

Bioluminiscencia bacteriana

**Ana Martín. Susana Serrano. Antonio Santos.
Domingo Marquina. Covadonga Vázquez.**

Departamento de Microbiología-III. Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Complutense de Madrid. c/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid
anamarti@bio.ucm.es suserra@bio.ucm.es ansantos@bio.ucm.es
dommarq@bio.ucm.es covi@bio.ucm.es

Resumen: La bioluminiscencia es la capacidad de emisión de luz que presentan ciertos organismos, una característica que también está presente en algunas bacterias. En este trabajo se explican las características bioquímicas, moleculares, ecológicas y las aplicaciones de la bioluminiscencia bacteriana. Esta información proporciona la base teórica para el desarrollo de una propuesta práctica que pone de manifiesto la capacidad de emisión de luz y su dependencia de factores como el oxígeno.

Palabras clave: Bioluminiscencia. Luciferasa. *Vibrio harveyi*. *Quorum sensing*. Genes *lux*.

INTRODUCCIÓN A LA BIOLUMINISCENCIA BACTERIANA

En los seres vivos, la emisión de luz puede ser de dos tipos; (i) **fotoluminiscencia** (**fosforescencia** y **fluorescencia**), debida a la presencia de moléculas **fotoexcitables** que absorben luz a una determinada longitud de onda y la emiten a una **longitud de onda** mayor ($h\nu'$) y (ii) la **quimioluminiscencia**, que en organismos vivos recibe el nombre de **bioluminiscencia**, en la que la energía química procedente de una reacción química **exergónica** se transforma en energía luminosa, por lo que no depende de la absorción previa de luz (Fig. 1).

Entre los microorganismos algunas bacterias, protistas (fundamentalmente dinoflagelados) y hongos son bioluminiscentes. Sin embargo este proceso no es exclusivo del mundo microbiano, también se presenta en ciertas plantas y animales.

Las enzimas que catalizan las reacciones de bioluminiscencia reciben el nombre genérico de **luciferasas**. Los sustratos de esta reacción se suelen denominar **luciferinas**. La estructura de ambos componentes y las características de la reacción son muy diferentes en los diversos sistemas biológicos, lo cual indicaría distintos orígenes evolutivos. La única característica común en todos los microorganismos/organismos que emiten luz es el requerimiento de oxígeno, requisito imprescindible en la reacción bioluminiscente.

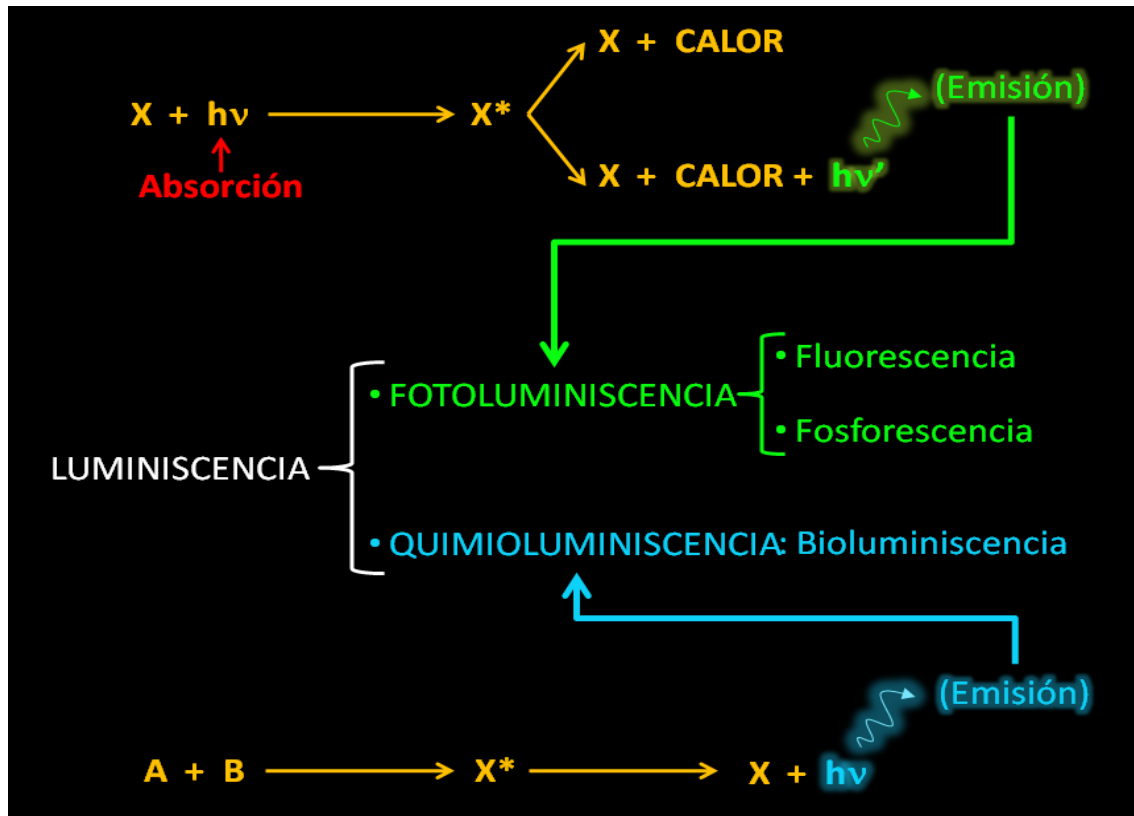


Figura 1. La emisión de luz o luminiscencia está relacionada con la existencia de dos tipos diferentes de procesos, fotoluminiscencia y quimioluminiscencia. En la fotoluminiscencia la emisión de luz ($h\nu'$) depende de la previa absorción de luz por especies químicas (X) y en la quimioluminiscencia la emisión depende de la existencia de una reacción química ($A + B$).

Bacterias bioluminiscentes. Diversidad y hábitats

Existe una gran diversidad de bacterias bioluminiscentes de ambientes marinos, la mayoría de las cuales son Gram-negativas, aunque también se han descrito algunas especies en medios edáficos y de agua dulce. Los géneros más representativos de bacterias bioluminiscentes marinas son *Vibrio*, *Photobacterium* y *Alteromonas*, siendo las especies más comunes; *V. harveyi*, *V. fischeri*, *P. phosphoreum*, *P. leiognathi* y *A. hanedai*. Todas ellas son quimioorganotrofas y aerobias facultativas y se encuentran ampliamente distribuidas, tanto en zonas costeras como en mar abierto. En estos hábitats marinos alcanzan densidades elevadas, que oscilan entre $1-6 \times 10^3$ células/mL.

Probablemente, todas las especies de vida libre son también saprófitas y viven sobre restos de animales marinos muertos, como peces, moluscos y crustáceos. También se han aislado una serie de especies parásitas de crustáceos y la especie patógena para el hombre, *V. vulnificus*, que puede infectar las heridas y causar una septicemia mortal en el 50% de los casos. Desde el punto de vista cuantitativo, los hábitats más importantes de las bacterias bioluminiscentes son el tracto digestivo de peces e invertebrados marinos, donde alcanzan poblaciones de hasta 5×10^7 células/mL.

Por último, algunas bacterias marinas bioluminiscentes (*V. fischeri*, *P. phosphoreum*, *P. leiognathi*) establecen simbiosis mutualistas con numerosos peces teleósteos, calamares y jibias que las almacenan en órganos especializados. En los órganos luminosos de peces, las bacterias tienen una localización extracelular y se encuentran empaquetadas en inclusiones tubulares, alcanzando poblaciones muy elevadas ($10^9 - 10^{10}$ bacterias /mL). En estas formaciones, la emisión de luz y el crecimiento bacteriano están controlados por el hospedador. Las únicas cepas bacterianas bioluminiscentes que han sido aisladas de agua dulce se han identificado como *Vibrio cholerae* biotipo *albensis*. Hasta el momento, no se ha encontrado ninguna especie bioluminiscente en el dominio *Archaea*.

Las especies terrestres bioluminiscentes están incluidas en los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* y muchas de ellas son endosimbiontes de nematodos heterorhabdítidos y patógenas de una gran variedad de insectos. Algunos nematodos entomopatógenos (Ej: *Steinernema carpocapsae*) mantienen asociaciones mutualistas con bacterias bioluminiscentes del género *Xenorhabdus*, que se localizan en una vesícula especializada del tracto digestivo del nematodo, esperando el momento en el cual estos parasiten un insecto. Los nematodos invaden el insecto a través de la boca, o de los espiráculos penetrando luego en la pared del intestino, donde se incorporan al hemocele creciendo rápidamente en la hemolinfa. Sin la asociación con las bacterias el nematodo no podría terminar su ciclo vital puesto que las bacterias contribuyen a la muerte del insecto mediante la síntesis de diversas toxinas y, además, permiten la asimilación de algunos nutrientes al liberar proteasas y lipasas extracelulares que destruyen los tejidos del cadáver. Por último, también inhiben el crecimiento de otras bacterias produciendo antibióticos (xenorabdicina).

Aspectos bioquímicos y moleculares

La reacción, catalizada por la luciferasa en bacterias, consiste en la oxidación por oxígeno molecular de un aldehído mirístico o tetradecanal (RCHO) y un flavín-mononucleótido reducido (FMNH₂), dando como resultado la emisión de luz de color verde-azulado, con un máximo de emisión *in vitro* a 490 nm (Fig. 2).

Esta reacción biológica supone un elevado gasto energético para la célula, que se obtiene a expensas de la respiración aerobia del microorganismo. Las luciferasas bacterianas son enzimas heterodiméricas (76-80 kDa), constituidas por dos subunidades: una pesada (α) y una ligera (β). Ambas subunidades son necesarias para la actividad catalítica. Acoplada a la reacción de emisión de luz catalizada por la luciferasa, se lleva a cabo una reacción de reciclaje del aldehído mirístico, catalizada con el complejo multienzimático ácido mirístico-reductasa (ácido graso reductasa). Los genes involucrados en la bioluminiscencia bacteriana se denominan genes *lux*, entre los cuales se encuentran los genes estructurales *luxICDABE(G)* que codifican para las proteínas que participan directa ó indirectamente en la reacción de emisión de luz: luciferasa y ácido mirístico reductasa, junto con genes reguladores de la transcripción y la biosíntesis de un autoinductor.

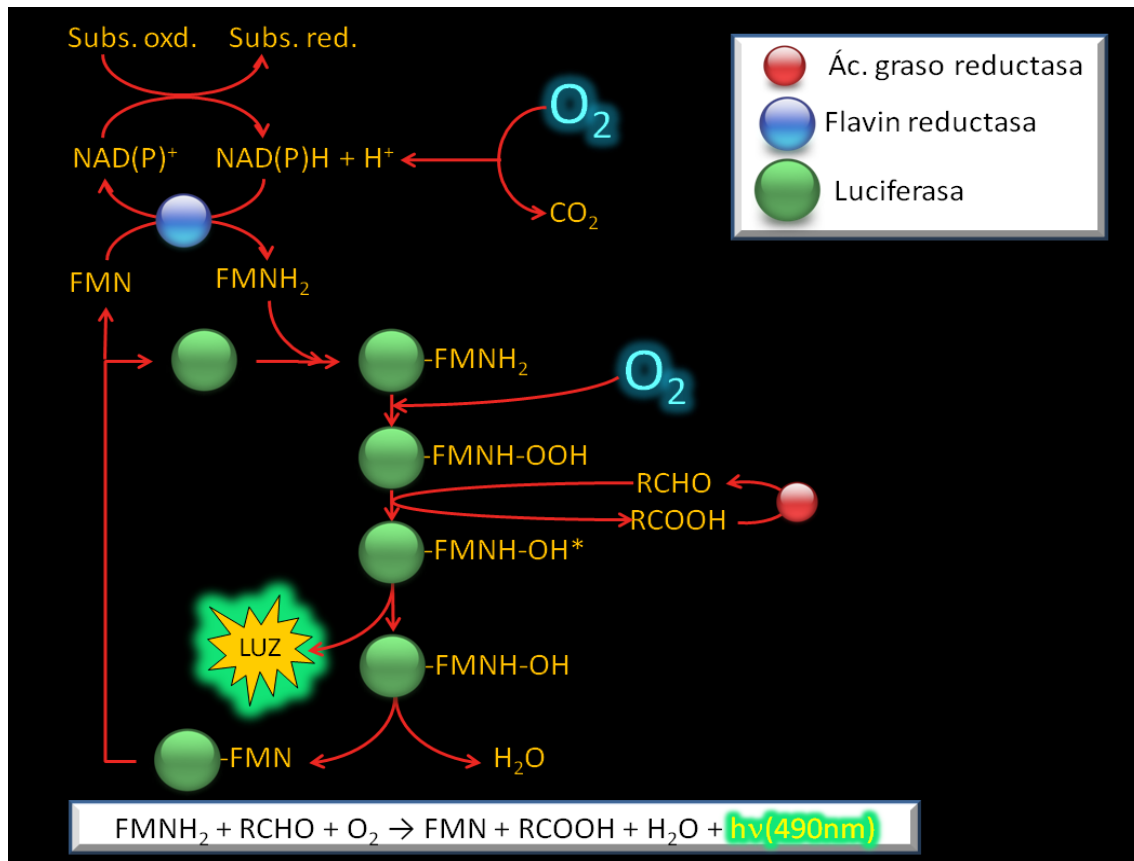


Figura 2. La emisión de luz dependiente de la enzima luciferasa está relacionada con la acción de dos enzimas diferentes además de la propia luciferasa. En la reacción bioluminiscente los sustratos se reciclan excepto el oxígeno que es consumido muy ávidamente.

Como todos los procesos microbianos que suponen un gasto energético celular notable, la emisión de luz presenta una compleja regulación a distintos niveles. En las bacterias bioluminiscentes marinas uno de los elementos cruciales en la regulación de la bioluminiscencia es la densidad celular. En las bacterias muchos procesos fisiológicos (bioluminiscencia, síntesis de factores de virulencia, conjugación, formación de biofilms, etc.) están regulados o controlados por un sistema que recibe el nombre de *quorum sensing* o percepción de quórum. Este fenómeno es el responsable de que un conjunto de células independientes, bajo la secreción de señales extracelulares, sean capaces de tener conocimiento de la densidad de la población celular de su entorno, desarrollando comportamientos coordinados. A las señales extracelulares se les denomina genéricamente *autoinductores*, siendo de naturaleza muy diversa.

El primer sistema biológico regulado por *quorum sensing* estudiado fue la bioluminiscencia de la bacteria *V. fischeri*, simbiote mutualista del calamar *Euprymna scolopes*. El sistema de *quorum sensing* de esta bacteria es el más sencillo descrito (Fig. 3) y con un único autoinductor, una *acil-homoserín-lactona* (Fig. 4). Cuando la densidad celular es baja, no se expresan los genes estructurales *lux* y no se produce la bioluminiscencia.

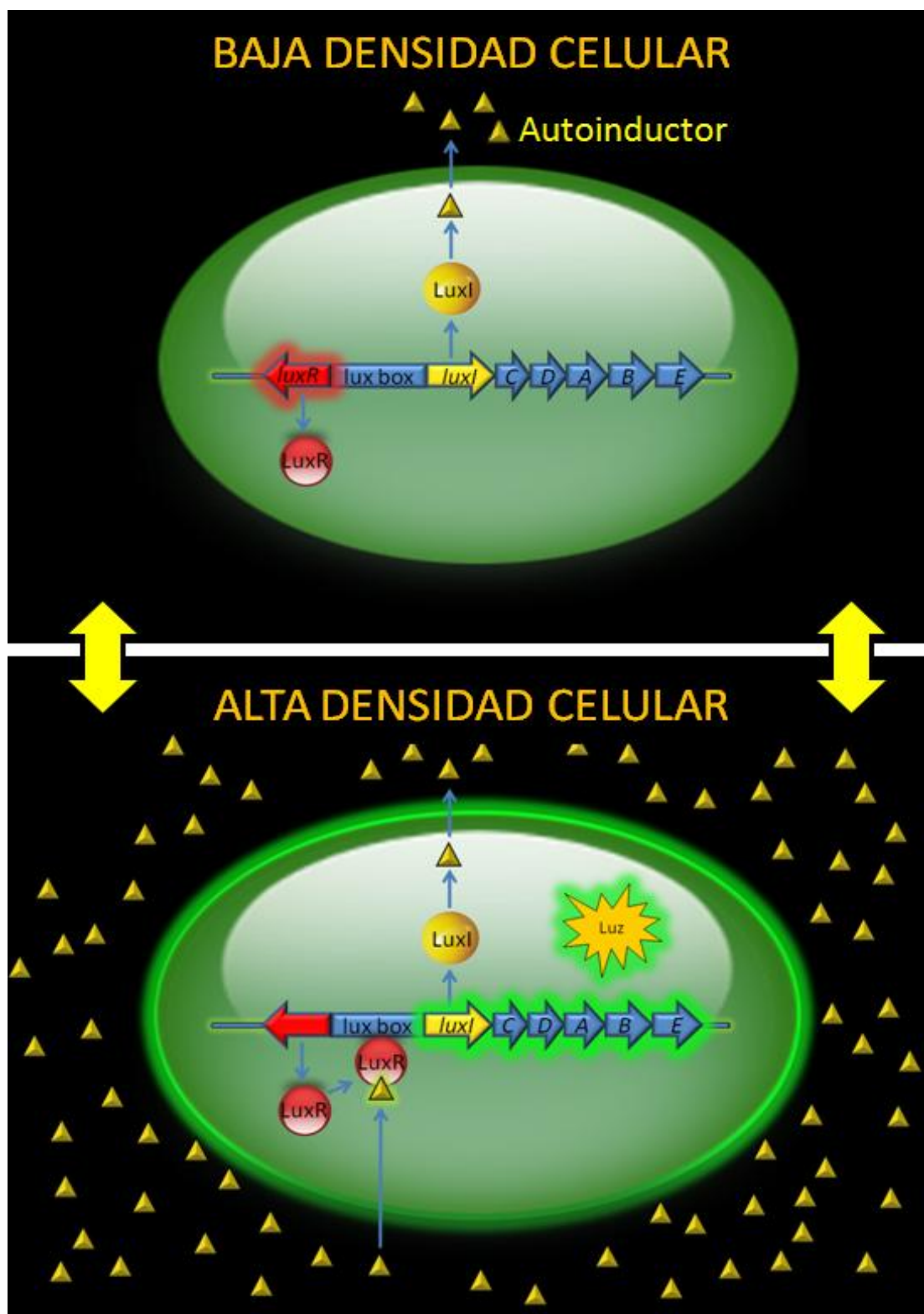


Figura 3. Control por *quorum sensing* de la bioluminiscencia en *V. fischeri*. Cuando la densidad celular es baja, la concentración de la molécula autoinductora, producto de la actividad sintetas de LuxI, es baja y los genes estructurales del operón *lux* no son transcritos. La existencia de una mayor densidad celular supone una mayor producción del autoinductor. Cuando la concentración alcanza un umbral, la molécula autoinductora se une a su receptor intracelular (LuxR), activándolo. El receptor activado se une al promotor (caja *lux*) y se activa la transcripción de los genes del operón *lux*, propiciándose la producción de luz.

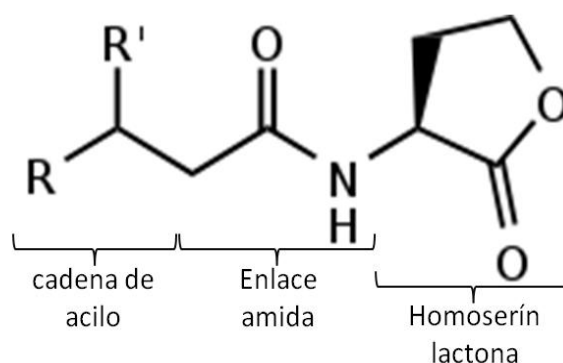


Figura 4. Estructura general de las acil-homoserín-lactonas la molécula autoinductora característica de las bacterias gran negativas. Están compuestas por una cadena de acilo de 4 a 14 átomos de carbono unida por enlace amida a una homoserín lactona. En el tercer carbono de la cadena acilo puede haber un grupo ceto o un grupo hidroxilo.

El sistema está regulado por el operón *luxI/luxR*, que de forma constitutiva expresa niveles basales de la proteína LuxI (que cataliza la síntesis del autoinductor) y la proteína receptora del mismo Lux R (Fig. 3). Cuando la concentración de la bacteria es muy baja la molécula autoinductora se produce en muy baja concentración y es secretada por difusión al medio extracelular donde se acumula. En estas condiciones, la bacteria no produce luz. Cuando los microorganismos se reproducen y alcanzan valores de 10^{10} - 10^{11} células/ml, la concentración de autoinductor esta entorno a 1-10nM. En esas circunstancias el autoinductor entra al interior de la célula, también por difusión y se une a su proteína receptora LuxR, momento en el que se induce la expresión del operón *luxI/luxR* sintetizándose la proteína receptora LuxR y la sintetasa del autoinductor LuxI, produciéndose una autoinducción del sistema. La unión del autoinductor a su proteína receptora LuxR induce también la expresión del operón luciferasa *luxCDABE*, con la correspondiente producción de bioluminiscencia (Fuqua y Greenberg, 2006).

En la especie marina de vida libre *Vibrio harveyi*, ocasionalmente patógena, los mecanismos que regulan la emisión de luz son mas complejos y todavía no están completamente dilucidados. Esta especie posee tres sistemas distintos de *quorum sensing*, cada uno con su inductor correspondiente (CAI-1, HAI-1 y AI-2). A diferencia de *V. fischeri*, en la especie *V. harveyi*, la detección de autoinductores no ocurre directamente mediante proteínas de tipo LuxR, sino a través de [histidín-quinasa](#)s unidas a membrana (sistemas de transducción de señales de dos componentes), que actúan como receptores específicos (CqsS, Lux N y Lux PQ). Estos receptores son enzimas [bifuncionales](#), con actividades [quinasa](#) y [fosfatasa](#), cuando la concentración celular es baja estas proteínas no interaccionan con sus respectivos [ligandos](#) y actúan como [quinasa](#)s, fosforilándose. Posteriormente, los grupos fosfato son transferidos a la proteína [fosfotransferasa](#) Lux U, que los transfiere a la proteína reguladora Lux O. En estas condiciones Lux R no se forma y por tanto, no hay emisión de luz. Cuando se alcanza una elevada concentración celular, la concentración extracelular de los tres autoinductores aumenta e interaccionan con su receptor [periplasmático](#) específico. En estas condiciones se expresa la actividad [fosfatasa](#) y Lux O no se fosforila. Como consecuencia, se forma la proteína activadora Lux R y tiene lugar la emisión de luz (Fig. 5).

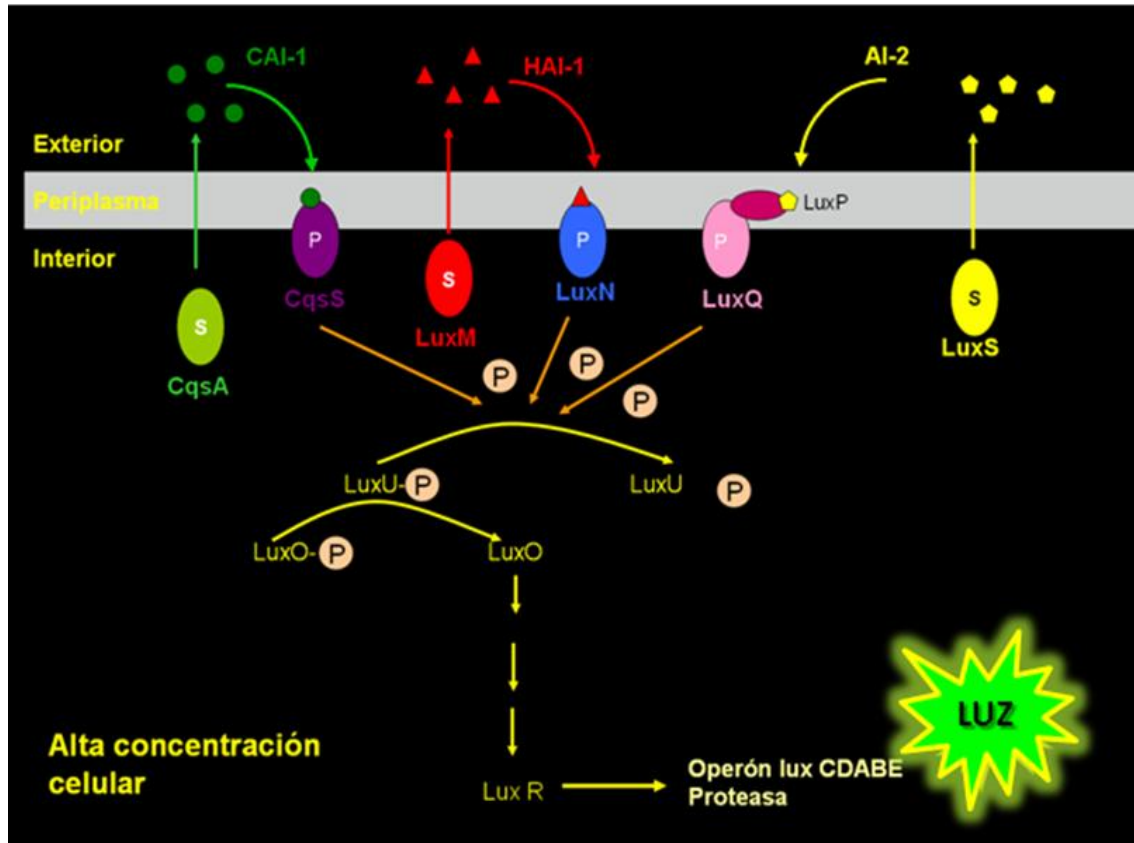


Figura 5. Circuito de control por *quorum sensing* de la bioluminiscencia de *Vibrio harveyi*. Cuando la densidad celular es baja la concentración de las moléculas autoinductoras sintetizadas por las proteínas CqsA, LuxM y LuxS es pequeña y los genes estructurales del operón lux no se transcriben. La existencia de una mayor densidad celular supone una mayor producción de los autoinductores que activan una cascada de transducción de señales mediada por las proteínas LuxU, LuxO y LuxR. El sistema una vez activado promueve la transcripción de los genes del operón lux, propiciándose la producción de luz.

Función ecológica y aplicaciones

Algunas bacterias bioluminiscentes establecen simbiosis con organismos marinos: las bacterias se alojan en el interior de los órganos especializados en los que tienen una fuente abundante de nutrientes y un **nicho ecológico** protegido, mientras que el hospedador adquiere la capacidad de emitir luz, lo que puede ser utilizado en la **comunicación intraespecífica**, la defensa frente a los depredadores o la atracción de presas, entre otros. En ciertas asociaciones muy específicas, como la de *Vibrio fischeri* con la sepia *Euprymna scolopes*, la simbiosis juega un importante papel en la abundancia y distribución de esta bacteria marina. La bioluminiscencia de la bacteria se lleva a cabo en las criptas del órgano luminoso del calamar, órgano situado junto a los sacos de tinta en el interior de la cavidad del manto. El órgano luminoso presenta unas estructuras especializadas (apéndices ciliados) encargadas de establecer una selección de las bacterias que colonizarán el órgano luminoso. Exclusivamente *V. fischeri* coloniza de forma efectiva las criptas del órgano luminoso, lugar en el que la concentración celular alcanza valores suficientemente elevados para activar los procesos de *quorum sensing* que desencadenarán la bioluminiscencia (Nyholm y McFall-Ngai, 2004). En otros casos la

función ecológica de la bioluminiscencia en relación con la supervivencia y fisiología bacteriana todavía no se ha determinado.

Si consideramos que la emisión de luz es un proceso dependiente de una elevada concentración celular, es decir, implica *quorum sensing*, parece lógico suponer que las bacterias no son bioluminiscentes en condiciones de vida libre ya que en este caso no podría acumularse el autoinductor. Sin embargo, desde 1915 existen numerosos datos bien documentados en los que se habla de la aparición de masas bioluminiscentes en zonas costeras. Este fenómeno, denominado “milky sea”, ya aparece bien descrito en el famoso texto de Julio Verne, *Veinte mil leguas de viaje submarino*, publicado en 1870. Las recientes observaciones por satélite de estas formaciones efímeras tan sorprendentes, parecen confirmar la hipótesis más aceptada sobre la naturaleza de este fenómeno. Los datos indican que podría tratarse de afloramientos de la microalga *Phaeocystis sp.* en cuyo interior, asociadas al estado colonial, se encontrarían bacterias bioluminiscentes como *V. harveyi* o similares. De esta manera, se establecerían las condiciones necesarias para la acumulación de autoinductor/-res y por tanto, para la emisión de luz (Fig. 6).

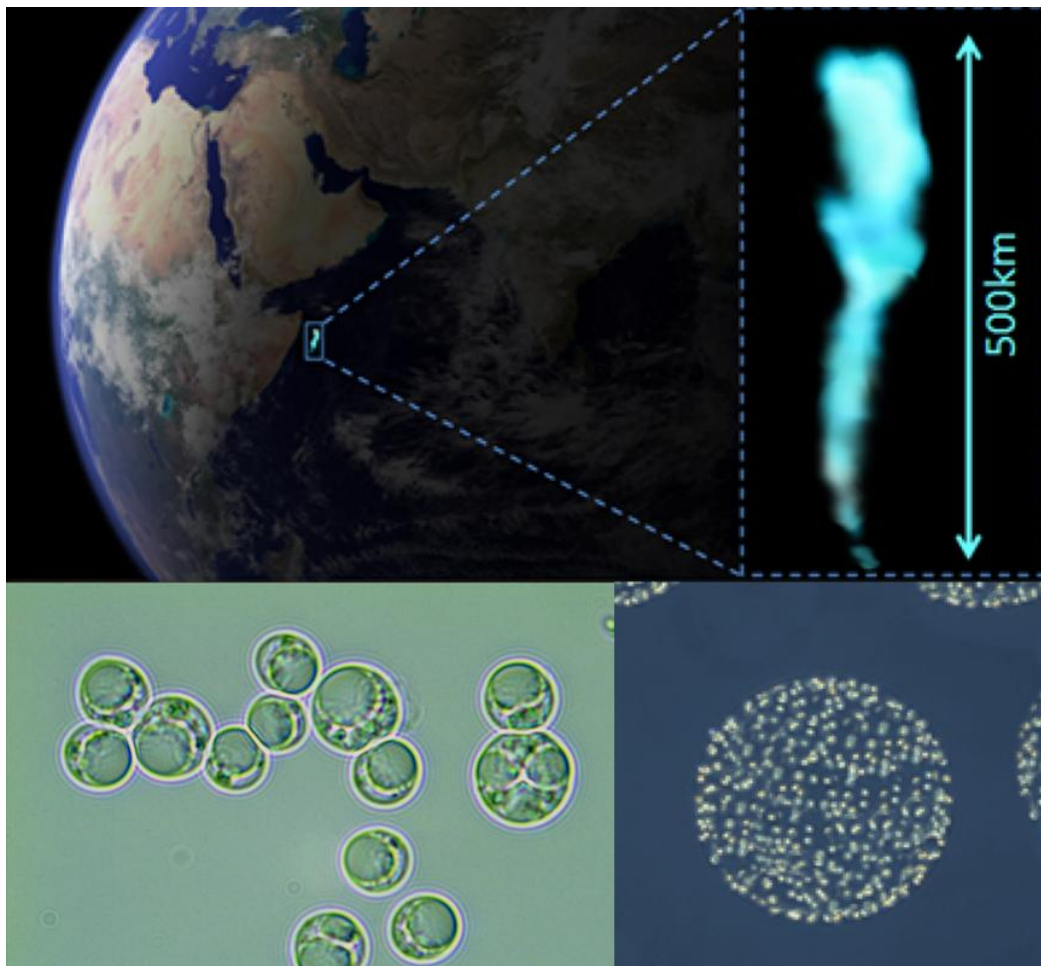


Figura 6. El fenómeno de bioluminiscencia a gran escala denominado “milky sea”. A vista de satélite (*Defense Meteorological Satellite Program*) se puede observar este fenómeno en una región del océano Índico frente a las costas de Somalia. En la parte inferior se pueden observar células del microalga *Phaeocystis* en su estado unicelular (izquierda) y colonial (derecha). Imágenes de colonias de *Phaeocystis* por cortesía de R. Andersen.

La bioluminiscencia bacteriana presenta un gran número de aplicaciones analíticas, clínicas y biológicas. Una de las principales aplicaciones es la detección y evaluación de contaminantes ambientales. Se pueden utilizar bacterias bioluminiscentes marinas o bien, células recombinantes en las cuales se han introducido genes *lux*. Existen sistemas comerciales validados, como [Microtox](#), que determinan, de manera rápida y eficaz, la presencia de diversos contaminantes ambientales (metales, detergentes, pesticidas, [PCBs](#), [PAHs](#), etc) en muestras de agua. Estos sistemas se basan en cuantificar la disminución de la emisión de luz de una cepa de *Vibrio fischeri*, causada por el contaminante. El sistema Microtox y sus modificaciones para detectar tóxicos en ambientes terrestres o compuestos [genotóxicos](#) (Mutatox, [Microtox-solid phase](#), [Deltatox](#), etc.) son métodos estándar, aceptados por importantes agencias de protección ambiental (USA, UE). A partir de este sistema se han desarrollado múltiples [biosensores](#) celulares, que utilizan levaduras, células de mamífero o distintas especies bacterianas (*Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, etc) para determinar toda una gama de compuestos. Por otra parte, los genes *lux* (*AB* ó *CDABE*) se han utilizado como [reporteros](#) en diversas construcciones diseñadas para una amplia gama de objetivos como [inmunoensayos](#), detección de virus, control de procesos biotecnológicos, procesos de [biorremediación](#), valoración de expresión de promotores, dispersión y colonización de bacterias patógenas en sus hospedadores, etc.

OBJETIVOS

Cultivo en medio sólido y líquido de la bacteria marina *Vibrio harveyi* y observación de la bioluminiscencia. Variación de las condiciones de cultivo para comprobar la dependencia de la emisión de luz del oxígeno y de una elevada concentración celular.

Material necesario

2 erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio líquido Sea Water, 2 tubos de ensayo con 10 mL de medio Sea Water, 2 placas de Petri con medio sólido Sea Water, jarra de anaerobios, 1 cultivo sólido de la bacteria bioluminiscente *Vibrio harveyi*, papel de aluminio.

Composición del medio líquido Sea Water

Proteosa peptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Solución de agua de mar	750 mL
Agua destilada	250 mL

Para el medio sólido se añaden al medio líquido 15 g de agar.



Figura 7. Fotografías ilustrativas del proceso para la siembra de *Vibrio harveyi* en medio Sea Water e incubación de los tubos con Sea Water en jarra de anaerobios.

Procedimiento

• Primer día

Realizar las siguientes siembras en medio Sea Water (Fig.8) a partir de cultivos líquidos de *V. harveyi* de 24 horas:

1. Sembrar 1 ml de inóculo en un tubo de ensayo y dos matraces erlenmeyer con medio líquido. Incubar el tubo en una jarra de anaerobios. Uno de los matraces se incuba en agitación.
2. Sembrar en superficie con hisopo 2 placas de Petri con Sea Water sólido. Envolver una de las placas con papel de aluminio.
3. Incubar 24-48 horas a 20°C.

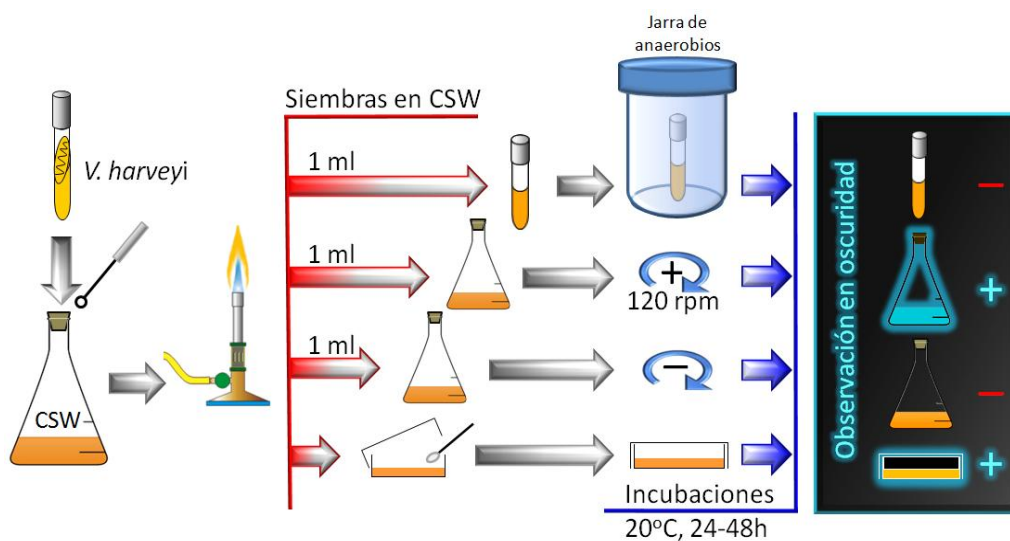


Figura 8. Esquema general del desarrollo de la práctica para la observación de la bioluminiscencia.

- Segundo día

4. Recoger los cultivos de la cámara de incubación y comprobar el crecimiento.
5. Llevar los cultivos realizados en medio líquido a una cámara oscura, esperar unos 20 segundos para acomodar la vista.
6. Agitar el tubo incubado en condiciones de anaerobiosis y comprobar que el cultivo no emite luz. Estos resultados negativos indican la dependencia de oxígeno que presenta la bioluminiscencia bacteriana.
7. Observar los dos erlenmeyer sembrados el día anterior, la intensidad de la bioluminiscencia será muy notable en el cultivo en agitación mientras que la intensidad de la luz emitida por el no agitado será mucho menor. La intensidad de luz aumenta si se agitan manualmente los matraces y disminuye progresivamente cuando estos se dejan en reposo. Esto también pone de manifiesto que la reacción catalizada por la luciferasa depende de la presencia de oxígeno.
8. Se observará el crecimiento y la emisión de una luz intensa en los cultivos desarrollados en placa Petri e incubados en oscuridad (tapado con papel de aluminio y sin tapar). De estos resultados se concluye que la emisión de luz se debe a un fenómeno de bioluminiscencia y no de fosforescencia (Fig.9).



Figura 9. Observación de la bioluminiscencia en cultivos de *Vibrio harveyi* en erlenmeyer y en placa Petri. La bioluminiscencia de los cultivos en presencia de una mayor tensión de oxígeno (arriba izquierda) es mayor que en los incubados en estático (arriba derecha). La bioluminiscencia se observa por igual en las placas Petri tapadas con papel de aluminio y sin tapar (abajo derecha e izquierda).

BIBLIOGRAFÍA

- Fuqua, C. y Greenberg, E.P. 2006. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 3: 685-695.
- Nyholm, S. V. y McFall-Ngai, M. J. 2004. The Winnowing: Establishing the Squid–*Vibrio* Symbiosis. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 632-42.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

- Haddock, S.H.D.; Moline, M.A. y Case, J.F. 2010. Bioluminescence in the sea. *Annual Review of Marine Science*, 2: 443-493.
- Henke, J.M. y Bassler, B. L. 2004. The parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 186: 6902-6914.
- Meighen, E.A. 1993. Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the *lux* genes. *FASEB Journal*, 7: 1016-1022.
- Nealson, K.H. y Hastings, J.W. 2006. Quorum sensing on a global scale: massive numbers of bioluminescent bacteria make milky seas. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2295-2297.
- Ng, W.L. y Bassler B. L. 2009. Quorum-sensing network architectures. *Annual Review Genetics*, 43: 197-222.
- Roza, A.; Pasini, P.; Mirasoli, M.; Michelini, E. y Guardigli, M. 2004. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends in Biotechnology*, 22: 295-303.
- Wilson, T. y Hastings, J.W. 1998. Bioluminescence. *Annual Review Cell and Developmental Biology*, 14: 197-230.

Recibido: 7 junio 2010.

Aceptado: 14 noviembre 2010.