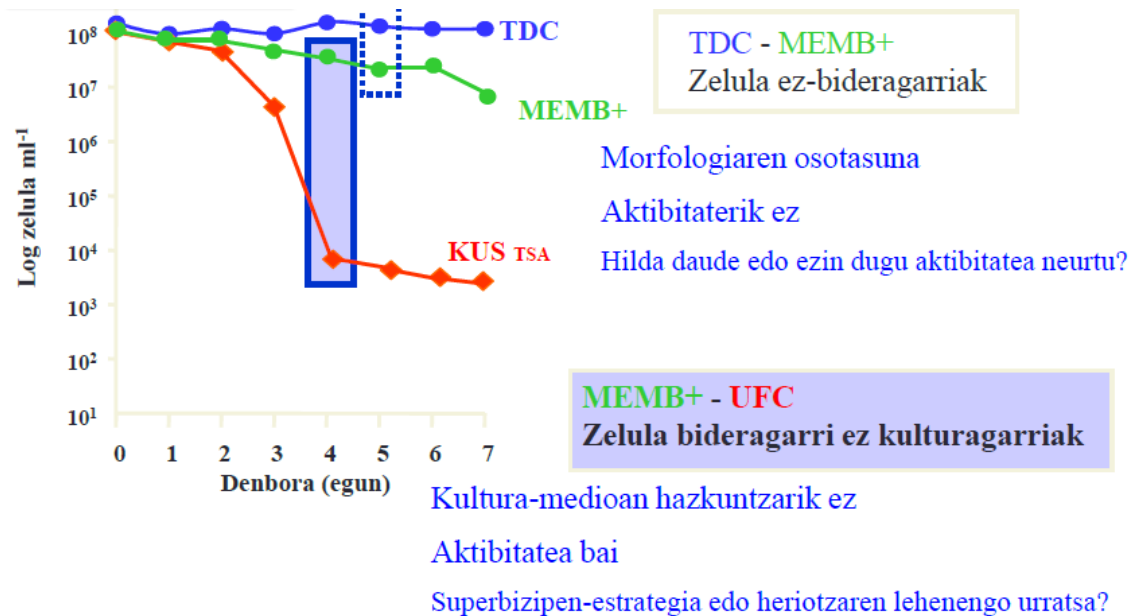


Ondo dauden bakterioak MEMB+  
Mintza damututa duten bakterioak MEMB-  
Bakterio guztiak= Berdeak+ Gorriak

TDC: total direct count: mikro-fluoreszentzia, zelula guztiak zenbatuko dira.

MEMB+: mintza ondo daukaten bakterioak zenbatzen dira.

KUS<sub>TSA</sub>: plaka batean kolonien zenbaketa egitea.

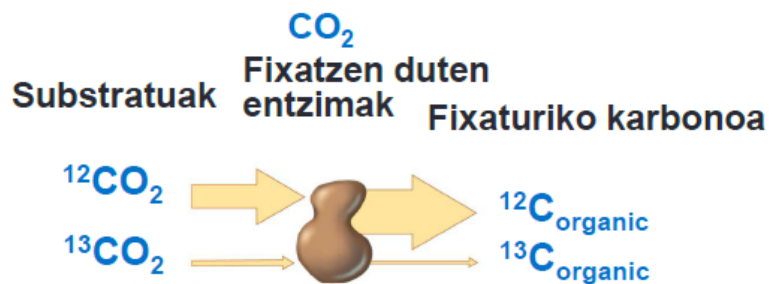


**Heriotza = Zelula-osotasuna galtzea edo genomak kalte atzeraezinak izatea?**

#### Zatikapen isotopikoa/SIP (Stable Isotope Probing)

*Zatikapen isotopikoa:* Gehienetan: karbono eta sufrea erabili, isotopo arinagoa nahiago dute, prozesu biotikoaren adierazlea da eta konposaketa isotopikoak adierazten du bere iragan biologikoa.

<sup>12</sup>C izaki bizidunek dugun isotopoa da, naturan dagoena. Baina posible daukagu <sup>13</sup>C isotopoa erabiltzea. Substratu bat azken honekin markatzen badugu, egiaztatu dezakegu erabilia izan den edo ez.



*Stable Isotope Probing (SIP):* aktibitate metaboliko espezifiko eta anizkoiztasuna lotzea isotopo egonkor baten bidez. <sup>13</sup>C isotopoz markaturiko substratuarekin kultibatu lagina. Ondoren, ultrazentrifugazioz DNA aztertuko da, <sup>12</sup>C eta <sup>13</sup>C isotopoak flotagarritasun ezberdina dutenez, zutabeen leku ezberdinetan geratuko dira. Mikroorganismoak substratua erabili duen edo ez jakingo dugu.

## Stable Isotope Probing (SIP)

aktibitate metaboliko espezifiko eta anizkoiztasuna lotzea isotopo egonkor baten bidez

