



EXPEDICIÓN DE CIRCUNNAVEGACIÓN MALASPINA 2010: CAMBIO GLOBAL Y EXPLORACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD DEL OCÉANO GLOBAL

LIBRO BLANCO DE MÉTODOS Y TÉCNICAS
DE TRABAJO OCEANOGRÁFICO







EQUIPO DE TRABAJO

Carlos M. Duarte – Pedro Joaquín Vélez – Eugenio Fraile
Marta Álvarez – Jordi Dachs – Nuria Navarro – José María Blanco
Jesús María Arrieta – Josep M. Gasol – José Ignacio González Gordillo

**EXPEDICIÓN DE CIRCUNNAVEGACIÓN
MALASPINA 2010: CAMBIO GLOBAL
Y EXPLORACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD
DEL OCÉANO GLOBAL**

**LIBRO BLANCO DE MÉTODOS Y TÉCNICAS
DE TRABAJO OCEANOGRÁFICO**

EDITOR

ENRIQUE MORENO-OSTOS



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE DEFENSA

MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CSIC



ARMADA
ESPAÑOLA



Fundación **BBVA**



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
MADRID, 2012**





Actividad enzimática de los procariotas planctónicos

Ayo, B.; Abad, N.; Baña, Z.; Azua, I.; Unanue, M.; Iriberry, J.

Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco

Finalidad. Campo de aplicación

Metodología para determinar el nivel y características de la actividad enzimática de los procariotas heterótrofos planctónicos. Se describe la técnica basada en la hidrólisis enzimática de sustratos fluorogénicos modelo (Hoppe, 1983). Estos sustratos consisten en una molécula fluorescente artificial (fluorocromo) unida a otro compuesto (por ejemplo, glucosa, fosfato, amino ácido, etc.) mediante un enlace específico (enlace éster, enlace peptídico, etc.). Estas moléculas son hidrolizadas por los enzimas de modo similar a los sustratos naturales oligoméricos o poliméricos, y cuando esto ocurre, el fluorocromo liberado genera fluorescencia. La cantidad de fluorescencia liberada (incremento de fluorescencia), determinada mediante fluorimetría, indica el nivel de actividad enzimática en la muestra de agua.

Las características generales de la técnica propuesta son las siguientes:

- Los sustratos fluorogénicos modelo no son tóxicos para la comunidad procariota natural.
- Los sustratos fluorogénicos modelo son artificiales: diferentes en tamaño, estructura y complejidad espacial a los sustratos naturales. Además, son hidrolizados principalmente por los exoenzimas, en tanto que los compuestos naturales son atacados tanto por exoenzimas como por endoenzimas. Debemos por tanto asumir, al utilizar esta técnica, que las velocidades de hidrólisis de estos sustratos son asimilables a las velocidades de hidrólisis de los sustratos naturales.
- Las concentraciones in situ de los sustratos naturales son habitualmente desconocidas, pero como estos sustratos son competitivos





frente a los sustratos naturales, los estudios se realizan habitualmente bajo concentraciones saturantes, de modo que los resultados obtenidos representan velocidades potenciales de hidrólisis.

- La utilización de concentraciones diferentes de sustrato permite determinar características cinéticas de los enzimas estudiados, representadas por los parámetros cinéticos K_m y V_{max} .
- La técnica implica la utilización de períodos de incubación variables, a fin de obtener incrementos significativos en el nivel de fluorescencia de la muestra.

Conceptos generales

Una gran parte de la materia orgánica disuelta del océano está compuesta por moléculas poliméricas tales como proteínas, hidratos de carbono, grasas, etc. (Benner et ál. 1992; Chrost, 1993), y los procariotas heterótrofos son los principales responsables de su degradación (Hoppe et ál. 1993). Los procariotas heterótrofos no pueden consumir estos materiales directamente porque les resultan demasiado grandes, pero en cambio sí pueden romper estas macromoléculas mediante enzimas y consumir las pequeñas moléculas resultantes, tales como aminoácidos, pequeños azúcares, etc. Esta rotura debe ser realizada fuera de las células, y para ello, los procariotas son capaces de sintetizar y expulsar del citoplasma celular dos tipos de enzimas hidrolíticas. Los enzimas que se quedan en el periplasma o adheridos a las envolturas celulares se denominan ectoenzimas, mientras que los que son liberados al exterior se denominan enzimas extracelulares. Una vez rotas las macromoléculas mediante la actividad ectoenzimática y/o extracelular, los procariotas consumen las pequeñas moléculas liberadas, crecen y se reproducen. Esta hidrólisis enzimática es un proceso clave porque los procariotas heterótrofos son los principales organismos no autótrofos del océano capaces de transformar materia orgánica en forma disuelta en materia orgánica en forma particulada, es decir, en nuevos procariotas. Una vez formados los procariotas, estos podrán ser consumidos por otros organismos cada vez más grandes, flagelados, ciliados, zooplancton, peces y mamíferos, a lo largo de la cadena trófica del océano.

En este proyecto vamos a medir cuatro actividades enzimáticas (ectoenzimas y enzimas extracelulares):

- la actividad aminopeptidasa, que nos indicará cómo rompen estos procariotas las proteínas. La actividad aminopeptidasa se analizará con el análogo L-Leucina-7-amino-4-metil-cumarina (MCA-L). Este análogo es hidrolizado por varios enzimas, no solo por las leucina-aminopeptidasas. Se puede considerar como un sustrato modelo para la hidrólisis de una gran variedad de péptidos (Flint y Hopton, 1977).
- la actividad fosfatasa alcalina, capaz de hidrolizar ésteres orgánicos de fósforo. La actividad de estos enzimas se analizará con el análogo





fosfato de 4-metil-umbeliferona (MUF-P), que presenta velocidades de hidrólisis similares a los sustratos naturales (Berman, 1988; Hoppe, 1993).

- la actividad β -glucosidasa, que rompe carbohidratos con enlaces tipo β entre los azúcares, como por ejemplo la celulosa. La actividad de estos enzimas se analizará con el análogo 4-metil-umbeliferil $-\beta$ -D-glucósido (MUF-G).
- la quitinasa, que hidroliza los enlaces de la quitina, un polisacárido estructural producido por muchos organismos marinos. La actividad de estos enzimas se analizará con un análogo fluorogénico de la quitina, el 4-metil-umbeliferil -N-acetil- β -D-glucosamina (MUF-C).

Esta información permitirá conocer la importancia de los procariontes en el flujo de materia y energía en el Océano Global y, principalmente, en el océano profundo.

Equipamiento necesario

- Lector de microplacas equipado con sonda superior de lectura de fluorescencia, equipado al menos con una fuente de luz de excitación de 350 nm de longitud de onda y capaz de medir fluorescencia a 445 nm de longitud de onda. El lector debería ser capaz de leer microplacas estándar de 96 pocillos, con un volumen de muestra de 250 μ l por pocillo.
- Si el lector no dispone de agitador interno de placas, un vórtex con plataforma adaptado para mezclar placas estándar de 96 pocillos.
- Congelador a -20 °C. Almacenamiento de sustratos fluorogénicos.
- Frigorífico a 4 °C. Almacenamiento de sustratos fluorogénicos.
- Incubadores a varias temperaturas. Incubación de las muestras de agua a temperatura in situ.
- Vórtex. Homogeneización de soluciones.

Reactivos u otro material fungible

1. Material fungible
 - Botellas de muestreo de policarbonato de 500 ml de capacidad, con tapón.
 - Contenedores de policarbonato de 125 ml de capacidad, con tapa.
 - Reservorios para pipeteado multicanal, con tapa.
 - Microplacas de 96 pocillos negras con tapa, estériles.
 - Pipeta automática multicanal de 12 canales de 20-300 μ l.
 - Pipeta automática multicanal de 12 canales de 5-20 μ l.





- Pipetas automáticas en el rango 10-5000 μ l.
 - Puntas de pipeta estériles.
 - Jeringas estériles de 20 ml.
 - Filtros de jeringa de baja adsorción proteica, de 0.1 μ m de tamaño de poro, estériles.
 - Crioviales de 2 y 5 ml de capacidad, de rosca externa, estériles.
 - Gradillas para crioviales.
 - Cajas de congelación para crioviales.
 - Guantes sin polvo.
2. Reactivos
- Agua ultrapura (Milli-Q o similar).
 - L-Leucina-7-amino-4-metil-cumarina (MCA-L).
 - fosfato de 4-metil-umbeliferona (MUF-P).
 - 4-metil-umbeliferil- β -D-glucosido (MUF-G).
 - 4-metil-umbeliferil-N-acetil- β -D-glucosamina (MUF-C).
 - 7-amino-4-metil cumarina (MCA).
 - 4-metil-umbeliferona (MUF).
 - Metanol absoluto.
 - HCl 35%.
3. Preparación de soluciones Standing Stock (SS) de los sustratos y de los productos:
- Solución MCA-L SS: Solución 50 mM de MCA-Leu en Metanol 40%.
 - Preparación: disolver la cantidad correspondiente del sustrato en metanol 40%. Agitar hasta su completa disolución. Alicuotar en crioviales y congelar a -20 °C hasta su uso.
 - Solución MUF-P SS: Solución 10 mM de MUF-P en Metanol 40%.
 - Preparación: disolver la cantidad correspondiente del sustrato en metanol 40%. Agitar hasta su completa disolución. Alicuotar en crioviales y congelar a -20 °C hasta su uso.
 - Solución MUF-G SS: Solución 10 mM de MUF-G en Metanol 40%.
 - Preparación: disolver la cantidad correspondiente del sustrato en el volumen de agua ultrapura correspondiente. Agitar hasta su completa disolución. Añadir la cantidad de metanol absoluto necesaria. Alicuotar en crioviales y congelar a -20 °C hasta su uso.
 - Solución MUF-C SS: Solución 10 mM de MUF-C en Metanol 40%.
 - Preparación: disolver la cantidad correspondiente del sustrato en metanol 40%. Agitar hasta su completa disolución. Alicuotar en crioviales y congelar a -20 °C hasta su uso.



- Solución MCA SSx1000: Solución 4.8 mM de MCA en Metanol 40%.
 - Preparación: disolver la cantidad correspondiente del producto en el volumen de metanol absoluto correspondiente. Agitar hasta su completa disolución. Añadir la cantidad de agua ultrapura necesaria. Alicuotar en crioviales y congelar a -20 °C hasta su uso.
 - Solución MUF-P SSx1000: Solución 2.4 mM de MUF en Metanol 40%.
 - Preparación: disolver la cantidad correspondiente del producto en el volumen de metanol absoluto correspondiente. Agitar hasta su completa disolución. Añadir la cantidad de agua ultrapura necesaria. Alicuotar en crioviales y congelar a -20 °C hasta su uso.
4. Preparación de soluciones de trabajo “Working solutions” (WS) de los sustratos y de los productos:
- Las soluciones de trabajo (WS) se preparan diluyendo las soluciones “Standing Stock” con agua ultrapura hasta conseguir una concentración tal que al añadir 10 µl de la WS a un volumen de 240 µl de muestra, se alcanza la concentración deseada en ésta última.
 - La concentración en muestra de los sustratos varía en función del análisis a realizar:
 - actividad potencial, en la que se utilizan concentraciones saturantes: 250-1000 µM para la actividad aminopeptidasa, y 98-250 µM para las actividades fosfatasa alcalina, β-glucosidasa y quitinasa.
 - estudio cinético, en el que se utiliza un rango de 10 concentraciones en los intervalos de 1.9-1500 µM para la actividad aminopeptidasa, y 0.7-400 µM para las actividades fosfatasa alcalina, β-glucosidasa y quitinasa.
 - La concentración en muestra de los productos fue de 0-96 µM en el caso de la MCA y de 0-48 µM en el caso del MUF.

Calibración

Para cada muestra de agua analizada, se calibrará la relación entre las unidades de fluorescencia y la concentración de los dos productos que pueden ser generados, en función del sustrato utilizado. Estos dos productos son MCA y MUF.

Cada calibración generada se aplicará a los resultados específicos de esa muestra.



Las concentraciones de los dos productos que se utilizarán para las calibraciones son:

- MCA: 96 nM, 24 nM, 6 nM y 0 nM.
- MUF: 48 nM, 12 nM, 3 nM y 0 nM.

Descripción de la técnica

Muestreo

Las muestras de agua se recogerán de las botellas Niskin en botellas de policarbonato lavadas con ácido (HCl 3.5% 24 horas, aclaradas 3 veces con agua destilada y dos veces con agua ultrapura), de 500 ml de capacidad. Las botellas estarán previamente identificadas como “TOTAL SAMPLE”, con el número de estación y profundidad.

Un volumen adecuado de la muestra será filtrado a través de 0.1 μm , a fin de eliminar todo el material particulado de la misma. El filtrado se recogerá en una botella identificada como “FILTERED SAMPLE”, con el número de estación y profundidad.

Preparación de sustratos y productos

Las soluciones Standing Stock (SS) de los sustratos y productos deben ser descongeladas a temperatura ambiente. A partir de estas soluciones SS, se obtendrán volúmenes adecuados de las soluciones de trabajo (WS) mediante dilución en agua ultrapura. Las soluciones de trabajo se distribuirán en pocillos de una microplaca denominada “master plate”, que será mantenida a 4 °C hasta su uso.

Mezcla de soluciones de trabajo con la muestra

El análisis de la actividad enzimática de una muestra de agua se realizará en una o más microplacas, que serán denominadas teniendo en cuenta el número de estación, la profundidad, el tipo de estudio a realizar, la presencia de muestra Total y/o Filtrada, el tipo de actividad analizado y, por último, la temperatura a la que debe ser incubada la placa.

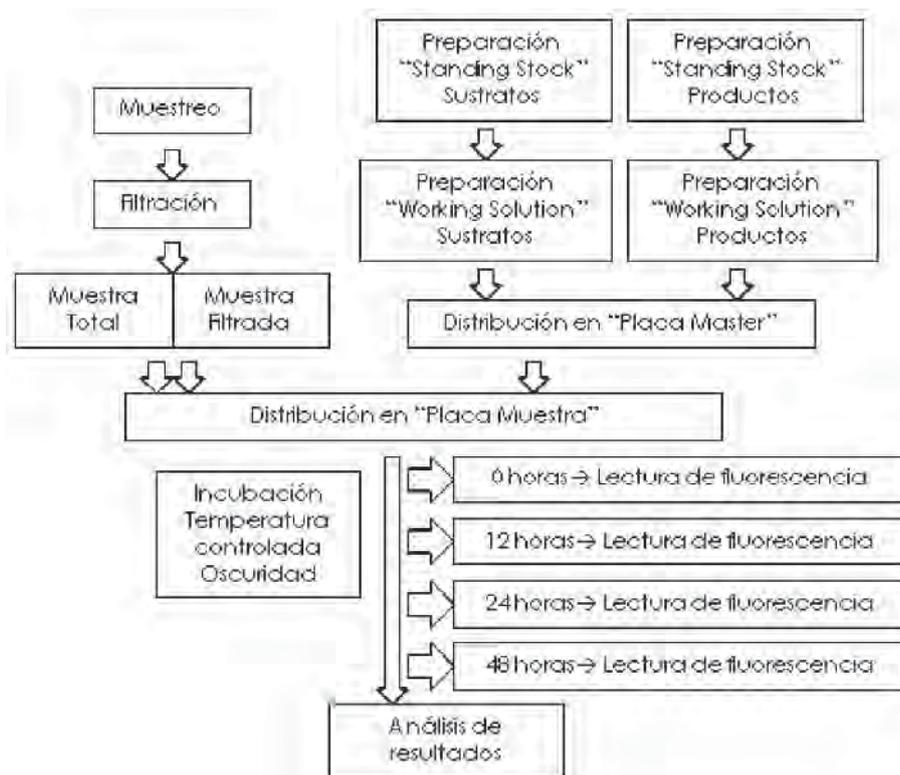
A cada uno de los pocillos de estas microplacas se añadirán:

- 10 μl de WS, procedentes de la “master-microplate”.
- 240 μl de muestra, Total o Filtrada.

Medida de la fluorescencia de la muestra

Una vez preparada la placa, se realizará la primera medida de fluorescencia en los pocillos mediante el lector de microplacas utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de emisión de 445 nm. Una vez realizada la medida, las placas se incubarán a la temperatura adecuada hasta las siguientes medidas de fluorescencia, que se realizarán al cabo de 12 h, 24 h y 48 h.

Cuadro sinóptico de la técnica



Cálculo de los resultados

El proceso de cálculo se esquematiza a continuación:

- Analizar replicados para la detección y supresión de "outliers".
- Calcular el incremento de fluorescencia en cada pocillo a lo largo de las 48 horas de incubación.
- Establecer la linealidad de las medidas.
- Calcular el incremento de fluorescencia en cada pocillo por hora.
- Calcular los valores medios de incremento de fluorescencia por hora para cada análisis.
- Calibrar la determinación de unidades de fluorescencia frente a la concentración de los productos.
- Convertir las unidades de fluorescencia en concentración de producto generado.



Control de calidad

El buen funcionamiento del aparato se debe chequear diariamente mediante la comparación de los estándares de calibración y fluorescencia inicial de las muestras mezcladas con el correspondiente sustrato. Aunque la fluorescencia varía ligeramente en función de la muestra y temperatura de medida, las desviaciones significativas en la cantidad de fluorescencia inicial pueden usarse para detectar errores de pipeteo o deterioro de las soluciones de calibración o de sustrato utilizadas.

Referencias

- BENNER, R., J. D. PAKULSKI, M. MCCARTHY, I. HEDGES, P. G. HATCHER. 1992. «Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean». *Science* 255: 1561-1564.
- BERMAN, T. 1988. «Differential uptake of orthophosphate and organic phosphorus substrates by bacteria and algae in Lake Kinneret». *J. Plankton Res.* 10: 1239-1249.
- CHROST R. J. 1993. «Enzymatic transformation of organic matter in aquatic environments». En: GUERRERO R., PEDRÓS-ALIÓ C. (eds.) *Trends in Microbial Ecology*, Spanish Society for Microbiology, pp. 401-106.
- FLINT, K. P., J. W. HOPTON. 1977. «Substrate-specificity and ion inhibition of bacterial and particle associated alkaline-phosphatases of waters and sewage sludges». *Eur. J. Appl. Microbiol.* 4: 195-204.
- HOPPE, H.-G. 1983. «Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: Measurements by means of methyl-umbelliferyl-substrates». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11: 299-308.
- HOPPE, H.-G. 1993. «Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria». En: KEMP P. F., SHERR B. F., SHERR E. B. COLE J. J. (eds.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, pp. 423-432.
- HOPPE, H.-G., S.-J. KIM, K. GOCKE. 1988. «Microbial decomposition in aquatic environments: combined process of extracellular enzyme activity and substrate uptake». *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 784-790.

