



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Alteromonas spp. generoko itsas
andui baten mekanismo molekular
eta zelularrak karbono
polimerikoaren degradazioaren
parte hartzean**

*Uxue Arrizabalaga Luzuriaga,
Carla Pérez Cruz,
Raquel Liébana Garcia,
Eli Bilbao Garcia
eta Laura Alonso Sáez*

279-284 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.35>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



***Alteromonas* spp. generoko itsas andui baten mekanismo molekular eta zelularrak karbono polimerikoaren degradazioaren parte hartzean**

Uxue Arrizabalaga, Carla Pérez-Cruz, Raquel Liébana, Eli Bilbao, Laura Alonso-Sáez

AZTI, Marine Research, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Sukarrieta, Spain.

uarrizabalaga@azti.es

Laburpena

Itsas bakterioek funtsezko zereginak dituzten osagai ugari jariatzen dituzte zelulaz kanpoko ingurunera: exopolisakaridoak, exoentzimak eta mintz-besikulak besteak beste. Osagai horiek parte hartzen dute karbonoaren birmineralizazioan, zelulen arteko komunikazioan eta defentsan. Hala ere, ezezagunak dira oraindik karbonoaren birmineralizazioa gauzatzen duten itsas bakterioen mekanismo zelular eta molekularrak. Artikulu honek *Alteromonadaceae* familiako itsas eredu-bakterio baten hazkuntza eta bere elementuen jariatze-ereduak aztertzea du helburu karbono iturri ezberdinak erabilita.

Hitz-gakoak: exoentzima, exopolisakarido, mintz-besikula, *Alteromonadaceae*, birmineralizazio.

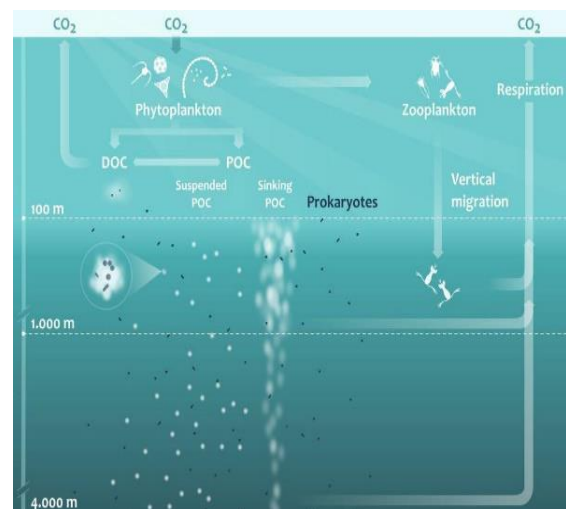
Abstract

Marine bacteria secrete to their extracellular environment a myriad of components which have crucial roles in processes such as carbon remineralization, cell-to-cell communication, and defense. The main elements secreted into the extracellular matrix are exopolysaccharides, exoenzymes, and membrane vesicles, which work together to build a digestive system outside the cell. The molecular and cellular mechanisms of marine bacteria that carry out carbon remineralization are still unknown. This article will focus on characterizing the growth of a marine bacteria from Alteromonadaceae family in different carbon sources and the secretion patterns of the components.

Keywords: Exoenzymes, exopolysaccharides, membrane vesicles, *Alteromonadaceae*, remineralization.

1. Sarrera eta motibazioa

Ozeanoko karbonoaren (C) zikloa funtsezko bi prozesuren menpe dago. Alde batetik, fitoplanktonak atmosferako CO₂-a finkatzen du C organiko bilakatuz. Prozesu horretan fitoplanktonak C organiko kopuru izugarriak sortzen ditu eta itsas ingurunera isurtzen ditu (Basu eta Mackey, 2018). Beste aldetik, C organiko horren birmineralizazio prozesua gauzatzen dute bakterio heterotrofoek (eta arkeoek): C organikoa degradatzen dute eta sortutako CO₂-a atmosferara itzultzen da (Giering et al., 2017; Guidi et al., 2015). C-aren birmineralizazio prozesua oso aktiboa da, eta fitoplanktonak egunero finkaturiko C-aren %99-a atmosferara itzultzeko gaitasuna daukate bakterio heterotrofoek (Buesseler et al., 2007). Hala ere, gainazalean birmineralizatu ez diren C partikulak itsas hondoran hondoratzen dira, C-aren bahitze-mekanismoa deritzona gertatuz. Itsasoko C organikoaren zati handi bat metatu egiten da makroskopiko bilakatu daitezkeen



1. irudia. Ozeanoko karbonoaren zikloaren diagrama. Fitoplanktonaren finkapen prozesua ageri da CO₂-a karbono organiko eta partikulatua bilakatuz. Bestalde C organikoaren birmineralizazio prozesua erakusten du ur zutabeen zehar.

partikula moduan (itsas elurra deritzona), eta bakterioek ingurunera entzima sorta handi bat askatu behar dute makro-partikula horiek degradatu ahal izateko (Guidi et al., 2015; McDonnell et al., 2015).

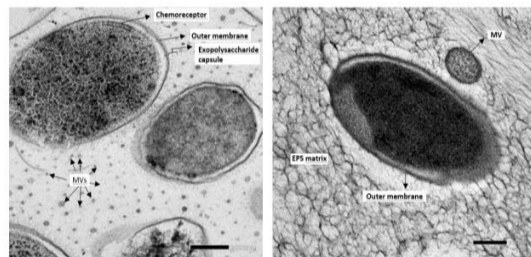
Bakterioek karbono polimerikoa degradatzeko askatzen dituzten entzimen artean, glikosil hidrolasek (GH) garrantzi handia dute, karbohidratoen loturak hidrolizatzen baitituzte, eta itsas karbono partikulen kopuru handiena karbohidratoz osatuta dago (Kharbush et al., 2020; Simon et al., 2002). GHak entzima oso espezifiko gisa ezagutzen dira, eta hainbat ezaugarriren arabera aldatzen dira, hala nola, degradatzen duten azukre motaren arabera, azukrearen loturen arabera edo lotura horien posizio isometrikoaren arabera (Giordano et al., 2006). Hidrolisi entzimen osotasuna eta jarduera bermatzeko, zelulak exopolisakarido (EPS) eta mintz besikulazko (MB) matrize batean kanporatzen ditu entzima horiek. EPSak bakterioen gainazalean dauden karbohidrato-polimeroak dira eta bakterioen zelulaz kanpoko matrizearen egitura-oinarria osatzen dute. Horrez gain, zelulen atxikimendu prozesuan parte hartzen dute, zelulen arteko interakzioa babesten eta errazten dute eta bakterioak jariatzen dituen elementu desberdinak zelularen inguruan ainguratu eta kontzentratzeko aukera ematen dute (Cowen, 1992). Bestalde, MBak mintz batek inguratzen dituen egitura esferikoak dira. Mintz horren bitartez babesturiko zelula-osagai kontzentratuak ingurunera askatzeko aukera ematen dute, hala nola, hidrolisi entzimak, seinale molekularak edo material genetikoak (DNA, RNA...) (Salvachúa et al., 2020; Schweitzer et al., 2001). Aurrez aipaturiko elementu horiek gutzietik elkarrekin lan egiten dute “zelulaz kanpoko digestio-sistema” eraikitzeko eta elikagaien hidrolisia era eraginkorragoan gauzatzeko.

Transmisiozko Mikroskopia Elektronikoa (TEM) erabiliz MareLab-AZTI ikerketa-taldearen aurreko emaitzetan ikusi da partikula kolonizatzaileak diren itsas bakterio ezberdinek zelulaz kanpoko matrize ezberdinak erakusten dituztela exopolisakarido eta mintz besikularen egiturari dagokiola. Beraz, bakterioek egitura konkretu batzuk lehenesten dituzte besteen aurretik zelula kanpoko matrizea jariatzeko, eta hori, C iturri desberdinak degradatzeko gaitasunarekin erlazionatuta egon liteke.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Orain arte, bakterioek gauzatutako itsas karbono iturri ezberdinen birmineralizazioaren ezagutza *in situ* egindako tasa entzimatiarren neurketatan eta entzima hidrolitikoaren analisi molekularretan oinarritu da gehienbat. Hala ere, birmineralizazioa gauzatzeko ematen diren prozesu biologikoak ezezagunak dira.

Lan hau duela gutxi hasitako tesi proiektu baten parte da. Tesi-proiektuaren helburu nagusia partikula kolonizatzaile diren itsas bakterioen matrize degradatzailearen ezaugarriak aztertzea da, baita ezaugarri horien eginkizun funtzionala aztertzea C iturri ezberdinen birmineralizazio prozesuan. Zehazki, zelulaz kanpoko matrizeko elementuen (EPS, MB eta GHak) eginkizuna aztertuko da C polimeriko iturri ezberdinen hidrolisian. Horretarako, birmineralizazio estrategia ezberdinak erabiltzen dituzten eredu bakterioak erabiliko dira. Alde batetik C bulkadak azkar aprobetxatzeko gai diren bakterio jeneralistak (*Alteromonadaceae* familiakoak), eta, bestetik, polimero konplexuen degradazioan espezializaturiko bakterioak (*Planctomycetes* familiakoak).



2. irudia. Transmisiozko Mikroskopia Elektronikoaren bidez *Pseudoalteromonas sp.*-en isolatuen bistaratzea (ezkerreko irudia) eta *Alteromonas sp.* (eskuineko irudia) itsas agarretan hazita. Beren zelulaz kanpoko matrizean desberdintasun nabariak erakusten dituzten (eskala barra 200 nm-koa da) (Argazkia: L. Alonso-Sáez)

Zehazki, tesiaren lehen atal honetan, gure ikerketa-taldeak aurrez isolatutako eredu bakterioetako bat (*Alteromonas* sp.) aztertzea erabaki dugu honako helburu hauekin: batetik, itsasoko karbono polimeriko iturri ezberdinetan hazkuntza karakterizatzea, eta, bestetik, C iturri ezberdinetan matrizera jariatzen dituen egiturak karakterizatzea (GH, EPS eta MBak).

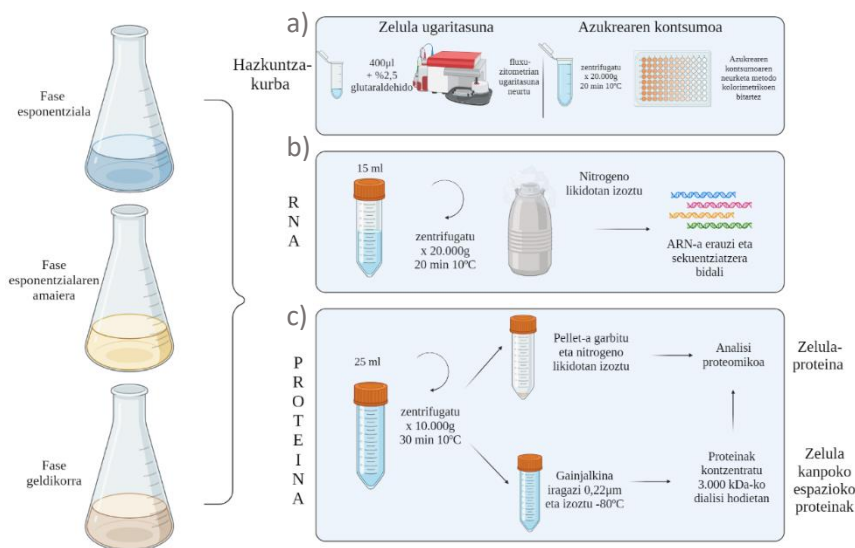
3. Ikerketaren muina

3.1 Materialak eta metodoak

Alteromonas sp. “Tibbles eta Rawling” likido mineralean hazi zen (Tibbles eta Rawlings, 1994), % 0,02 C iturria gehituz eta 20 °C-tan inkubatu zen ilunpetan eta dardarka (85 rpm). Erabilitako C iturriak laminarina eta alginato polisakaridoak izan ziren, baita glukosa monomeroa ere kontrol gisa. Esperimentuek 3 egun iraun zuten, eta laginak 4 orduko maiztasunarekin hartu ziren (hiru erreplika biologiko gauzatu ziren). Bakterioaren hazkuntza fluxu-zitometria bidez aztertu zen eta polisakaridoen kontsumoa neurtzeko metodo kolorimetrikoak erabili ziren (Dubois et al., 1956).

C iturri ezberdinetan hazkuntza karakterizatu ondoren, hiru interes puntu ezarri ziren laginak hartzeko (fase esponentziala, berantiar-esponentziala eta fase geldikorra). Puntu horietan, transkriptomikarako, zelula proteomikarako eta sekretometarako (zelula kanpoko proteinak), eta EPSa aztertzeko laginak hartu ziren. EPSak zentrifugazio bidez lortu ziren eta zelulen garbiketak dializatu eta kontzentratu ziren 10.000 kDa tamainako dialisi-hodiak erabiliz. Lortutako produktua liofilizatu egin zen.

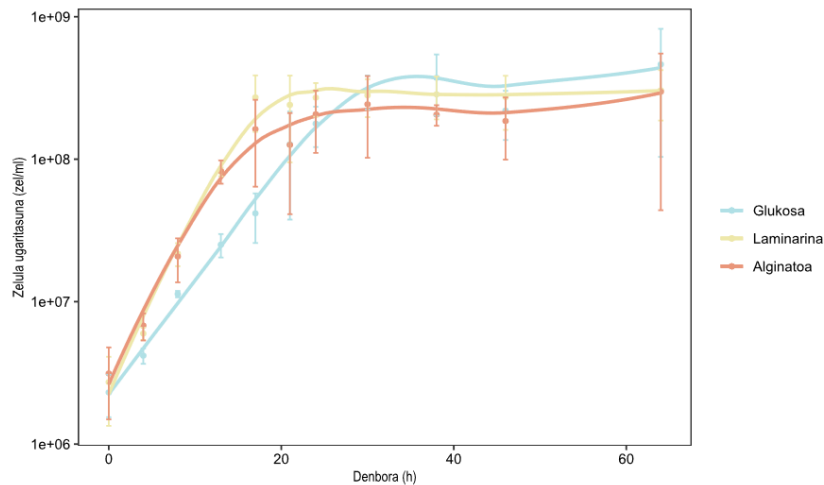
3. irudia. Zelulen transkriptomikarako, proteomikarako eta sekretometarako laginketa-eskema. Ezkerrean, laginketa gauzatu zen *Alteromonas* sp-en kultiboaren hiru faseak. Eskuinaldean lagin-hartze ezberdinen deskribapena ((a) kurbaren jarraipena fluxu-zitometria eta metodo kolorimetrikoen bidez, (b) RNA laginak transkriptomikarako eta (c) Zelula-proteina eta zelulaz kanpoko proteinak (sekretoma) proteomikarako.



3.2. *Alteromonas* sp.-ren hazkuntza- eta kontsumo-kurba C polimeriko iturri ezberdinetan.

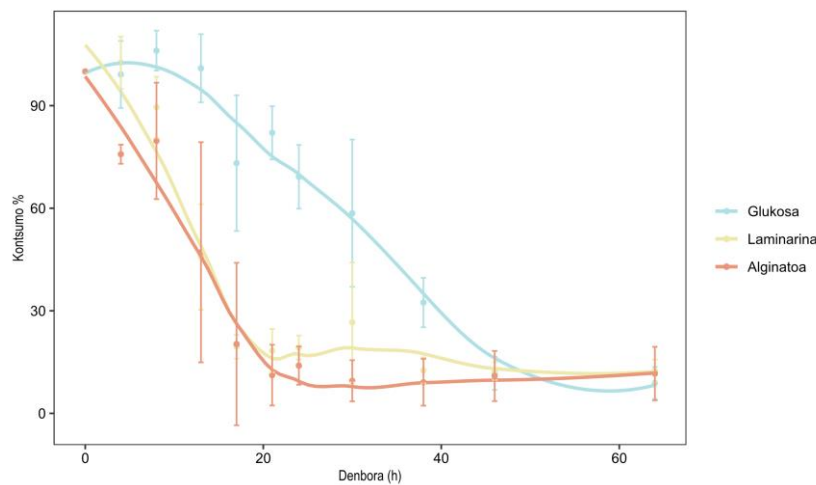
4. irudian C iturriaren arabeko hazkuntza-kurben ezberdintasunak azaltzen dira. Hazkuntza geldoagoa da glukosan, laminarina eta alginatoan baino, nahiz eta kasu guztietan ugartasun antzekoetara iristen den fase geldikorrean. Hazkuntza-tasak antzekoak izan ziren erabilitako polisakaridoentzat (0,27 h⁻¹ eta 0,24 h⁻¹ laminarina eta alginatoan hurrenez hurren), aldiz, glukosarentzat baxuagoa izan zen (0,15 h⁻¹).

4. irudia. *Alteromonas spp*-ren hazkuntza-kurba. *Alteromonas sp*-ren zelula ugartitasuna (zelula kopurua/ml) denboran zehar (h) hiru karbono-iturri ezberdinetan (Glukosa, Laminarina eta Alginatoa) beren desbideratze estandarrekin (n=3).



5. irudiak karbono-iturri ezberdinetan azukre-kontsumoaren diferentziak erakusten ditu. Polisakaridoen kontsumoa (laminarina eta alginatoa) glukosarena baino azkarrago gertatzen dela ikusi dugu, horiek monosakaridoaren aurretik guztiz kontsumitzen direlarik (20 eta 48 ordutan hurrenez hurren).

5. irudia. Azukre-kontsumoaren kurba *Alteromonas sp*. *Alteromonas sp*-ren azukre-kontsumoaren ehunekoa (kontsumo %-a) denboran zehar (h) hiru karbono-iturri ezberdinetan (Glukosa, Laminarina eta Alginatoa) beren desbideratze estandarrekin (n=3).



Alteromonas sp-ren hazkuntza-kurbaren emaitzen arabera, bakterioa gai da polisakarido horiek azkarrago kontsumitzeko monosakaridoa baino. Beraz, *Alteromonas sp*-k polisakaridoen degradaziorako entzima espezifikoko aktibatze gaitasuna duela iradokitzen dute emaitzek.

Emaitza horien arabera, laginketarako hiru puntuak aukeratu ziren RNA, zelula proteinak eta sekretoma, eta EPSak isolatzeko. Fase esponenziala 14 h-tan ezarri zen laminarina eta alginatorentzako, eta 21 h-tan glukosaren kasuan. Fase esponenzial-berantiarra 21 h-tan ezarri zen polisakaridoentzat eta 28 h-tan glukosarentzat. Azkenik, fase geldikorreko puntua 36 h-tan eta 48 h-tan ezarri zen polisakaridoentzat eta glukosarentzat hurrenez hurren.

4. Ondorioak

Alteromonas sp. itsas polisakaridoen degradazioa aztertzeke eredu bakterio ona da. Alde batetik, bakterioa itsas polisakarido konplexuak (laminarina eta alginatoa) karbono iturri gisa erabilia hazteko gai da. Bestalde, hazkuntza-tasa altuagoa du C iturri gisa polisakaridoak erabiltzean, monosakaridoa erabiltzean baino, polisakaridoen hidrolisirako energia gehiago behar duen arren. Horrek iradokitzen du *Alteromonas sp.* C iturri konplexuen degradazioan espezializatuta dagoela.

5. Etorkizunerako planteatzan den norabidea

Aurkeztutako lana *Alteromonas* sp-ek itsas polisakarido ezberdinen degradaziorako erabiltzen dituen mekanismo molekular eta zelularren karakterizaziorako lehen urratsa da. Etorkizunean, karbono-iturri desberdinetan hazten diren bitartean, zelulaz kanpoko matrizearen osagai ezberdinen (GH, MB eta EPSak) adierazpen eta jariatutako aztertuko dira. Horretarako, transkriptomika, proteomika eta jariatutako EPSaren analisiak egingo dira. Azkenik, beste partikula kolonizatzaile eredu bakterio batzuekin lanean jarraituko dugu, puntu hauek lantzeko:

1. Itsas bakterio orokor eta espezializatuen genometan EPSen sintesian eta polimeroen hidrolisian (GH) parte hartzen duten gene-multzoen analisi konparatiboa gauzatu.

2. EPS, MB eta GHen jariatutako karakterizazioa gauzatu eredu bakterio orokor eta espezializatuetan, polisakarido ezberdinetan hazten diren bitartean.

3. Hiru egitura-osagaien (EPS, GH eta MB) elkarrekintza ikusi mikroskopio-teknika desberdinak erabiliz, matrizearen eraikuntzan desberdintasun espazialak zehazteko, karbono polimerikoaren iturri ezberdinei erantzunez.

6. Erreferentziak

- Basu, S., eta Mackey, K. R. M. (2018). Phytoplankton as key mediators of the biological carbon pump: Their responses to a changing climate. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 10, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/su10030869>
- Buesseler, K. O., Lamborg, C. H., Boyd, P. W., Lam, P. J., Trull, T. W., Bidigare, R. R., Bishop, J. K. B., Casciotti, K. L., Dehairs, F., Elskens, M., Honda, M., Karl, D. M., Siegel, D. A., Silver, M. W., Steinberg, D. K., Valdes, J., Mooy, B. Van, eta Wilson, S. (2007). *Revisiting Carbon Flux Through the Ocean's Twilight Zone*. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2006.1010.1007>
- Cowen, J. P. (1992). Marine implications for marine aggregates. *Marine Biology*, 95, 85–95.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., eta Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Giering, S. L. C., Sanders, R., Martin, A. P., Henson, S. A., Riley, J. S., Marsay, C. M., eta Johns, D. G. (2017). Particle flux in the oceans: Challenging the steady state assumption. *Global Biogeochemical Cycles*, 31(1), 159–171. <https://doi.org/10.1002/2016GB005424>
- Giordano, A., Andreotti, G., Tramice, A., eta Trincone, A. (2006). Marine glycosyl hydrolases in the hydrolysis and synthesis of oligosaccharides. *Biotechnology Journal*, 1(5), 511–530. <https://doi.org/10.1002/biot.200500036>
- Guidi, L., Legendre, L., Reygondeau, G., Uitz, J., Stemmann, L., eta Henson, S. A. (2015). A new look at ocean carbon remineralization for estimating deepwater sequestration. *Global Biogeochemical Cycles*, 29(7), 1044–1059. <https://doi.org/10.1002/2014GB005063>
- Kharbush, J. J., Close, H. G., Van Mooy, B. A. S., Arnosti, C., Smittenberg, R. H., Le Moigne, F. A. C., Mollenhauer, G., Scholz-Böttcher, B., Obrecht, I., Koch, B. P., Becker, K. W., Iversen, M. H., eta Mohr, W. (2020). Particulate Organic Carbon Deconstructed: Molecular and Chemical Composition of Particulate Organic Carbon in the Ocean. In *Frontiers in Marine Science* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00518>
- McDonnell, A. M. P., Lam, P. J., Lamborg, C. H., Buesseler, K. O., Sanders, R., Riley, J. S., Marsay, C., Smith, H. E. K., Sargent, E. C., Lampitt, R. S., eta Bishop, J. K. B. (2015). The oceanographic toolbox for the collection of sinking and suspended marine particles. *Progress in Oceanography*, 133, 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2015.01.007>
- Salvachúa, D., Werner, A. Z., Pardo, I., Michalska, M., Black, B. A., Donohoe, B. S., Haugen, S. J., Katahira, R., Notonier, S., Ramirez, K. J., Amore, A., Purvine, S. O., Zink, E. M., Abraham, P. E., Giannone, R. J., Poudel, S., Laible, P. D., Hettich, R. L., eta Beckham, G. T. (2020). Outer

membrane vesicles catabolize lignin-derived aromatic compounds in *Pseudomonas putida* KT2440. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(17), 9302–9310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921073117>

Schweitzer, B., Huber, I., Amann, R., Ludwig, W., eta Simon, M. (2001). α - and β -proteobacteria control the consumption and release of amino acids on lake snow aggregates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 632–645. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.632-645.2001>

Simon, M., Grossart, H.-P., Schweitzer, B., eta Ploug, H. (2002). Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. In *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY Aquat Microb Ecol* (Vol. 28). www.int-res.com

Tibbles, B. J., eta Rawlings, D. J. (1994). Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria from a Temperate Saltmarsh Lagoon, Including Isolates That Produce Ethane from Acetylene. *Microbial Ecology*, 65–80.

7. Eskerrak eta aipamenak

Alde batetik, eskerrak eman MareLab-AZTI ikerketa taldeari, lanaren parte izateagatik eta lan hau garatzeko beharrezko ezagutza eskuragarri uzteagatik. Bestetik, eskerrak eman Eusko Jaurlaritzari tesia gauzatzeko aukera emateagatik.