

Dean Madden

NCBE, The University of Reading

Britt-Marie Lidesten

Erik Dahlbergsgymnasiet, Jönköping

Bakteriell illumination

Att odla luminescenta bakterier

Passagerare, som befinner sig ombord på ett kryssningsfartyg, förvånas ibland nattetid över det ljussken som kan uppstå, när man spolar toaletter med havsvatten. Fenomenet beror på luminescenta mikroorganismer, som fordrar syre och ibland också fysisk skada för sina ljusemitterande reaktioner. Sådana mikrober finns i alla marina miljöer [1]. Deras närvaro kan ställa till problem — mycket av forskningen på luminescenta dinoflagellater har bekostats av Marinen i USA, eftersom ljusspåren efter fartyg och numera också interferens med laserljus som används vid undervattenskommunikation, är mycket besvärande [2].

Luminescenta bakterier kan emellertid också vara mycket användbara. De är mycket känsliga för föroreningar och används därför ofta i stället för djurtester, för att upptäcka toxiner i vatten [3]. De ljusproducerande reaktionerna kan också användas vid analytiskt arbete *in vitro* [4].

Bakterien *Photobacterium phosphoreum* (Figur 1) är den mest lysande av alla bakterier. Den trivs i rumstemperatur (20–25 °C eller lägre), så den behöver inte någon speciell inkubator vid odling. Eftersom bakterien fordrar saltvatten för sin överlevnad, så är risken att den skall överleva under en längre tid om den skulle spillas ut, mycket liten. Av denna anledning rekommenderas den ofta vid skolarbete. [5].

Elever kan odla *P. phosphoreum* för att lära sig sterilteknik. E-kolvar med buljong är lämpligt vid odling av dessa organismer. Ytterligare undersökningar är givetvis också möjliga att utföra.

Om tid och lokala säkerhetsföreskrifter medger kan luminescenta bakterier isoleras från huden av havsfisk eller bläckfisk. Man måste då odla dem på ett speciellt medium.

KORRESPONDANS TILL

Dean Madden

National Centre for Biotechnology
Education, The University of Reading,
Whiteknights, Reading, RG6 6AP
The United Kingdom.

D.R.Madden@reading.ac.uk

Britt-Marie Lidesten

Erik Dahlbergsgymnasiet,
Föreningsgatan 2, 550 02 Jönköping
Sverige.

Lt@ed.edu.jonkoping.se

Fig. 1

Photobacterium phosphoreum har strukits på en Petri platta.

Detta fotografi har tagits med en lång exponeringstid. För blotta ögat ser dessa lysande kulturer mer gröna än blå ut. En stark luminescens kan endast erhållas om man använder ett speciellt medium för *Photobacterium*.

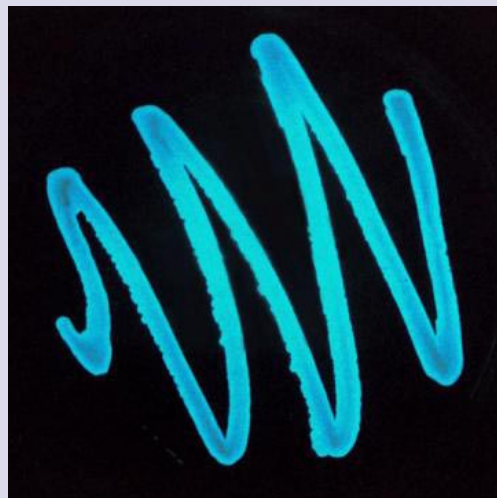


Fig. 2
Luciferas från *Photobacterium phosphoreum*. Data för denna modell har erhållits från *Protein Data Banken*, ID kod 1FVP. Se Referens [6].

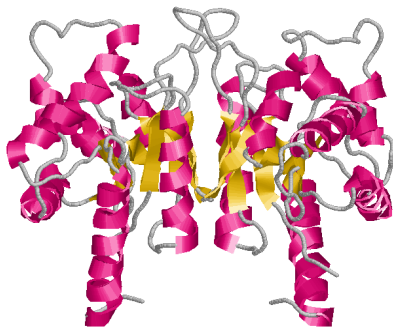


Fig. 3
Strukturen hos bakteriellt luciferin.

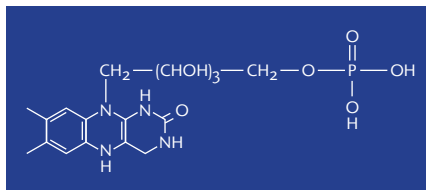
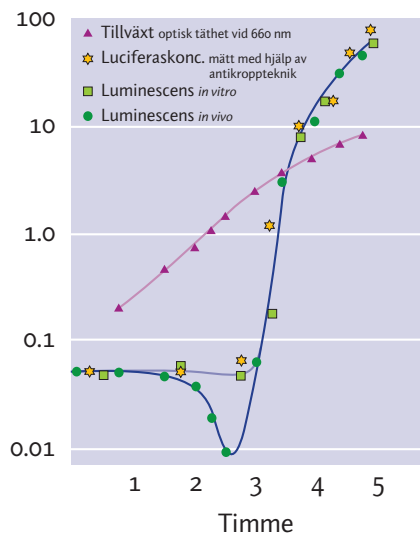


Fig. 4
Utveckling av luminescens och luciferas i jämförelse med tillväxt hos *Vibrio fischeri*. Se Referens [7].



Hur åstadkommer bakterierna ljus?

Den ljusbildande reaktionen är en sidogren till elektrontransportkedjans reaktioner vid bakteriernas respiration. Till skillnad från den ljusbildande reaktionen hos dinoflagellater, som endast sänder ut ljus då de utsätts för fysisk stress, är bakteriernas luminescens en ständigt pågående process. Under reaktionen bildar den reducerade formen av luciferin (FMNH₂) ett komplex med enzymet luciferas. Detta komplex reagerar med molekylärt syre och bildar den oxiderade formen av luciferin (oxyluciferin eller FMN) och 'exciterat' luciferas. Aldehyder som består av långa kedjor fordras också vid denna del av reaktionen. Återbildningen av luciferas till dess 'vilstadium' resulterar i emission av fotoner (Figur 5).

Varför skickar bakterier ut ljus?

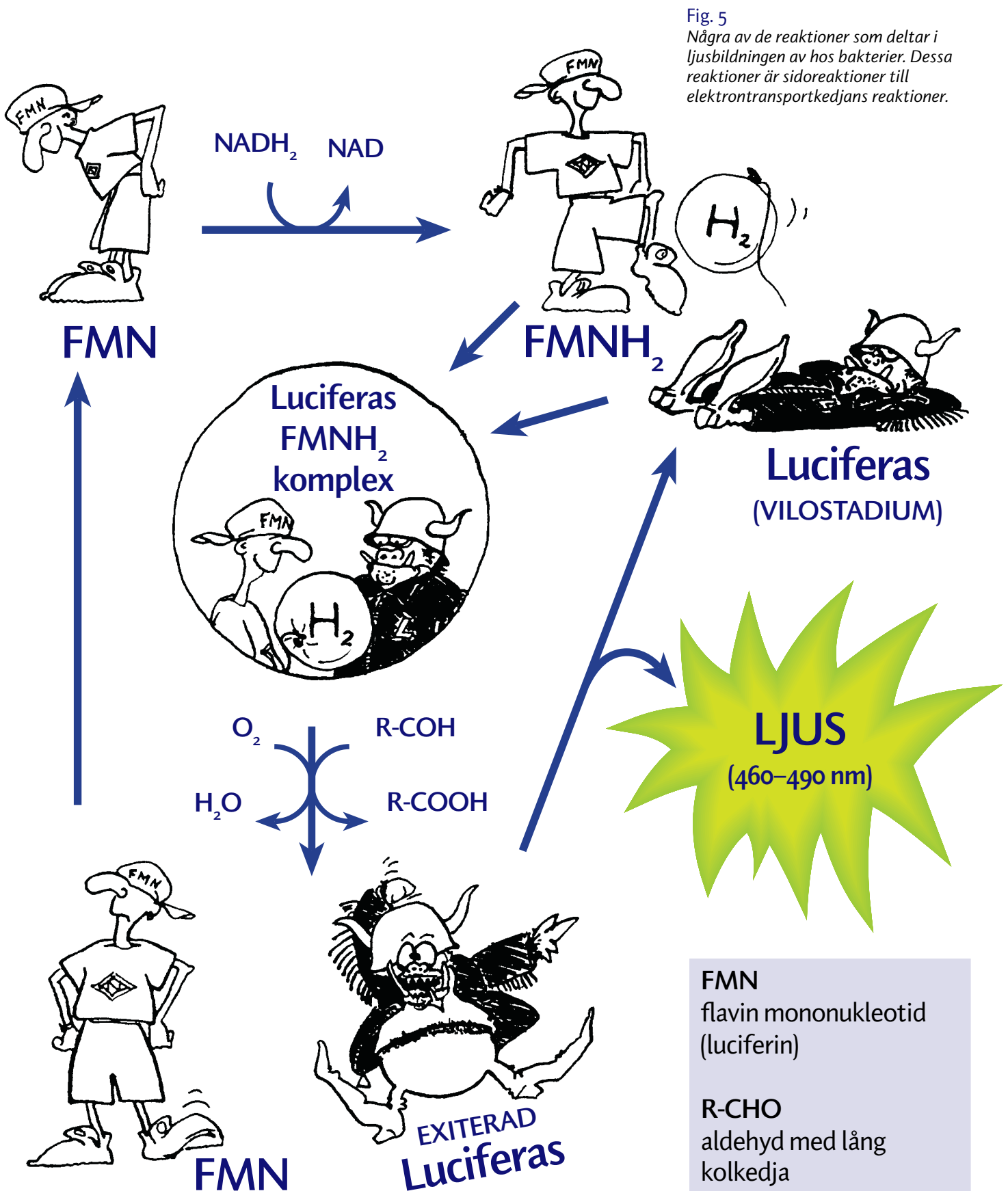
Trots att man har känt till biokemin vid ljusemission under en längre tid, har förståelsen av dess betydelse länge varit ett mysterium. Mängden ljus som bildas av en enskilda bakteriecell är alltför liten, för att vara av någon fysiologisk eller ekologisk betydelse. Nu känner man till att frilevande bakterier i havet inte bildar något luciferas och därmed inte heller kan emittera något ljus. Det är endast när bakteriecellerna är sammanpackade, t. ex. i specialiserade ljusorgan hos fisk eller bläckfisk, som de lyser klart. I detta symbiotiska förhållande förser djuret bakterierna med en näringsrik omgivning, som stimulerar tillväxten. I utbyte får djuret ljus, som kan användas till att attrahera byten, kommunikation eller kamouflage [1].

Vad är orsaken till att bakterierna lyser i ett ljusorgan, men inte i öppna havet? Laboratorieobservationer, som gjordes i slutet av 1960-talet, visade att nyligen ympade kulturer av *Vibrio fischeri* endast emitterar ljus när celltätheten nått en viss nivå (Figur 4). Först trodde man att detta berodde på att kulturmediet innehöll någon sorts inhibitor till den ljus-genererande reaktionen och som försvann när bakteriekulturen blev tätare. Det visade sig senare att detta var fel. I stället ackumuleras en aktivator molekyl eller 'autoinducer' vid stor celltäthet, som utlöser ljusproduktionen. Bakterien kan känna av celltätheten genom att upptäcka autoinducern samt också dess koncentration. Man kallar denna typ av cell signalering för *quorum sensing* [för en kort historik, se Referens 8].

Grundmekanismen för *quorum sensing*, som undersökts hos *V. fischeri* och *Vibrio harveyi* liknar de mekanismer, som reglerar genuttrycken hos många gramnegativa bakteriearter. *Quorum sensing* finns också hos grampositiva bakterier och man tror också att kommunikation kan ske mellan arter ('*quorum sensing cross talk*'). Denna typ av bakteriekommunikation anses numera spela en stor roll i patogeneras virulens och i enzym och antibiotika produktion. Forskning inom detta område kan därför vara av stor ekonomisk och medicinsk betydelse.

Samtidigt med arbete på *quorum sensing*, har studier över bakterieluminescens på genetisk nivå utförts [9, 10]. Det finns sju så kallade *lux* gener, som behövs för att producera och reglera luminescensen hos *V. fischeri*. Två plasmider som innehåller dess gener har konstruerats för undervisningsändamål och deras funktioner kan demonstreras genom att sätta in dem i *Escherichia coli* [11].

VIKTIGT! Observera att i EU får den typ av bakterie-transformation, som ovan anges, endast utföras efter särskilt tillstånd från myndighet (Arbetsmiljöverket i Sverige [12]).



FMN
 flavin mononukleotid
 (luciferin)

R-CHO
 aldehyd med lång
 kolkedja

Syfte

Att iaktta luminescens från *Photobacterium phosphoreum* eller *Vibrio fischeri*.

Utrustning och material

Behov per grupp eller person

- Snedagarkultur av *P. phosphoreum* eller *V. fischeri*
- *Photobacterium*- eller havsvattenbuljong (se recept nedan). Om varje elev utför ett experiment är det lämpligt att fördela näringsbuljongen i E-kolvar innan man autoklaverar.
- Bunsen brännare
- Ympningsnål
- Tillgång till mörkrum för att iaktta kulturerna 18–24 timmar efter ympning

Tillvägagångssätt

- 1 Ympa näringsbuljongen med bakterier och inkubera över natt vid rumstemperatur (20–25 °C). Syre är nödvändigt för luminescens. Det är därför nödvändigt att skaka E-kolven då och då. Kolvarna *måste* dock vara ordentligt förslutna. **VIKTIGT! Tillräckligt med utrymme måste lämnas ovanför vätskenivån i flaskan, så att gasproduktionen ges utrymme. Dessutom måste syre kunna diffundera ner i kulturen.**



Säkerhet

God mikrobiologisk teknik skall utövas av alla som utför denna laboration. Metoden att isolera luminescenta bakterier från fisk (se rutan sid. 6) bör endast utföras av elever som har erfarenhet av mikrobiologisk teknik. Det är viktigt att följa alla säkerhetsregler, så att inga patogena bakterier av misstag isoleras och odlas.

I Sverige skall Arbetsmiljöverkets regler följas, liksom de regler som eventuellt har satts upp lokalt.

Recept för odling av bakterier i denna laboration

Photobacterium medium

• Havsvatten salt	33 g
• Jästextrakt	5 g
• Tryptone	5 g
• Glycerol	3 g
• Tris	6 g
• NH ₄ Cl	5 g
• Dest. vatten	1 l

För ett fast medium tillsätts:

• CaCO ₃	1 g
• Agar	15–20 g

Justera pH till 7.2–7.5.

Havsvatten medium

• Jästextrakt	10 g
• Maltextrakt	4 g
• Glukos	4 g
• Havsvatten*	750 ml
• Dest. vatten	250 ml

För ett fast medium tillsätts 15–20 g agar. Justera pH till 7.5.

* *Naturligt havsvatten skall förvaras i mörker under åtminstone tre veckor innan det kan användas. Om naturligt havsvatten inte finns tillgängligt kan man använda artificiellt havsvatten.*

Artificiellt havsvatten

• NaCl	28.13 g
• KCl	0.77 g
• CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.60 g
• MgCl ₂ ·6H ₂ O	4.80 g
• NaHCO ₃	0.11 g
• MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.50 g
• Dest. vatten	1 l

All bakteriemedier skall autoklaveras vid 121 °C under 15–20 min innan användning.

Preparation

Snedagarkulturer av *P. phosphoreum* kan överleva 4 °C. Sådana kulturer måste emellertid 'återupplivas' genom att överföra dem till nya snedagarrör eller till plattor innan de kan användas av eleverna. Detta bör göras 2–3 dagar innan användandet.

E-kolvar eller provrör med näringsbuljong kan göras iordning och autoklaveras innan användandet.

Tidsåtgång

Endast kulturer under tillväxt sänder ut ljus. Maximum luminescens brukar uppstå efter 18–24 timmar efter ympningen.

Felsökning

Kulturerna måste odlas på *Photobacterium* medium om man vill erhålla stark illumination. Endast kulturer som befinner sig 'log fas' producerar ljus (se Figur 4).

Fotografering

Fotografier av plattor eller kolvar innehållande luminescenta bakterier kan tas med monochrom 125 ISO film vid $f/2.0$ under 100 sekunder. Ljuset som bildas av små bakteriekulturer kan vanligen inte fotograferas med digitalkameror, men större volymer kan *eventuellt* gå att fotografera med dylik utrustning.

Förslag på ytterligare undersökningar

1 Effekt av temperaturen på luminescensen

Bakteriekulturer kan ställas i vattenbad vid olika temperaturer (t. ex. 0–60 °C) för att undersöka vilken effekt temperaturen har på ljusproduktionen. Proteinet som erfordras för bioluminescens hos *P. phosphoreum* och *V. fischeri* denatureras vid 37 °C. *P. phosphoreum* kan växa vid 4 °C, vilket inte är möjligt för *V. fischeri*.

Kom inhåg att bioluminescens är en enzymkatalyserad reaktion. Luminescensen kan endast ses hos levande organismer, eftersom reaktionsprodukten inte kan ackumuleras inuti en cell, i motstätt till fluorescens (t. ex. det **gröna fluorescerande proteinet**, GFP).

2 Effekt av syrets koncentration

Syre fordras för ljusproduktion, vilket innebär att en kultur som lämnas stillastående endast luminescerar i gränsskiktet mellan luft och vätska.

Metylenblått är blå i sin oxiderade form och färglös i sin reducerade form. Metylenblått kan därför användas att följa syrekoncentrationen i en kultur. För att göra detta, kan man tillsätta 0.5 ml av en 0.01% vattenlösning av metylenblått till en 15 ml luminescerande bakteriekultur i en E-kolv eller stort provrör. Låt kolven/röret stå i ca 20 min eller tills luminescensen endast kan observeras vid ytan av vätskan. Notera att ljusproduktionen är begränsad till den blå syrenehållande zonen, medan där bakteriernas respiration har gjort slut på syret är metylenblå lösningen färglös.

3 Antimikrobiell påverkan

Släktet *Vibrio* består av gramnegativa bakterier och *P. phosphoreum* och *V. fischeri* är båda känsliga för flera antibiotiska preparat. Denna känslighet kan testas genom att placera papperslappar (t. ex. *Oxoid Multodiscs*), som har impregnerats med olika antibiotika, på ytan av plattor som strukits med bakterier. Mörka zoner omkring lapparna visar områden, där bakterier inte har vuxit.

4 Föroreningspåverkan

P. phosphoreum är mycket känslig för miljöföroreningar och används därför ofta för att upptäcka sådana. Man kan undersöka effekten av metalljoner på luminescensen. Metalljoner som är lämpliga är bl. a. bly (1 mg/l); koppar (1 mg/l); kobolt (3 mg/l) eller mangan (5 mg/l).

En spektakulär demonstration av kemiska preparat, t. ex. blekmedel, kan erhållas genom att tillsätta några droppar av detta till en kultur av luminescerande bakterier. Ljuset slocknar nästan omedelbart!

Isolering av luminiscenta bakterier från fisk eller bläckfisk

Fiskberikat medium

- Koka 250 g fiskkött i 1 l kranvatten.
- Tillsätt 30 g NaCl och sila buljongen.
- Tillsätt 10 g pepton, 10 ml glycerol och eventuellt 1 g jästextrakt.
- pH-värdet justeras till 7.
- Autoklavera vid 121 °C under 15 min.

För fast medium tillsätts 15–20 g agar per liter buljong.

Säkerhet

Flera *Vibrio*arter är patogena. Riskerna att oavsiktligt isolera patogena bakterier reduceras avsevärt om man använder 3% saltlösning och inkuberar fisken vid 15 °C eller under. Patogena bakterier som angriper människan, växer knappast under dessa förhållanden.

P. phosphoreum är en av de vanligaste organismerna på ruttnande torsk. Man känner inte till att den har orsakat någon skada, men det har rapporterats, att människor har blivit förvånade över att de sett lysande punkter på fisken i frysen.

En färsk saltvattensfisk eller bläckfisk placeras i en vanna med 3% NaCl-lösning. Låt saltlösningen täcka fisken till hälften. OBS! Det är viktigt att fisken inte varit fryst eller tvättad i sötvatten. Det är också bättre, men ej nödvändigt, om fisken ej legat på is.

Täck vinnan och förvara fisken ca ett dygn vid 12–15 °C i svalt utrymme. Om denna temperatur är svår att er hålla, kan man också placera fisken i ett kylskåp vid 4 °C under 48–72 h.

Efter inkubationen flyttas vinnan med fisken till ett mörklagt rum. Efter ca 5 min, när ögonen adapterats till mörker, syns lysande partier på fiskens hud. Använd en steril tandpetare eller en steril ympnål och överför de starkast lysande fläckarna till agarplattor med fiskberikat medium. Tips: En del personer tycker att det är bra att använda en 'mörkrumslampa' med rött ljus vid denna överföring. Vänd fisken bort ifrån lampan så att de lysande kolonierna är i skuggan och därför synliga.

Omympning av kulturerna till nya agarplattor behöver göras varannan dag om kulturerna hålls vid temperaturer omkring 12 °C och ca en gång i veckan vid temperatur omkring 4 °C. *P. phosphoreum* växer vid 4 °C, vilket inte är fallet med *V. fischeri*. Genom att göra utstryk från de mest lysande kolonierna på plattorna renodlas bakterierna successivt.



Företag som säljer olika bakteriekulturer

Frystorkade kulturer av *Photobacterium phosphoreum* kan köpas från t. ex. Culture Collection, University of Gothenburg, National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria (UK), eller German Collection of Microorganism and Cells. Tyvärr är priset relativt högt. Ett praktiskt kit för odling av *P. phosphoreum* finns att köpa hos Philip Harris Education i UK ('Bioluminescence kit', Kat. Nr. Ao2264); Carolina Biological i USA säljer kit för odling av *V. fischeri* ('Bioluminescent bacterium kit', Kat. Nr. BA-15-4750).

Referenser

- 1 Widder, E.A. (2001) Bioluminescens i haven. Varför producerar så många havsdjur ljus? *Bioscience Explained* 1 (1) <http://www.bioscience-explained.org/SE1.1>
- 2 US Naval Oceanographic Office. Bioluminescence Survey Systems <http://www.navo.navy.mil/biolum/blwebpge.htm>
- 3 Azur Environmental Toxicity Testing <http://www.azurenv.com>
- 4 Cambridge Research and Technology Transfer Limited <http://www.lumiweb.com>
- 5 *Topics in safety* (Third edition) (2001) Hatfield: Association for Science Education. ISBN: 0 863 57316 9.
- 6 Kita, A., Kasai, S. and Miki, K. (1995) Crystal structure determination of a flavoprotein FP390 from a luminescent bacterium, *Photobacterium phosphoreum*. *Journal of Biochemistry* (Tokyo) 117, 575.
- 7 Neelson, K.H., Platt, T. and Hastings, J.W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system. *Journal of Bacteriology* 104, 313–322.
- 8 Hastings, J.W. and Greenberg, E.P. (1999) Quorum sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. *Journal of Bacteriology* 181 (8) 2667–2668.
- 9 Slock, J. (1995) The *lux* system of bioluminescence, or, how to 'sense' your neighbor. *The American Biology Teacher* 57 (4) 222–224.
- 10 Bluth, B.J., Frew, S.E. and McNally, B. (1997) Cell-cell communication and the *lux* operon in *Vibrio fischeri* <http://www.bio.cmu.edu/courses/03441/TermPapers/97TermPapers/lux/default.html>
- 11 Slock, J. (1995) Transformation experiment using bioluminescence genes of *Vibrio fischeri*. *The American Biology Teacher* 57 (4) 225–227.
- 12 Arbetsmiljöverkets författningssamling (2000) *Innesluten användning av genetiskt modifierade organismer*. AFS 2000:5

Ytterligare läsning

- Turley, C.M. (1982) 'An illuminating demonstration of bacterial luminescence'. In *A sourcebook of experiments for the teaching of microbiology* (eds. Primrose, S.B. and Wardlaw, A.C.) pp. 11–15. London: Academic Press. ISBN: 0 12 565680 7. Denna bok är slut på forlaget, men en PDF fil av artikeln kan [laddas ner härifrån](#).
- Salmond, G.P.C. *et al* (1995) The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication. *Molecular Microbiology* 16 (4) 615–624.
- Losick, R. and Kaiser, D. (1997) Why and how bacteria communicate. *Scientific American* 276 (2) 68–73.

Webb sidor

Luxgene.com — Glow-in-the-dark organisms

<http://www.luxgene.com>

Luminescent bacteria

http://www.biology.pl/bakterie_sw/index_en.html

HBOI — More about bioluminescence

<http://www.biolum.org/>

Marine bioluminescence page

<http://lifesci.ucsb.edu/~biolum/>

Scripps bioluminescence page

http://siobiolum.ucsd.edu/Biolum_intro.html

Tackord

Vi vill tacka Pat C. Hickey, [Fungal Cell Biology Group](#) vid Edinburgh universitet för fotografiet på *Photobacterium phosphoreum*. Figur 5 ritades ursprungligen för *NCBE Newsletter* 1990 av Paul Stevens. John Richardson vid [Scottish Schools Equipment Research Centre](#) och John Grainger vid Reading universitet har varit till stor hjälp som rådgivare vid säkerhetsfrågor och frågor rörande isolering av bakteriekulturer. Vid Göteborgs universitet har Enevold Fahlsen också varit till stor hjälp rörande säkerhetsfrågor. Vi vill tacka dem alla.

[Society for General Microbiology](#) har vuanligen gett oss tillstånd att reproducera C.M. Turleys undervisningsartikel om bakterieluminescens, 1982 (se 'Ytterligare läsning').