

Granice życia?

Cz. I. Skrajne temperatury

Na ziemi życie płeni się wszędzie. Nawet tam gdzie jest najmniej oczekiwane. Miejsca, które niedawno wydawały się przysłowiową pustynią tętnią życiem. Tyle tylko, że jest ono niedostrzegalne nieuzbrojonym okiem. Przedstawiamy Państwu pierwszy z cyklu dwóch artykułów traktujący o mikroorganizmach, które upodobały sobie szczególne środowiska życia.

■ MAGDALENA ŻMUDA

W ciągu ostatniego wieku ludzie z zadziwieniem odkryli, iż granice życia znacznie przekraczają warunki komfortowe wyłącznie dla ich własnej egzystencji. Ekstremofile można zdefiniować (dosyć antropomorficznym terminem) jako organizmy żyjące w skrajnych warunkach środowiskowych, ale skrajnych dla człowieka, a nie dla nich samych. I tak, np. bakterie psychrofilne (których optimum wzrostu jest poniżej 15°C) umieszczone w temperaturze 36°C – zginą, podczas gdy życie w 4°C nie jest dla nich niczym ekstremalnym.

Pierwsze doniesienia o ekstremofilach dotyczyły badań różnorodności biologicznej w skrajnych środowiskach przy użyciu prostych mikroskopów. Umożliwiało to jedynie analizowanie morfologii komórek tych organizmów. Dzisiejsze złożone narzędzia molekularne pozwalają poznać bioróżnorodność znacznie precyzyjniej i szerzej. Prace badawcze nad ekstremofilami mają znaczenie zarówno dla zrozumienia procesów ewolucji, jak i opracowania modeli odtwarzających wczesne życie na Ziemi. Stały się też podstawą nowej dziedziny nauki – astrobiologii – badającej potencjalną możliwość życia pozaziemskiego. Badania nad organizmami środowisk skrajnych mogą również mieć swoje komercyjne zastosowanie.

Biotechnologia umożliwia użycie enzymów ekstremofili między innymi w: procesach produkcji leków, kosmetyków, w przemyśle spożywczym, w detergentach do prania, czy też w biologii molekularnej.

Życie na Ziemi oparte jest głównie na związkach węgla. Na każdy żywy organizm w ekosystemie wpływają nieustannie biotyczne i abiotyczne czynniki środowiskowe. Ograniczenie występowania form życia jest więc przede wszystkim związane z działaniem czynników umożliwiających utrzymanie właściwych cech chemicznych związków węgla. Przykładowe ekstremalne czynniki biotyczne wpływające na organizmy to przegęszczenie populacji czy obecność pasożytów. Przyjęło się jednak rozpatrywać pojęcia „ekstremalności” bardziej pod kątem czynników abiotycznych, choć i jedno i drugie mają duże znaczenie dla życia organizmów.

Do czynników abiotycznych mających istotny wpływ na występowanie życia w danej niszy należą: temperatura, stężenie jonów wodorowych (pH), dostępność wody, ciśnienie osmotyczne i hydrostatyczne, natężenie światła, promieniowanie, potencjał oksydoredukcyjny oraz obecność toksycznych związków takich jak np. jony metali ciężkich. Środowiska, w których wymienione powyżej czynniki występują w skrajnym natężeniu, nie

są sprzyjające do życia dla większości organizmów. Stąd też powstała nazwa: środowiska skrajne lub ekstremalne.

Ekstremofile wyspecjalizowały się do życia w warunkach środowiskowych niegościennych dla większości organizmów. W miejscach, w których zdawałoby się, że nic już nie ma prawa istnieć – rozwija się życie. Pojawia się pytanie o granicę życia. Gdzie ona jest? Ile czynników środowiskowych musi równocześnie oddziaływać, aby limitować ostatecznie rozwój życia w danej niszy ekologicznej. Prawdopodobnie nadal nie wszystkie miejsca istnienia życia na Ziemi są poznane. Pytanie staje się także istotne, jeśli poważnie chcemy rozważyć potencjalną możliwość istnienia form życia także na innych planetach. Ale może takie dociekania zostawmy astrobiologom, póki życie na innych planetach jest rozważane jako „nie-wykluczone”.

Jakie są typy ekstremofili? Rodzaje ekstremofili są wyróżnione zależnie od czynników działających w środowisku (porównaj Tab. 1).

Tabela 1. Miejsca występowanie przykładowych szczepów psychrofilii (wg Nichols i wsp., 1999)

Mikroorganizm	Miejsce izolacji
<i>Shewanella pealeana</i>	kałamarnica
<i>Glacieola punicea</i>	lód morski
<i>Antarctobacter heliothermus</i>	wysoko zasolone jezioro antarktyczne
<i>Pseudoalteromonas antarctica</i>	woda morsa
<i>Shewanella violacea</i>	głębiny morskie
<i>S. amazonensis</i>	osady morskie
<i>S. baltica</i>	woda morsa skażona ropą naftową
<i>S. frigidimarina</i>	antarktyczny lód morski
<i>Octadecobacter antarcticus</i>	lód morski/woda morsa
<i>Flavobacterium hibernum</i>	jezioro słodkowodne
<i>Cryobacterium psychrophilum</i>	osady dennie ze stawu
<i>Hymenobacter roseosalivarius</i>	piaskowiec, gleba

I tak: □ wysoka i niska temperatura – definiuje odpowiednio **termofile i psychrofile**, □ wysokie i niskie stężenie jonów wodorowych (pH) definiuje **alkalofile i acydofile**, □ wysokie stężenie soli – **halofile**, □ wysokie ciśnienie hydrostatyczne – **piesofile** (dawniej barofile), □ wysoka dawka jednorazowa promieniowania – **radiofile**, □ wysokie stężenie metali ciężkich – **metalofile** i □ wysokie wysuszenie – **kserofile**.

W literaturze fachowej istnieje również pojęcie **poliekstremofili** – czyli ekstermofili, które przeżywają w warunkach działania wielu skrajnych czynników (np. organizmy żyjące wewnątrz skał w głębi skorupy ziemskiej są zarówno termofilami, jak i piesofilami).

Dyskusyjne jest dołączanie do ekstermofili organizmów beztlenowych, tlenowych, mikroaerofilnych. Przy takim podejściu do tematu człowiek jest również ekstermofilem – gdyż potrafi żyć w powietrzu zawierającym 21% tlenu. Tlen, szczególnie jego wolne rodniki, mają niszczący wpływ na białka czy DNA.

Ekstremofile są jednak głównie organizmami jednokomórkowymi. Do różnorodnych warunków środowiskowych, jakie występują na naszej planecie najbardziej są przystosowane mikroorganizmy prokariotyczne. Pojęcie ekstermofili nie jest terminem jednorodnym taksonomicznie. Choć wszystkie hipertermofile należą do Archea i Bakterii, również Eukarya występują pomiędzy psychrofilami, acidofilami, alkalofilami, piezofilami, kserofilami i halofilami.

W niniejszym artykule przypatrzymy się wpływowi podstawowych czynników abiotycznych na komórki żywe i jak mikroorganizmy ekstremalne potrafią poradzić sobie z tymi skrajnościami.

Pierwsza część będzie dotyczyć wpływu temperatury i wysuszenia.

Temperatura

Temperatura jest jednym z krytycznych czynników środowiskowych regulujących bioróżnorodność i ewolucję na Ziemi. Większość organizmów żyje w przedziale od 20°C do 40°C. Mikroorganizmy mogą żyć i rozmnażać się prawie w całym zakresie temperatur, w którym woda występuje jeszcze w stanie płynnym. Zakres ten bardzo się rozszerza przy dużym zasoleniu środowiska i wysokim ciśnieniu. Temperatura reguluje metabolizm komórek żywych i decyduje o szybkości reakcji chemicznych w nich zachodzących. Oddziałuje m.in. na strukturę przestrzenną cząsteczek białek czy kwasów nukleinowych, która jest utrzymywana dzięki wiązaniami wodorowym. Wiązania te powstają w stosunko-

wo niskiej temperaturze, a są zrywane w wysokich temperaturach. Utrata konformacji jest równoznaczna z utratą funkcji w komórce. Temperatury powyżej 100°C w normalnych warunkach denaturują białka i kwasy nukleinowe, zwiększają do poziomu letalnego upłynnienie błon. Niskie temperatury usztywniają błony komórkowe, wpływają na ich zwartość i kruchość. Jeśli wewnątrz komórek powstaną kryształy lodu, następuje rozrywanie komórki. Komórki z uszkodzonymi błonami tracą swój pierwotny kształt, zmieniają swoją objętość i ładunek powierzchniowy w konsekwencji wypływu lub gromadzenia się jonów albo innych cząstek w jej wnętrzu.

Psychrofile

Jeśli przyjrzymy się naszej planecie pod względem panujących tu temperatur okaże się, że aż 75% biosfery zajmują środowiska, w których temperatury nie przekraczają 5°C. W większości z tych miejsc występują mikroorganizmy „zimnolubne”. Środowiska ich występowania obejmują zarówno wody morskich polarynych, jak i głębokie osady morskie (z temperaturami od -1°C do 4°C), lód morski (z wewnętrznymi solankami, które pozostają ciekłe do temperatury -35°C) i gleby polarne, wieczną zmarzlinę, lodowce, czy wysokie pasma górskie. Ważne jest tutaj wyróżnienie dwóch rodzajów zimnych środowisk – jednych, stale narażonych na niskie temperatury, gdzie mikroorganizmy muszą być przystosowane do zimna i drugich, gdzie poddawane są tylko okresowo presji zimna (podczas zimy) – te mogą tylko tolerować zimno.

Większość mikroorganizmów izolowanych z zimnych środowisk to psychrofile albo psychrotrofy (psychrotoleranty). **Psychrofile są lepiej zaadaptowane do stabilnych niskich temperatur.** Najszybciej wyrastają w temperaturze poniżej 15°C, ale nie są zdolne do wzrostu w temperaturach powyżej 20°C. Zaś minimalna temperatura, przy której wyrosną jest poniżej 0°C. **Psychrotrofy to mikroorganizmy, które wyrastają w 0°C, ale szybciej namnażają się w 20°C.** Żyją w mniej stabilnych temperaturowo środowiskach, któ-

re mogą np. zamarzać i odmarzać nawet w cyklu dobowym (jak np. w glebach antarktycznych w ciągu lata).

Już prawie sto lat temu norweski naukowiec i badacz polarny Fridtjof Nansen dryfując po Oceanie Arktycznym na statku „Fram” obserwując psychrofilne glony wewnątrz paku lodowego pisał: „**Matka ziemia ma zadziwiającą zdolność do tworzenia życia wszędzie. Również lód jest dla niej żyzną glebą**”. Czy tak jest rzeczywiście? Przypatrzmy się bliżej tym zimnolubnym mikroorganizmom.

Potwierdzona minimalna temperatura, w której udało się wykryć aktywność metaboliczną bakterii (metodą radioizotopową) to -39°C. Doniesienie to dotyczyło eksperymentów z próbami gleby pochodzącymi z Arktyki, w której takie temperatury występują. Nie do końca potwierdzone badania wzmiankują o aktywności bakterii nawet w temperaturach -43°C i poniżej -80°C! Naukowcy pracujący z psychrofilami dyskutują nad pojęciem aktywności tych mikroorganizmów uwięzionych w wiecznej zmarzlinie czy lodzie. Komórki, które są izolowane mogą mieć ponad 1000 lat? Otwarte jest pytanie jak określić ich aktywność? Czy będzie to czas między podziałami komórek? Czy też czas wymiany pierwiastków w komórkach?

Psychrofile, cechuje znaczna różnorodność, zarówno gatunkowa, jak i różnorodność strategii życiowych. Wśród nich są zarówno bakterie, sinice, jak i archeowce. Dziennie jest odkrywanych średnio około 30 nowych gatunków samych bakterii antarktycznych, niespotykanych nigdzie indziej na świecie. Psychrofile to ważny składnik biomasy zimnych regionów świata. Stanowią główne ogniwo łańcucha pokarmowego, odpowiadają za produkcję pierwotną, krążenie pierwiastków biogenych, kontrolują wiele procesów geobiologicznych, degradują materię organiczną oraz mineralizują zanieczyszczenia.

Psychrofile są głównie heterotrofami, choć autotrofy w środowiskach zimnych też są spotykane. Psychrofilne bakterie wykazują znacznie większą liczebność i różnorodność niż Archea. Jedynie w głębokich wodach oceanu liczebność archeowców jest większa.

Przykładowym „zimnolubnym” heterotrofem może być *Desulfotalea psychrophila* wyizolowana z zimnych osadów arktycznych. Jest to bakteria redukująca siarczany. Choć jest zdolna do życia w temperaturach poniżej 0°C, swój optymalny wzrost wykazuje w 10°C. Bakteria ta odgrywa rolę w globalnym krążeniu węgla i siarki. Innym przykładem jest gatunek *Psychrobacter* izolowany zarówno z gleb polarnych, lodu, płytkich i głębokich osadów Arktyki jak i Antarktyki. Przykładowo *Psychrobacter cryohalolentis* i *P. arcticus* były izolowane z prób syberyjskiej wiecznej zmarzliny. Innymi przykładowymi zimnolubnymi heterotrofami są: fermentująca bakteria *Marinilactibacillus psychrotolerans*, występująca zarówno na żywych, jak i martwych organizmach morskich. Zaś ze ściśle oligotroficznego, stale przykrytego lodem jeziora Vanda, wyizolowano *Carnobacterium alterfundicum* – bakterię redukującą mangan.

Przykładowe gatunki Archea, wyizolowane ze słonej, nasyconej metanem, nienatlenionej wody o temperaturze 1–2°C to mikroorganizmy metanogenne: *Methanococcoides burtonii* ($T_{\min.}$ –2,5°C; $T_{\text{opt.}}$ 23°C) i *Methanogenium frigidum* ($T_{\min.}$ –10°C; $T_{\text{opt.}}$ 15°C). Oba gatunki mają różne szlaki metaboliczne: *Methanococcoides burtonii* utylizuje metyloaminy, zaś *Methanogenium frigidum* wykorzystuje wodór cząsteczkowy i dwutlenek węgla. Wśród psychrofilnych Archea są również organizmy symbiotyczne takie, jak np. *Cenarchaeum symbiosum* – wyizolowany z oceanicznych wód wybrzeża kalifornijskiego, ściśły symbiont gąbki.

Jednymi z najlepiej poznanych psychrofilii jest glon rosnący w gęstej masie w/na lodzie i śniegu w rejonach polarnych i wysokich górach. Ten psychrofilny glon *Chlamydomonas nivalis* – nadaje zielony lub czerwony intensywny kolor powierzchni śniegu. Zielony kolor pochodzi od ubarwionych na zielono komórek wegetatywnych, a czerwony kolor od jego intensywnie zabarwionych spor.

Pośród innych zimnolubnych autotroficznych mikroorganizmów stref polarnych występują m.in. hipolity, organizmy fotosyntetyzujące żyjące pod skałami (na ich spodnich

powierzchniach). Są to sinice i glony kolonizujące spodnią stronę kamieni na zimnych pustyniach Arktyki i Antarktyki. Hipolity są narażane na bardzo niskie temperatury (do –30°C), muszą sobie też radzić z niskim natężeniem światła i niewielką wilgotnością. Zamarzanie i rozmarzanie gruntu powoduje przemieszczanie się kamieni i skał (grunty strukturalne), które są siedliskiem ich życia. Dzięki temu te jednokomórkowe glony i sinice uzyskują dostęp do światła.

Innymi ciekawymi mikroorganizmami psychrofilnymi są **endolity** żyjące wewnątrz skały, w jej porach lub w szczelinach między ziarnami minerałów tworzących skałę. Wyizolowano je z miejsc, które pierwotnie uznano za jałowe m.in. z Suchych Dolin na kontynencie Antarktydy. Suche Doliny to jedno z wielu miejsc na kontynencie nie pokryte lodem i śniegiem. Warunki panujące tu zimą to ciągła ciemność, temperatura –60°C i wysuszający wiatr wiejący ponad 100 km/godzinę. Średnie dzienne temperatury powietrza latem wahają się od –35°C do +3°C z różnicami dobowymi nawet do 15°C. Pełne nasłonecznienie w ciągu całego dnia powoduje rozgrzanie skał nawet do temperatury 10°C wyższej niż temperatur otoczenia. W tak surowych warunkach można znaleźć 2 wyraźne zespoły mikroorganizmów – związane z producentami pierwotnymi – 1) zespół z przewagą porostów 2) zespół związany z sinicami. Oba obejmują heterotroficzne mikroorganizmy bakterie, grzyby.

Lód to niezwykle ciekawe środowisko życia psychrofilii. Mikroorganizmy występują zarówno w wiecznej zmarzlinie, lodowcach, lodzie morskim, jeziornym czy w śniegu. Mogą tam żyć dzięki temu, że między kryształkami lodu są przestrzenie z wodą. W lodzie z lodowców płyn ten ma temperaturę poniżej –5°C, a w lodzie morskim do –35°C. **Najzimniejsze dotąd zbadane formy lodu zawierały bakterie żyjące w obrębie fazy ciekłej, w kieszonkach z wodą, obok kanałków solnych powstałych po zamarznięciu lodu morskiego. Mikroorganizmy te, bytujące na granicy fazy ciekłej i stałej nazwano eutektofilami.** Eutektofile znoszą równocześnie: niską temperaturę, wysokie ciśnienie i wysokie stężenie

substancji rozpuszczonych w płynie. Taka kombinacja czynników umożliwia powstanie warunków dla rozwoju i istnienia życia.

Jak psychrofile radzą sobie z zimnem, które u innych organizmów powoduje spadek płynności błon komórkowych, ich uszkodzenie i utratę funkcji biologicznych? Jak radzą sobie, aby utrzymać aktywność metaboliczną w temperaturach, w których enzymy innych organizmów nie pracują już wydajnie? Psychrofile w odpowiedzi na zimno dostosowują skład swoich błon fosfolipidowych. Zwiększają w błonach ilość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w stosunku do nasyconych lipidów, zmniejszają też liczbę rozgałęzionych lipidów.

Ich zdolność do przetrwania w temperaturach poniżej punktu zamarzania opiera się również na dwóch strategiach:

- ☐ ochronie przed tworzeniem się lodu wewnątrz komórki przez uniknięcie zamarznięcia;
- ☐ ochronie przed rozerwaniem komórki podczas odmarzania.

Funkcjonujące w obu procesach białka są nieco myląco nazywane cząsteczkami zapobiegającymi zamarzaniu (ang. antifreeze).

Psychrofile, w wyniku zmian w trzeciorzędowej i czwartorzędowej strukturze enzymów, utrzymują odpowiednią ich aktywność w niskich temperaturach. Dzięki temu enzymy mają bardziej otwartą i elastyczną konformację. Umożliwia to większy dostęp substratów i obniża próg energii aktywacji oraz zwiększa wydajność enzymów. Główną cechą odróżniającą enzymy działające w niskiej temperaturze od tych, działających w temperaturach mezofilnych jest mniejsza liczba wiązań wodorowych. Inne cechy enzymów psychrofilii to: większa zawartość glicyny przy domenach funkcjonalnych; mniejsza upakowanie hydrofobowych rdzeni; mniejszą ilość proliny w pętach. Za to białka psychrofilnych Archea charakteryzują się dodatkowo wysoką zawartością polarnych aminokwasów (w szczególności glutaminy i treoniny) oraz niską zawartością aminokwasów niepolarnych, takich jak leucyna. Jeśli przypatrzmy się błonom zimnolubnych Archea okaże się, że skład ich jest nie

tylko odmienny od składu błon bakterii i eukaryota, ale również od samych Archea żyjących cieplejszych warunkach. Psychrofilne Archea w swoich błonach posiadają lipidy zawierające dietery glicerolu (w miejscu tetraeterów u mezo- i termofilnych archeontów oraz w miejscu wiązań estrowych u organizmów eukariotycznych). Dzięki takiej budowie ich błona jest bardziej płynna.

Enzymy pochodzące z psychrofilii mają olbrzymi potencjał ekonomiczny. Szczególnie w sytuacji ciągłego poszukiwania możliwości obniżenia kosztów procesów produkcyjnych.

Dla biotechnologicznych potrzeb najbardziej poszukiwane są:

- ☐ nowe białka i nowe metabolity wtórne,
- ☐ zastosowanie mikroorganizmów jako potencjalnych czynników w oczyszczaniu ścieków i bioremediacji toksycznych zanieczyszczeń w zimnych środowiskach (wliczając w to klimat umiarkowany, gdzie występuje zima),
- ☐ użycie zaadaptowanych do zimna enzymów w procesach produkcyjnych. Enzymy z mikroorganizmów zimnolubnych znalazły już swoje zastosowanie w przemyśle, np. lipazy i proteazy: w garbarstwie, przetwórstwie spożywczym, w środkach piorących ubrania w niskich temperaturach. Również przemysł drzewny i papierniczy jest zainteresowany degradacją polimerów przez enzymy aktywne w niskich temperaturach. Za to w kręgu zainteresowań biotechnologów są też m.in. produkowane przez bakterie wielonienasycone kwasy tłuszczowe.

Przenieśmy się teraz w cieplejsze, a nawet gorące miejsca na Ziemi.

Termofile i hipertermofile

Według definicji **termofile** to organizmy wykazujące optymalny wzrost w temperaturach powyżej 45°C a maksymalny do 80°C. Oprócz termofili wyróżnia się także **hipertermofile** czyli ekstremalne termofile, których optimum wzrostu jest w temperaturach powyżej 80°C, a minimalna temperatura wzrostu to 60°C. Większość hipertermofili

należy do Archea. W najwyższych temperaturach żyją *Pyrolobus fumarii*, chemolitoautotrof, który redukuje azotany i bakteria żelazista – gatunek przejściowo nazwany „*Geogemma barossii*” izolowany z Ryftu Juan de Fuca. *Pyrolobus fumarii* jest zdolny do wzrostu w temperaturze 113°C. Nie rozwija się on w temperaturze poniżej 90°C, a jego optimum wzrostu to 106°C. „*Geogemma barossii*” należy do *Desulfurococcales* i jest bezwzględnym litotrofem, utylizującym wodór. Jest rekordzistą, bo rośnie nawet w 121°C.

W 1966 roku Thomas Brock odkrył pierwsze termofile we wrzących wodach gorących źródeł Parku Narodowego Yellowstone. Od tamtego czasu termofile były i są odkrywane na całym świecie w morskich i lądowych środowiskach geotermalnie aktywnych – zarówno w płytkich zbiornikach gorących źródeł, w gejzerach, jak i w osadach wokół kominów hydrotermalnych przy wyspach wulkanicznych, czy w pobliżu głębokich morskich kominów hydrotermalnych. Miejsca występowania termofili mogą być także pochodzenia antropogenicznego jak np. pryzmy kompostowe czy dymiące hałdy odpadów górniczych (szczególnie zawierających duże ilości siarczków) i gorące odpływy z elektrowni geotermalnych. Termofile są izolowane z gleb wszystkich kontynentów. W gorących środowiskach przeważają archeony.

Jednymi z najbardziej skrajnych i zadziwiających środowisk na świecie są głębinowe, gorące kominy hydrotermalne (ang. black smokers). Znajdują się one wzdłuż uskoku tektonicznych na głębokości od 2500 do 4000 m. Rejestruje się tam szybko zmieniające się temperatury rzędu od 2 do 450°C i ciśnienie do 420 atm. Oprócz ekstremalnych temperatur i ciśnienia, ze skorupy ziemskiej uwalniają się toksyczne substancje przesycone siarczkami i metalami ciężkimi (Pb, Cd, Hg, Zn). Hipertermofile mogą żyć zarówno w porowatych ścianach kominów, jak i w gorących osadach wokół nich. Kominy hydrotermalne mają niespotykaną gdzie indziej organizację łańcuchów troficznych. Wszystko opiera się na produkcji pierwotnej bakterii chemolitoautotroficznych takich jak *Thioba-*

cillus, *Thiomicrospira*, *Thiothrix* czy *Beggiatoa*. Zaskakująco licznie występujące w takich miejscach zwierzęta takie jak np. żyjące w symbiozie z tymi bakteriami. W niektórych przypadkach symbioza jest tak ścisła, że zwierzęta redukują przewód pokarmowy odżywiając się z udziałem bakteryjnych symbiontów żyjących w ich ciele. Przykładem takiej ścisłej symbiozy jest licznie występujący wokół głębokomorskich wentów rurkoczułkowiec, pogonofor: *Riftia pachyptila*. Rurkoczułkowce nie posiadają przewodu pokarmowego, a wypełniająca ich ciało brązowa struktura nazwana trofozomem, wypełniona jest symbiotycznym bakteriami utleniającymi siarkę. Liczba bakterii jest olbrzymia – ponad $4 \cdot 10^9$ bakterii/g tkanki troposomu. Bakterie te dostarczają swoim gospodarzom substancji odżywczych w zamian za tlen i siarkowodor.

Aby znaleźć termofile nie trzeba szukać gorących źródeł czy kominów hydrotermalnych, także zwyczajne pryzmy kompostowe kryją w sobie ich ogromną różnorodność. Wysoka temperatura wewnątrz pryzmy jest wynikiem rozkładu materii organicznej przez te mikroorganizmy i egzoergiczności procesów. Z pryzm kompostowych wyizolowano heterotrofy (m. in. *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*) jak i chemolitoautotrofy (*Hydrogenobacter* sp.). Inne miejsca występowania termofili w pobliżu człowieka to dymiące hałdy odpadów z kopalni węgla. Także zachodzące w hałdach odpadów górniczych głównie abiotyczne reakcje utleniania, są w znacznym stopniu wspomagane poprzez działalność mikroorganizmów. Dzięki nim następuje biolugowanie metali. Również głębokie kopalnie stwarzają warunki dla rozwoju termofili przeprowadzających reakcje utleniania minerałów. Termofile można znaleźć zarówno w domenie Bacteria jak i Archea. Wykazują one znaczne zróżnicowanie fizjologiczne.

W naturalnych siedliskach hipertermofile tworzą złożone łańcuchy zależności pokarmowych. Producentami są chemolitotrofy, czyli mikroorganizmy wykorzystujące reakcje utleniania i redukcji związków nieorganicznych jako źródło energii. Wiążą one dwutlenek jako źródło węgla do budowy komórek. Wykorzy-

stują wiele różnych związków nieorganicznych jako donory elektronów. Autotroficzne hipertermofile, produkujące materię organiczną poprzez wiązanie dwutlenku węgla, posiadają cykle metaboliczne znacznie różniące się od roślinnych. Wykryto trzy różne alternatywne cykle u: *Aquifex pyrophilus*, *Archaeoglobus litotrophicus* i *Methalospaera sudula*. Kilka z chemilitoautotrofów potrafi zamiennie używać substratów nieorganicznych i organicznych jako źródła energii (fakultatywne heterotrofy). Możliwości metaboliczne hipertermofilii obejmują różnorakie typy oddychania tlenowego i beztlenowego. Prawie wszystkie hipertermofile są ścisłymi beztlenowcami. Mikroorganizmy fermentujące takie jak *Thermococcus stetteri* czy *Pyrococcus furiosus* rosną najlepiej współżycząc z utylizującymi wodór bakteriami metanogennymi np.: *Methanococcus lithotrophicus* czy *M. jannaschii*. Dzieje się tak przy fermentacjach, których głównym produktem jest wodór cząsteczkowy – inhibitor wzrostu tych mikroorganizmów. W reakcjach, gdzie wodór cząsteczkowy jest donorem elektronów (substratem pokarmowym) jako akceptory elektronów (substraty oddechowe) wykorzystywane są: siarka elementarna, siarczany, siarczyny, azotany, azotyny i dwutlenek węgla czy nawet arseniany. Zamiast wodoru *Ferroglobus placidus* jest w stanie wykorzystywać jony żelaza jako donory elektronów przy redukcji azotanów. Hipertermofile pełnią ważne ekologiczne funkcje w procesach biogeochemicznych. Np. dla beztlenowych hipertermofilii akceptorami elektronów mogą być także związki metali ciężkich. I tak *Pyrobaculum* jest zdolne do redukcji jonów żelaza do magnezytu. W koegzystencji z mikroorganizmami utleniającymi żelazo takimi jak *F. placidus* powstaje zamknięty cykl przemian żelaza. Przeprowadzane przez hipertermofile procesy biomineralizacyjne to – formowanie magnezytu z żelaza i wytrącanie arsenianów. Zaś przedstawiciele typu *Sulfolobales* potrafią łączyć metale ciężkie z ich rud.

Ostatnie kilka lat przyniosło odkrycia nowych gatunków mikroorganizmów zarówno bakterii, jak i Archea zamieszkujących gorące wenty hydrotermalne. Nowe rodzaje Archea

to m.in. rodzaj *Ignicoccus* posiadający błonę zewnętrzną oraz *Geoglobus* zdolny do wzrostu beztlenowego z octanem i jonami żelaza. Metodami molekularnymi odkryto, że znaczenie bakterii termofilnych w próbach z głębokich mórz nie jest mniejsze niż Archea. Nowe izolaty bakteryjne reprezentują różne grupy systematyczne: przykładowo z rzędu *Thermotogales* – *Marinitoga piesophila* (jedyne znany bakteryjny piezofil i termofil), *Marinitoga hydrogenitolerans* (nie jest hamowny przez wodór cząsteczkowy); z rzędu *Aquificales*, gdzie są termofilne i ekstremalnie termofilne litoautotrofy (ich źródłem energii są H_2 , S^0 , S^{2-} lub $S_2O_3^{2-}$ a akceptorem elektronów O_2 , NO_3^- lub S^0). Przykładowo izolowane gatunki, zależnie od miejsca izolacji, to *Hydrogenobacter termolithotrophum*, *Persphonella marina* (mikroaerofil), *Desulfurobacterium crinifex* i *Balnearium litotrophicum*. Te dwa ostatnie gatunki i rodzaje były izolowane tylko ze środowisk głębokich mórz. Różnorodność głębokomorskich środowisk wzbogacają m.in. termofilne bakterie redukujące siarczany z rodziny *Thermodesulfobacteriaceae* np. *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* (używa CO_2 jako źródła energii). W próbach z hydrotermalnymi matami znajdowane są także bardzo liczne kłony *Epsilonproteobacteria*.

Ciekawym mikroorganizmem izolowanym z ciepłych osadów Morza Śródziemnego jest termofilna bakteria *Gallionella ferruginea*. Jako donory elektronów wykorzystuje jony żelaza (Fe^{2+}). *G. ferruginea* z wytrącenia produkowanych przez nią tlenków żelaza wytwarza łądyżki – w ten sposób powstają osady bogate w żelazo.

Nieustannie szerokie zainteresowanie wśród biotechnologów budzą enzymy wyizolowane z termo- i hipertermofilii m.in. ze względu na ich termostabilność i aktywność w wysokich temperaturach. W niektórych syntezach ważna jest podwyższona temperatura. W niej rośnie rozpuszczalność wielu reagentów, szczególnie polimerów. Zwiększa to dostępność substratu, co skutkuje szybszym tempem reakcji. W wysokich temperaturach spada też ryzyko zakażenia mikroorganizma-

mi w czasie procesów produkcyjnych. W szczególności poszukiwane są enzymy: proteazy, lipazy oraz degradujące polimery – celulazy, chitynazy i amylazy.

Już swoje zastosowanie w przemyśle znalazły:

- ☐ enzymy rozkładające polisacharydy (celulazy, amylazy, *pullulanazy*, ksylanazy, mannanazy, pektynazy i chitynazy),
- ☐ proteazy,
- ☐ lipazy i esteryzy.

Głównymi odbiorcami enzymów jest przemysł środków piorących, spożywczy, paszowy, odzieżowy, skórzany, papierniczy i farmaceutyczny.

Przemysł cukrowniczy to jeden z największych użytkowników termostabilnych enzymów amylolitycznych (α -amylaz, glikoamylaz i izoamylaz lub pullanaz), które hydrolizują i przekształcających skrobię w glukozę i inne produkty. Celulazy stosowane są do usuwania polifenolów z soków, do zmiękczenia tkanin i wstępnego trawienia biomasy roślinnej. Wykorzystywane w produkcji papieru termostabilne hemicelulazy (np. ksylanazy), obniżają zanieczyszczenie środowiska halo-

genkami, które były używane w tym procesie w dużych ilościach. Termostabilne lipazy stosowane są przy wielu procesach m. in.: w odtłuszczaniu mleka, usuwaniu zanieczyszczeń z surowej bawełny, usuwaniu podskórnego tłuszczu w przemyśle skórzanym i przy produkcji leków w przemyśle farmaceutycznym.

Nie bez znaczenia są termostabilne polimerazy DNA wyizolowane z hipertermofili. Doprowadziły one do bardzo szybkiego rozwoju w biologii molekularnej ze względu na zdolność powielania DNA w tzw. łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). W reakcji tej polimeraza powielił dany odcinek DNA, wytwarzając dużą liczbę jego kopii. Proces ten wymaga cyklicznego ogrzewania i schładzania mieszaniny reakcyjnej. Wykorzystuje się tu właściwość termostabilnej polimerazy do replikowania DNA w wysokiej temperaturze (72°C). Drugą jej cechą, bardzo ważną dla procesu, jest termiczna dezaktywacja enzymu w temperaturze topnienia DNA (95°C) bez jego denaturacji. Obecnie używa się polimerazy Taq (izolowanej z *Thermus aquaticus*) i polimerazy pfu (izolowanej z *Pyrococcus furiosus*).

Jak to możliwe żeby żyć w środowisku, w którym giną inne mikroorganizmy? Dlaczego wysoka temperatura im nie szkodzi? Przystosowania do hipertermofili, życia w wysokich temperaturach to: większe upakowanie enzymów i innych białek (mniej jest wolnych miejsc w strukturze przestrzennej, z którymi może wiązać się woda, zastąpienie dużych aminokwasów mniejszymi czy redukcja długości pętli wystawionych na działanie roztworu wodnego). Inne przykłady przystosowania to optymalizacja struktur drugorzędowych, redukcja liczby niestabilnych termicznie aminokwasów (takich jak cysteina, metionina, asparagina czy glutamina) oraz oligomeryzacja struktur.

Aby przystosować błony do wysokich temperatur termofile m. in.: wydłużają łańcuchy acylowe; zwiększają nasycenie, rozgałęzianie lub cyklizację kwasów tłuszczowych. U Archea zaobserwowano cyklizację i nasycenie występujących u nich eterolipidów. Niektóre hipertermofile chronią się przed denaturacją DNA w wysokich temperaturach. Zwierają znaczne ilości specjalnych soli stabilizujących strukturę DNA (difosfoinozytolu potasu i difosfoglicerynianu potasu). U niektórych hipertermofili zaobserwowano, iż produkcja poliamidów podwyższa temperaturę topnienia DNA, a w niektórych przypadkach chroni rybosomy przed dezaktywacją. Odporność podwójnej helisy DNA na temperaturę jest dodatkowo zwiększona dzięki odwrotnej gyrazie. Gyraza wprowadza dodatnie superskręty, które stabilizują helisę. Drugorzędową strukturą kwasów nukleinowych jest chroniona przed degradacją w wysokich temperaturach poprzez wprowadzenie do ich struktury znacznej liczby par GC (guanina-cytosyna). W stabilizacji RNA uczestniczą metylowane nukleotydy.

Zastosowanie przemysłowe enzymów izolowanych z ekstremofili

Ekstremofile	Środowisko	Enzymy	Wybrane zastosowane
TERMOFILE	wysokie temperatury umiarkowane termofile (45–65°C) termofile (65–85°C) hipertermofile (powyżej 85°C)	amylazy ksylanazy proteazy polimerazy DNA	glukoza, fruktoza do słodzików obróbka papieru pieczenie, warzenie piwa, detergenty inżynieria genetyczna
PSYCHROFILE	niskie temperatury	proteazy dehydrogenazy amylazy	dojrzewanie sera, nabiał biosensory degradacja polimerów w detergentach
ACIDOFIL	niskie pH	utlenianie siarki skupianie chalkopirytu	odsiarczanie węgla odzyskiwanie cennych metali
ALKALOFIL	wysokie pH	celulazy	degradacja polimerów w detergentach
HALOFIL	wysokie stężenie soli	celulazy	chromatografia jonowymienna produkcja kwasu poli(γ-glutaminowego) (PGA) i poli (β-hidroksy masłowy) (PHB)
PIEZOFIL	wysokie ciśnienie	całe mikroorganizmy	formowanie żeli i granulek skrobiowych
METALOFIL	wysokie stężenie metali	całe mikroorganizmy	biotugowanie, bioremediacja, biomineralizacja
RADIOFIL	wysoki poziom napromieniowania	całe mikroorganizmy	boremediacja radionuklidów z miejsc skażo- nych