

# Bakteriální bioluminiscence

Ondřej Vašíček

[ondrej.vasicek@ibp.cz](mailto:ondrej.vasicek@ibp.cz)

# Bakteriální bioluminiscence - obsah



Základy bioluminiscence



Historie bioluminiscence



Bioluminiscenční bakterie



Výskyt BL bakterií



Biochemie reakce – *lux* operon

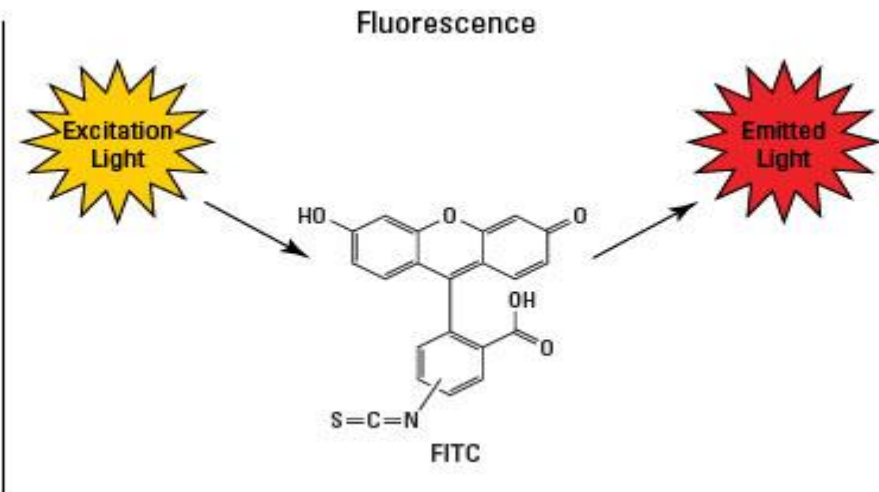
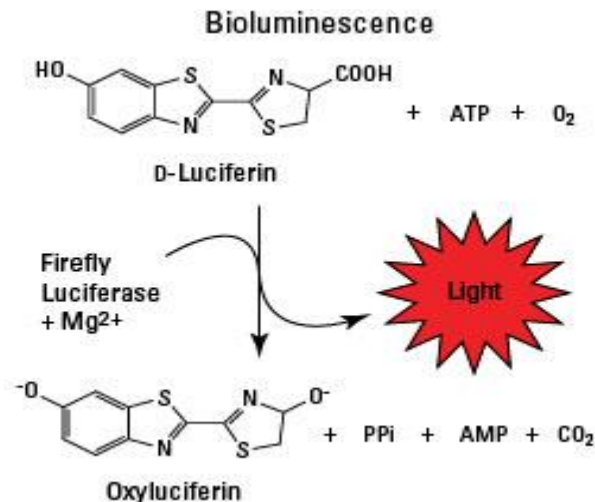


Využití bakteriální luminiscence

# Bioluminescence

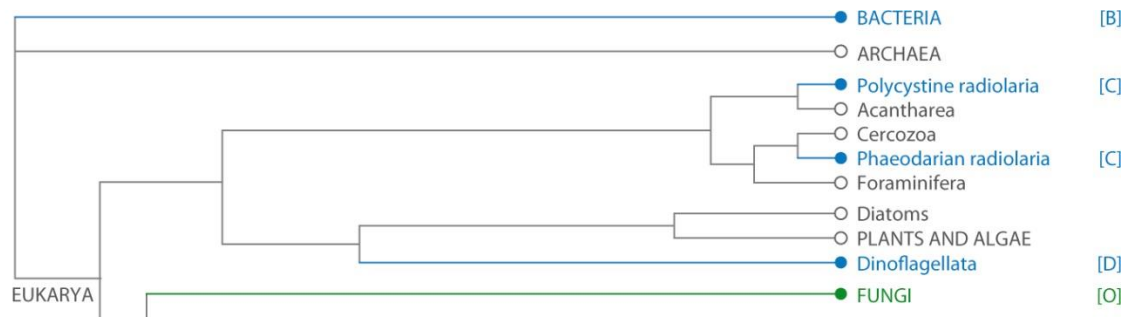
Bioluminescence je emise světla z biochemických reakcí, které se objevují v živých organismech.

Při této reakci se vyzařuje až 96 % světla a jen 4 % tepla, je tedy z hlediska daných organismů velmi efektivní (pro porovnání, u výbojek je jen 10 %)



# Bioluminescence – fylogenetické rozšíření

Bioluminescence však je fylogeneticky rozšířený fenomén, který se rozvíjel nezávisle u mnoha živočichů a mikrobů

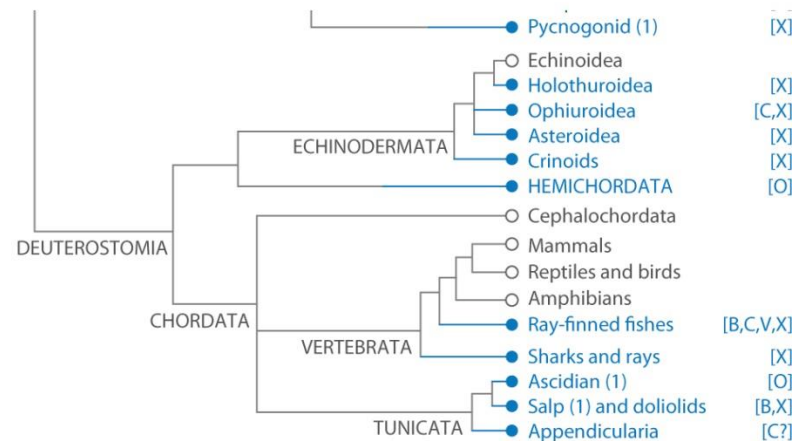


## Luciferin type

- [B] Bacterial (+ symbiont)
- [C] Coelenterazine
- [D] Dinoflagellate
- [V] Vargula (ostracod)
- [O] Other (known)
- [X] Other (unknown)

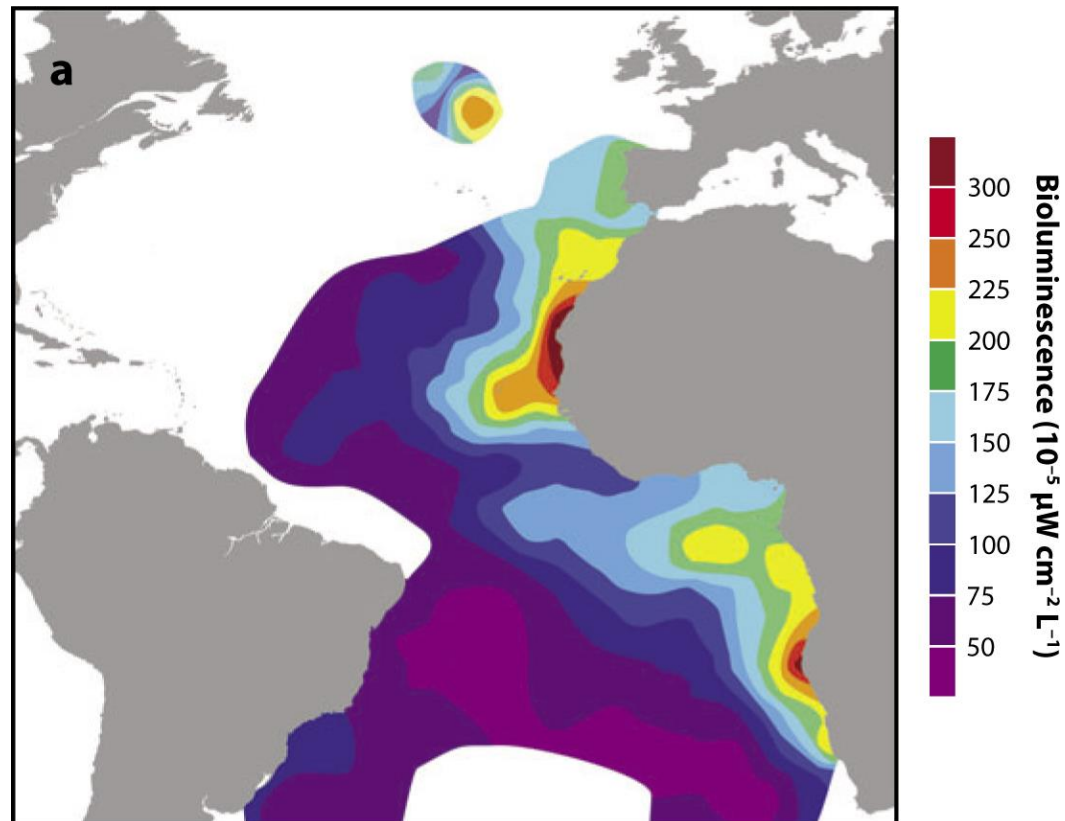
## Luminescence and habitat

- Nonluminous
- Terrestrial/freshwater
- Marine
- \* Unsubstantiated reports of lumin



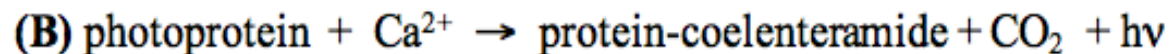
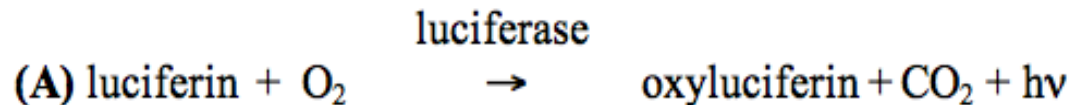
# Bioluminescence - rozšíření

Obvyklá hlavně v hlubinách moří, kde obecně všichni živočichové emitují světlo

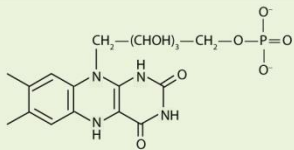


# Bioluminescence – charakteristické rysy

1. Probíhá v přítomnosti kyslíku
2. Vždy jsou zapotřebí dva typy látek:  
**luciferin**  
**luciferáza**  
(lucifer znamená přinášející světlo).  
Struktura a vlastnosti luciferázy a luciferinů se liší u jednotlivých skupin lumineskujících organismů
3. Luciferin je základním substrátem reakce
4. Luciferáza katalyzuje reakci
5. Někdy jsou luciferin a luciferáza navázány a tvoří jednotku nazvanou fotoprotein. Aktivita fotoproteinu je spouštěna dodáním určitého typu iontu (nejčastěji  $\text{Ca}^{2+}$ ).

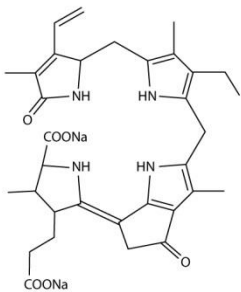


# Bioluminescence - spektrum



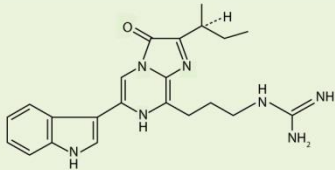
**Bacterial**  
Luciferin + Aldehyde + Luciferase

Bacteria  
Some fish  
Some squid  
Pyrosomes?



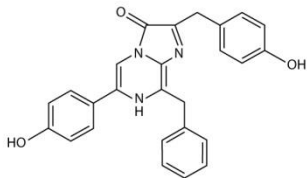
**Dinoflagellate**  
Luciferin + Luciferase

Dinoflagellates  
Euphausiid shrimp



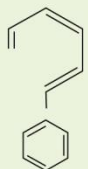
**Cypridina**  
Luciferin + Luciferase

Some ostracods  
Midshipman fish  
Some other fish



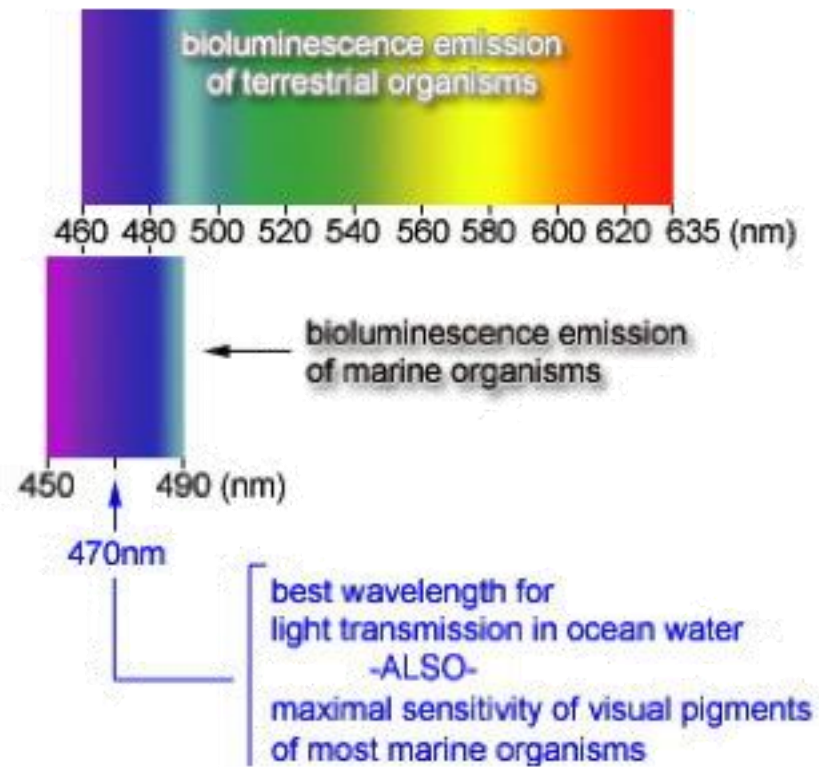
**Coelenterazine**  
Luciferin + Luciferase  
Photoprotein

Radiolarians  
Ctenophores  
Cnidarians  
Squid  
Some ostracods  
Copepods  
Decapod shrimp  
Mysid shrimp  
Some ophiuroids  
Chaetognaths  
Larvaceans  
Some fish

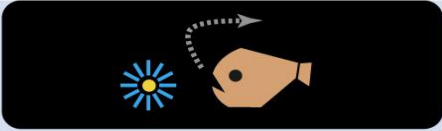
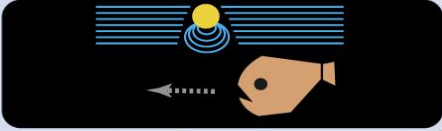




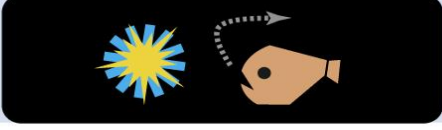


**Other or unknown mechanism**  
Luciferin + Luciferase  
Photoprotein  
? + ?

Some polychaetes  
Bivalves  
Hemichordates  
-----  
Amphipods  
Nemertean worms  
Tunicates and doliolids  
Echinoderms  
Other polychaetes



# Bioluminescence - funkce

DEFENSE		<b>Startle</b>	Dinoflagellates, squid, stern-chaser myctophid
		<b>Counterillumination</b>	<b>Many:</b> crustaceans, fish, squid
		<b>Misdirection: smoke screen</b>	<b>Many:</b> crustaceans, polychaetes, scyphozoans, chaetognaths, squids, tube-shoulder fishes, ctenophores, siphonophores, larvaceans?
		<b>Distractive body parts</b>	<i>Octopoteuthis</i> squid, brittle stars, polychaetes, siphonophores
		<b>Burglar alarm</b>	Dinoflagellates, jellies, others?
		<b>Sacrificial tag</b>	Pelagic sea cucumbers, jellies, polychaetes
		<b>Warning coloration (deter settlers)</b>	Jellies, brittle stars? (tube worms, clams)



Flash



Glow



Prey



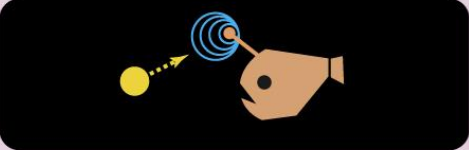
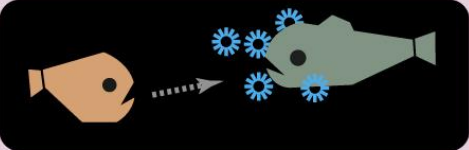


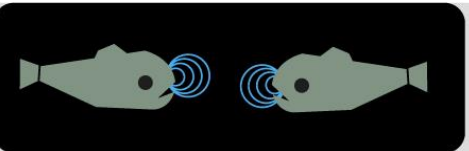
Predator



2° Predator



# Bioluminescence - funkce

OFFENSE		<b>Lure prey or attract host (bacteria)</b>	Anglerfishes, siphonophores, cookie cutter shark, squid?
		<b>Lure with external light (evaluate habitat?)</b>	Sperm whale? megamouth shark?
		<b>Stun or confuse prey</b>	Squid, headlamp myctophid?
		<b>Illuminate prey</b>	Flashlight fish, dragonfishes
		<b>Mate attraction/recognition (swarming cue)</b>	Ostracods, <i>Japetella</i> octopus? lanternfish, flashlight fish, anglerfish? syllid polychaetes, others?



Flash



Glow



Prey



Predator



2° Predator

# Bioluminescence – historické milníky

**1947** The energy source for bioluminescence in an isolated system. W.D. McElroy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 33: 342-345. Adenosine triphosphate (ATP) is an essential requirement for the in vitro reaction of firefly bioluminescence.

**1953** The requirement of riboflavin phosphate for bacterial luminescence. W.D. McElroy, J.W. Hastings, V. Sonnefeld, and J. Coulombre. Science 118: 385-386. Reduced flavin mononucleotide (FMNH<sub>2</sub>) is one essential requirement being reduced by NADH.

**1954** Isolation, identification, and function of long chain fatty aldehydes affecting the bacterial luciferin-luciferase reaction. B.L. Strehler and M.J. Cormier. J. Biol. Chem. 211: 213-225.

**1955** Crystalline firefly luciferase. A.A. Green and W.D. McElroy. Biochim. Biophys Acta 20: 170-176. Firefly luciferase was purified as a protein with a mass around 100 kDa.

**1961** The structure and synthesis of firefly luciferin. E.H. White, F. McCapra, G. Field, and W.D. McElroy. J. Amer. Chem. Soc. 85: 337-343.

**1962** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the hydromedusan, Aequorea. O. Shimomura, F.H. Johnson, and Y. Saiga. J. Cell. Comp. Physiol. 59: 223-239. Aequorin was named a "photoprotein", as it required only Ca<sup>2+</sup> and not oxygen for light emission.

# Bioluminescence – historické milníky

**1965** Cypridina bioluminescence. Structure of Cypridina luciferin. Y. Kishi, T. Goto, Y. Hirata, O. Shimomura, and F. H. Johnson. Tetrahedron Lett. No. 29, 3427-3436.

**1969** Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin. E.H. White, E. Rapaport, T.A. Hopkins, and H.H. Seliger. J. Amer. Chem. Soc. 91; 2178-2180. A red shifted bioluminescence induced by pH attributed to keto-enol tautomerism in the excited state.

**1971** Mechanism of luminescent oxidation of *Cypridina* luciferin. O. Shimomura and F.H. Johnson. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 340-346. A dioxetanone intermediate was proposed from product analysis of the reaction using oxygen-18.

**1981** The use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. A.A. Bulich and D.L. Isenberg. ISA Trans. 20: 29-33. This technical report was the basis of a patent, which resulted in the widest application of bioluminescence methodology.

**1992** Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. D.C. Prasher, V.K. Eckenroad, W.W. Ward, and M.J. Cormier. Gene 111: 229-233. The result of this cloning, and later expression, of GFP was a revolution in biotechnology applications.

# Bioluminescence



<https://www.youtube.com/watch?v=oKjFVBVGad0&t=1s>



<https://www.youtube.com/watch?v=9HXXQBz6Vv0>

# Bakteriální bioluminiscence

# Bakteriální bioluminiscence

Nejvíce se vyskytují v mořské vodě, některé jsou terestrické a sladkovodní.

Rozlišujeme 4 rody:

*Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* a *Photorhabdus*

Vyskytují se jak samostatně, tak v symbióze s hostitelským organismem  
- nutný přísun potravy/energie

Některé jsou i parazitické

# Bakteriální bioluminiscence - symbióza

## Řas mořský (*Lophius piscatorius*, Linnaeus, 1758)

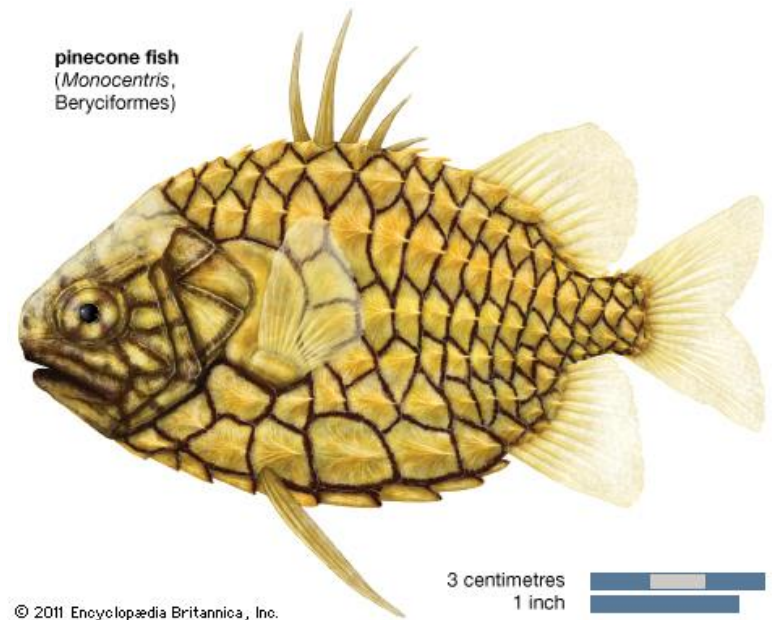
První tři paprsky hřbetní ploutve jsou modifikovány v dlouhé útvary, připomínající tykadla. Na prvním se nachází světélkující útvar, který slouží jako návnada při lovu. Světélkování je zajištěno miliony bioluminiscenčních bakterií.



# Bakteriální bioluminiscence - symbióza

## Tronoš (*Monocentris japonica*, Houttuyn, 1782)

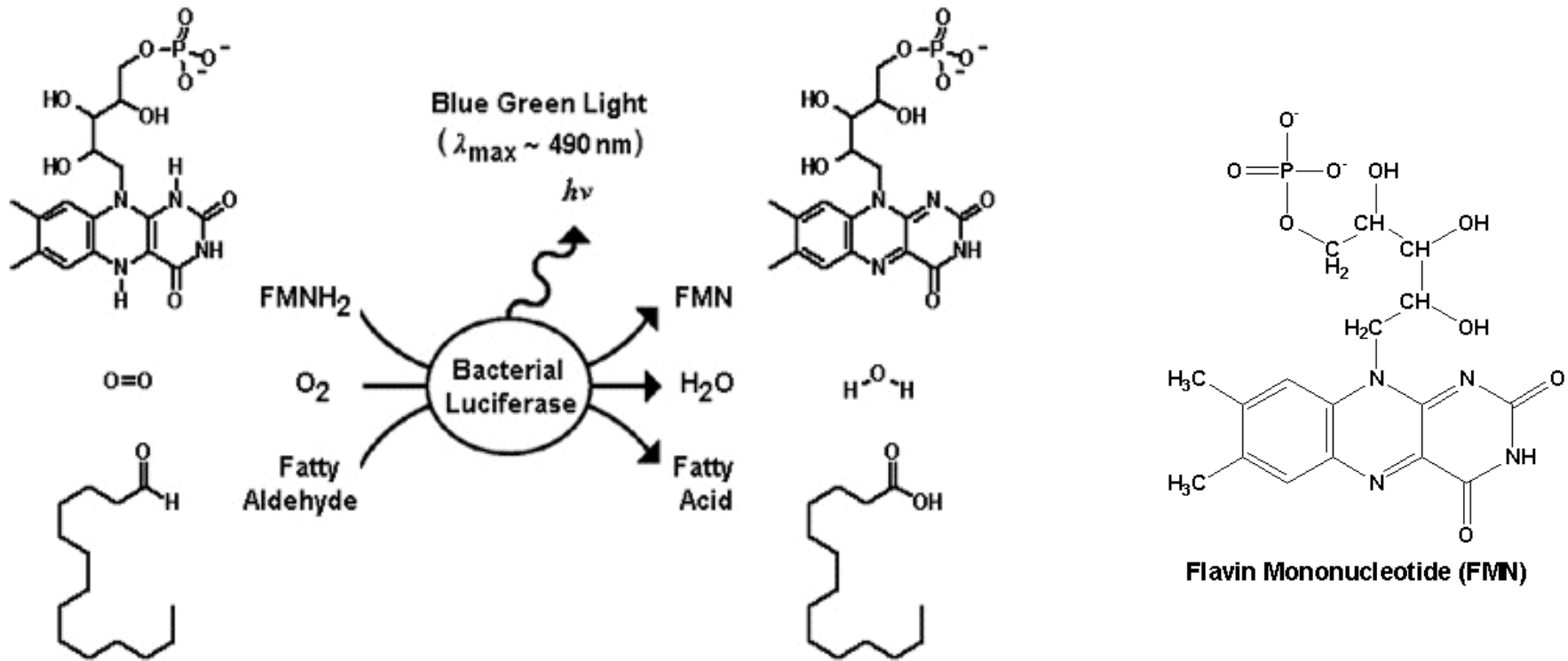
Bioluminiscenční bakterie využívány ke komunikaci mezi ostatními druhy.



<https://www.pinterest.de/pin/347129083762967396/>



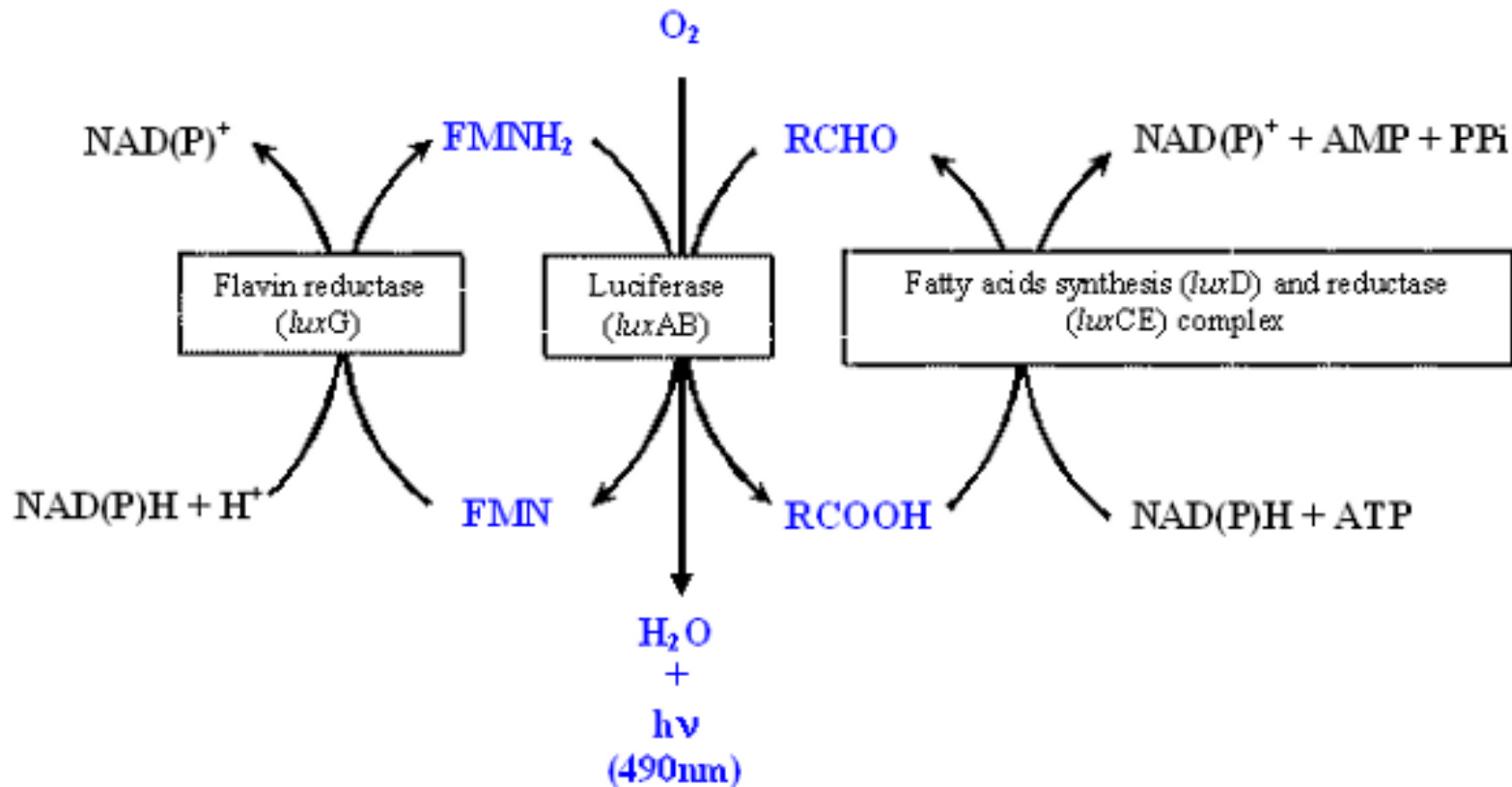
# Bakteriální bioluminiscence



<http://photobiology.info/Lin.html>

# Bakteriální bioluminiscence

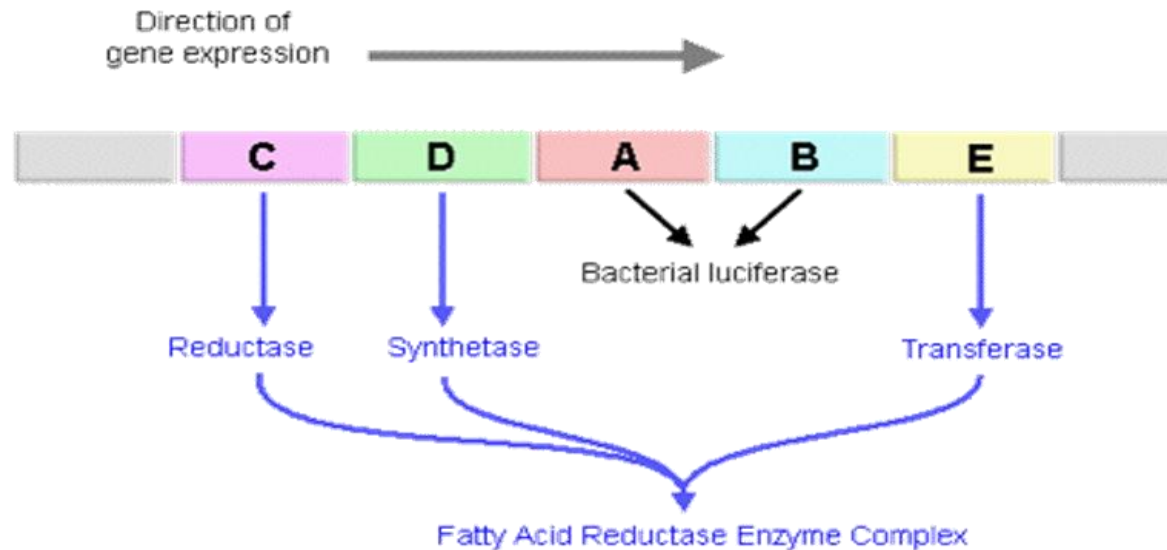
Luminiscence je energeticky náročná (vysoká spotřeba ATP luciferázou), spotřebovává až 20% celkové buněčné energie (Nealson & Hastings 1979, Bassler & Silverman 1995).



# Bakteriální bioluminiscence – *lux* operon

Bioluminiscenční (*lux*) geny jsou podobné pro všechny BL bakterie. Zahrnují 5 genů: *lux A* a *lux B* jsou zodpovědné za alfa a beta podjednotky luciferázy

*lux C*, *D* a *E* kódují komplex reduktázy mastných kyselin potřebné pro generování a recyklaci mastných kyselin na aldehyd (decanal).



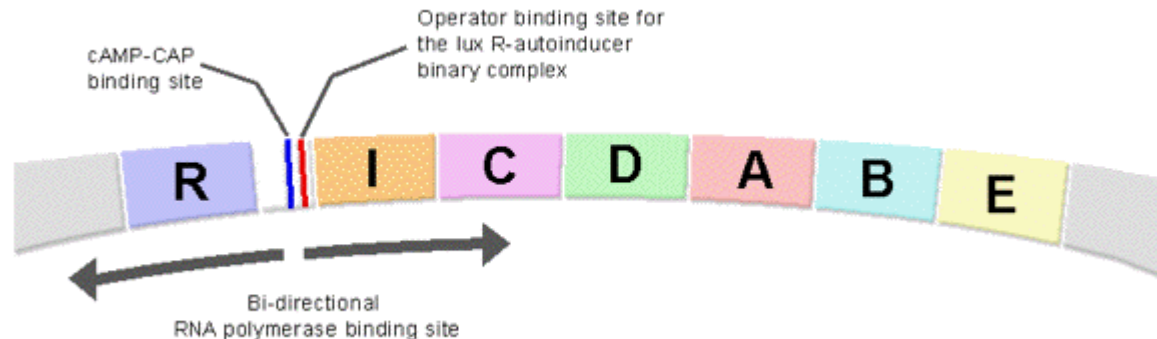
# Bakteriální bioluminiscence – *lux* operon

Dva regulační geny:

Gen *lux I* řídí syntézu N-acyl homoserin laktonu (HSL), signalizační molekuly známé jako autoinduktor potřebný pro aktivaci *lux* genů.

Gen *lux R* kóduje syntézu N-acyl HSL receptoru - transkripčního faktoru odpovídajícího na N-acyl HSL signál. Receptor má DNA binding doménu a N-acyl HSL binding doménu.

Hustota bakteriální suspenze je potřebná k dosažení kritické koncentrace autoinduktoru. Poté dojde k vazbě luxR produktu a transkripci luminiscenčních genů = Quorum sensing

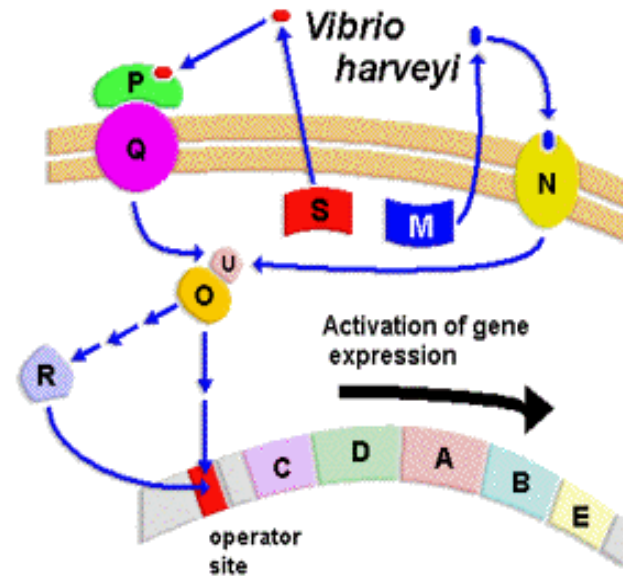
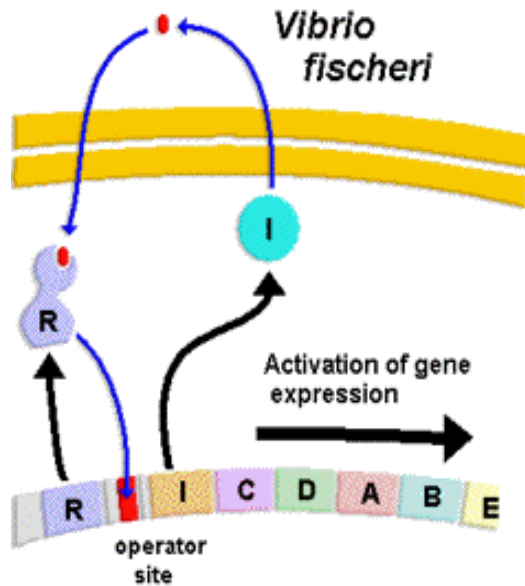


<http://photobiology.info/Lin.html>

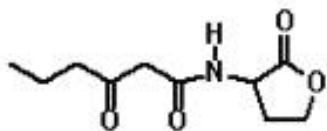
Produkce luminiscence je těsně spjata s buněčným metabolismem a je tedy odrazem viability bakterií.

# Bakteriální bioluminiscence – *lux* operon

Srovnání mechanismů regulace exprese lux genů u *V. fischeri* a *V. harveyi*

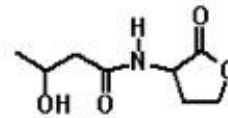


Autoinducer in *V. fischeri*



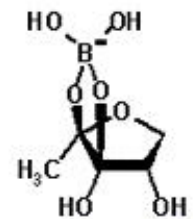
N-(3-oxohexanoyl)  
homoserine lactone

Two autoinducers in *V. harveyi*



N-(3-hydroxybutanoyl)  
homoserine lactone

Autoinducer-1 (AI-1)

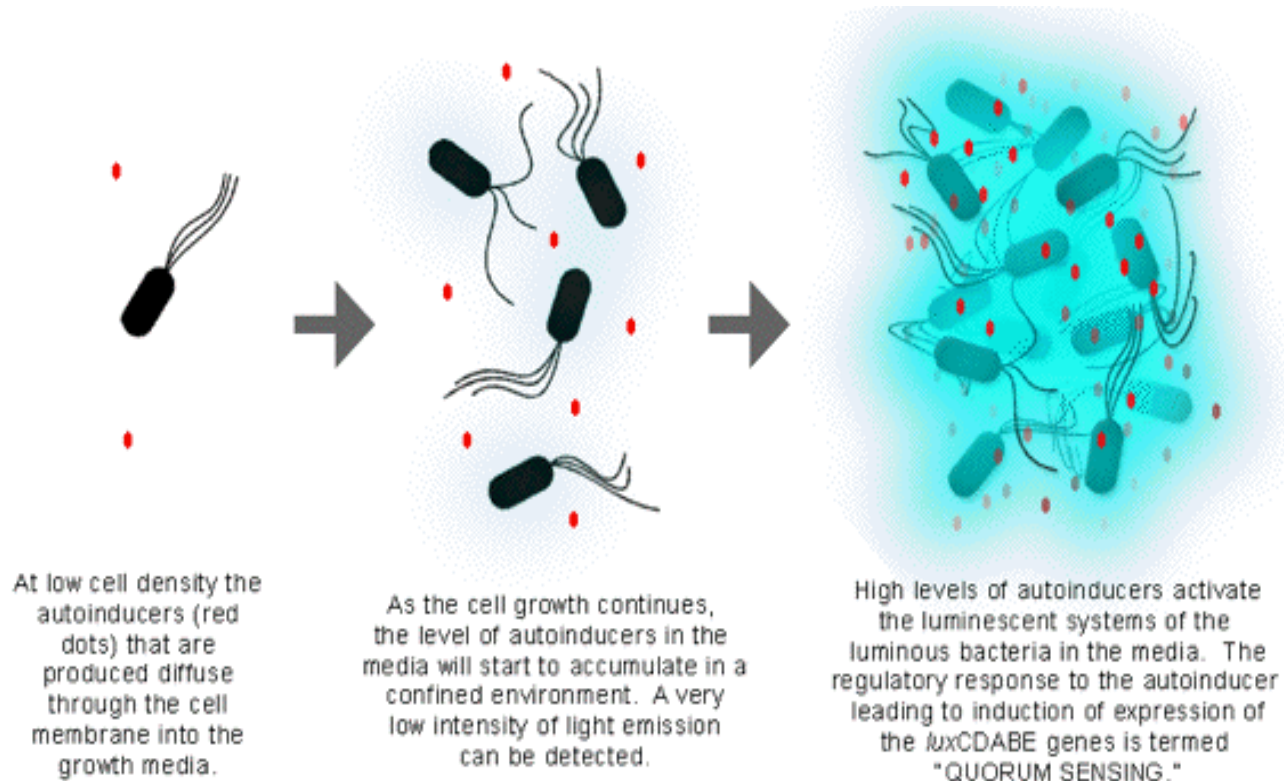


Furanosyl borate diester

Autoinducer-2 (AI-2)

# Bakteriální bioluminiscence – *lux* operon

Regulace exprese lux genů u bioluminiscenčních bakterií



# Bakteriální bioluminiscence – aplikace

## Ekotoxikologie

Aplikace metody:

- odpadní vody
- čerstvá voda (povrchová i spodní)
- slaná a brakická voda
- sedimenty a výluhy
- další vzorky rozpustné ve vodě

Faktory ovlivňující bakteriální biolum. aktivitu:

- optimální pH kolem 7
- změny v koncentraci NaCl
- absorpce světla silným zabarvením vzorku
- vysoká spotřeba kyslíku vzorkem

Factory ovlivňující *in vivo* reakci:

- genetická kontrola
- koncentrace rozpuštěného kyslíku
- koncentrace  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  iontů
- intracelulární energetická rovnováha

Chemické, fyzikální a biologické toxikanty, které ovlivňují:

- respiraci buněk
- syntézu proteinů
- syntézu lipidů
- integritu buněk
- a zvláště funkce buněčných membrán

= > mají silný vliv na *in vivo* bioluminiscenci

# Bakteriální bioluminiscence – aplikace

## Výhody analýz

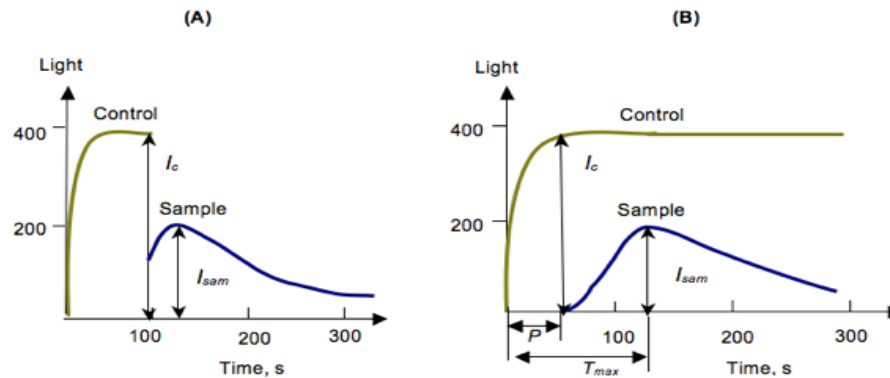
- snadno proveditelné
- finančně nenáročné
- vysoce citlivé
- široké spektrum aplikací
- eticky akceptovatelné
- toxicitu je možno vztáhnout i na vyšší organismy
- malý objem analyzovaného vzorku
- krátká doba provedení = rychlé výsledky
- statisticky spolehlivé (vysoký počet testovaných organismů)

## Mezinárodní normy

- Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*; Leuchtakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien, DIN 38 412-L34 (L341)
- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test), ISO/CD 11348



# Bakteriální bioluminiscence – aplikace



**Figure:** (A) Bioluminescent assay scheme; (B) Modified scheme of bioluminescent assay. The Light is bioluminescence intensity in relative units;  $I_c$  and  $I_{sam}$  are maximum values of bioluminescence intensity in the presence of control or analyzed sample respectively;  $T_{max}$  is the time when the coupled enzyme system reached the luminescence maximum;  $P$  is a time when the bioluminescent signal is absent due to an effect of redox active compounds in a sample.

When analyzing toxicity of water samples, the luciferase index (LI) or toxicity coefficient (TC) are calculated according to the formulas:

$$LI = (I_{sam} / I_c) \cdot 100 \%$$
$$TC = [(I_c - I_{sam}) / I_c] \cdot 100 \%$$
$$TC = 100 - LI$$

LI and TC are the residual luminescence and the degree of inhibition, respectively, of the bacterial coupled enzyme system Red + Luc in the presence of the analyzed sample. The criterion of toxicity is a 50 % decrease in the maximum of light emission for the bacterial coupled enzyme system Red + Luc after the analyzed sample is added. To compare the toxicity of individual substances, values used for TC are the 50% and 20% loss of luminescence for the coupled enzyme system Red + Luc.

# Bakteriální bioluminiscence – aplikace

## Potřebné vybavení:

- luminometr (přenosný)
- kyvety nebo mikrotitrační destičky
- kultura bakterií
- NaCl
- čistá (redestilovaná) voda

## Pracovní postup – zjednodušený protokol:

- Připrav (odeber) vzorek
- Nastav salinitu a pH (pokud je to nutné)
- Připrav si několik ředění vzorku
- Připrav kulturu bakterií, stabilizuj ji
- Pipetuj bakterie do zkumavek
- Změř bioluminiscenci
- Přidej vzorek a inkubuj (podle bakt. kultury 15 nebo 30 minut nebo i déle)
- Změř bioluminiscenci po inkubaci
- Vypočítej výsledky (EC50)

# Bakteriální bioluminiscence – aplikace

**EC50 – Efektivní koncentrace** (ppm - parts per million) toxikantů, které působí 50% inhibici luminiscence

<b>Toxicant</b>	<b>EC50 @20-30 min</b>	<b>EC50 @50-60 min</b>
Cadmium (II)	0.06	0.06
Copper	0.02	0.007
Lead (II)	0.1	0.2
Nickel (II)	0.1	0.01
Mercury (II)	0.07	0.03
Chlorpyrifos	1	0.3
Chlordane	0.2	0.15
DDT	0.12	0.06
Pentachlorophenol (PCP)	0.007	0.003
Aldrin	0.2	0.1
2,4-D	1	1.25
Aroclor 1254 (PCB)	0.01	0.008
Aroclor 1232 (PCB)	0.125	0.1
Fluoranthene (PAH)	0.3	0.15
Bromoform (THM)	0.3	0.3
Kerosene (TPH)	0.2	0.1
Diesel fuel (TPH)	0.7	0.25

# Bakteriální bioluminiscence – aplikace

## Typové kultury rodu *Photorhabdus* z CCM Brno:

***Photorhabdus asymbiotica* CCM 7074<sup>T</sup>**

- izolace z lidského poranění, Texas

***Photorhabdus luminescens* ssp. *akhurstii* CCM 7075<sup>T</sup>**

- izolace z *Heterorhabditis indica*, Guadeloupe

***Photorhabdus luminescens* ssp. *laumondii* CCM 7076<sup>T</sup>**

- izolace z *Heterorhabditis bacteriophora*, Trinidad a Tobago

***Photorhabdus luminescens* ssp. *luminescens* CCM 7077<sup>T</sup>**

- izolace z *Heterorhabditis bacteriophora*, Australia

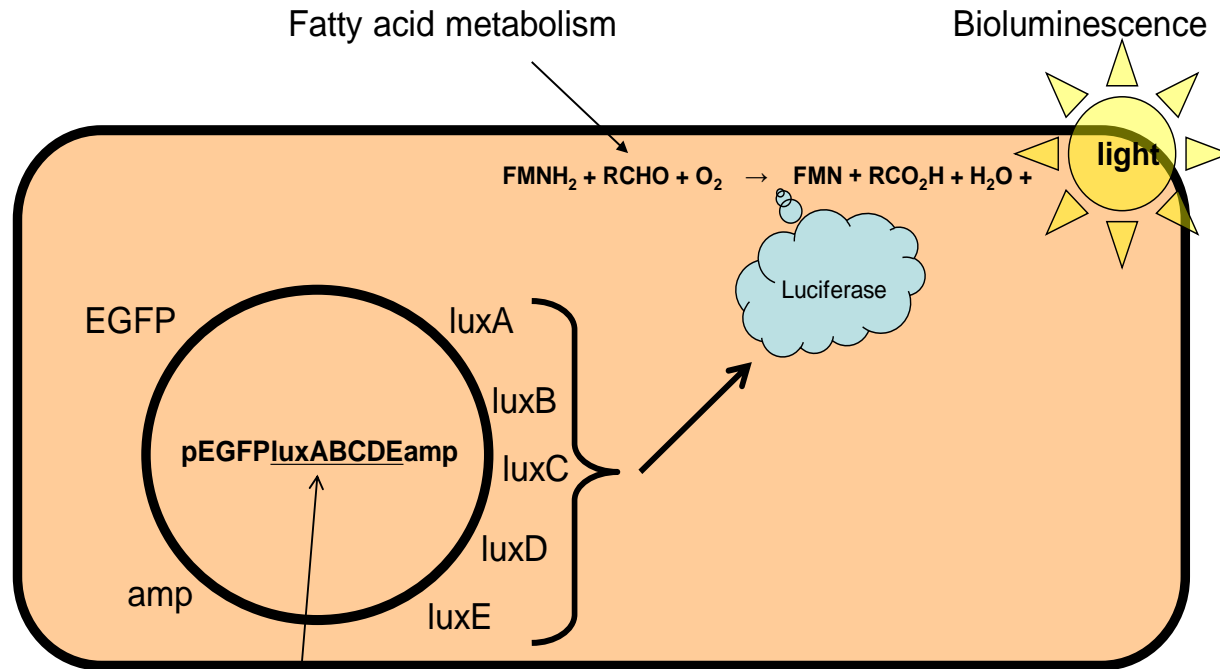
***Photorhabdus temperata* CCM 7078<sup>T</sup>**

- izolace z *Heterorhabditis megilis*, Rusko

# Bakteriální bioluminiscence – aplikace

## Toxikologie

*Escherichia coli* K 12 (pEGFP<sub>lux</sub>ABCDEamp) *E.coli-lux*



*Photorhabdus luminescens*

# Literatura

<http://photobiology.info/#Biolum>

<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-marine-120308-081028>

John Lee - <http://tube.sfu-kras.ru/video/1134>

Děkuji za pozornost