

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

EXTRÉMOFILNÍ MIKROORGANISMY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LENKA PROCHÁZKOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

EXTRÉMOFILNÍ MIKROORGANISMY

EXTREMOPHILIC MICROORGANISMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

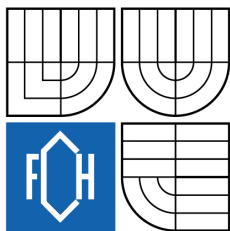
LENKA PROCHÁZKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0366/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Lenka Procházková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Libor Babák, Ph.D.**
Konzultanti bakalářské práce: Ing. Jana Piechová

Název bakalářské práce:

Extrémofilní mikroorganismy

Zadání bakalářské práce:

1. Charakterizace extrémofilů
2. Výskyt
3. Aplikace v průmyslu

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Lenka Procházková
Student(ka)

Ing. Libor Babák, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá zmapováním extrémofilních mikroorganismů. Je popsáno extrémní prostředí, ve kterém se tyto mikroorganismy vyskytují, a rovněž strukturní a chemická adaptace na toto prostředí. Adaptace nejčastěji vyžaduje změny ve složení membránových lipidů, nukleových kyselin a proteinů.

Enzymy vykazující stabilitu v extrémním prostředí nacházejí uplatnění zejména v chemickém, potravinářském, farmaceutickém a textilním průmyslu. Zmíněno je také uplatnění extrémofilů při biodegradaci organických materiálů.

Tato práce je nejvíce zaměřena na hypertermofilní mikroorganismy, které byly doposud nejlépe prozkoumány.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with the extremophilic microorganisms. There is described extreme environment in which these microorganisms occur, as well as several structural and chemical adaptations to the environment. In most cases, adaptation to extreme environment requires changes in the composition of membrane lipids, nucleic acids and proteins.

Enzymes with stability in extreme environment are used in chemical, food, pharmaceutical and textile industry. There is also mentioned the application of extremophiles in the biodegradation of organic materials.

This bachelor's thesis is mainly focused on hyperthermophilic microorganisms, which have been most researched.

KLÍČOVÁ SLOVA

Extrémní prostředí, extrémofil, hypertermofil, psychrofil, halofil, barofil, acidofil, alkalofil, adaptace, využití

KEYWORDS

Extreme environment, extremophile, hyperthermophile, psychrophile, halophile, barophile, acidophile, alkaliphile, adaptation, utilization

PROCHÁZKOVÁ, L. *Extrémofilní mikroorganismy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Libor Babák, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování: Děkuji Ing. Liboru Babákovi, Ph.D. za odborné vedení a všestrannou pomoc při zpracování této bakalářské práce.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Extrémofilní mikroorganismy.....	8
2.1	Extrémní podmínky.....	8
2.2	Původ extrémofilů.....	8
2.2.1	Archaea – odlišnosti od bakterií.....	8
2.3	Adaptace na extrémní podmínky.....	9
2.4	Rozdělení extrémofilů.....	10
2.5	Biotechnologické aplikace.....	10
3	Hypertermofilní mikroorganismy.....	12
3.1	Biotopy hypertermofilů.....	12
3.2	Taxonomie a fylogenetické vztahy.....	13
3.3	Fyziologické vlastnosti.....	14
3.3.1	Extrémní acidofilové.....	14
3.3.1.1	Sulfolobus.....	14
3.3.1.2	Metalosphaera.....	14
3.3.1.3	Acidianus.....	14
3.3.1.4	Stygiolobus.....	14
3.3.2	Mírní acidofilové a neutrofilové.....	14
3.3.2.1	Postvulkanická oblast.....	15
3.3.2.2	Podmořské hydrotermální systémy.....	15
3.4	Mechanismus adaptace.....	16
3.4.1	Nukleové kyseliny.....	16
3.4.2	Membránové lipidy.....	16
3.4.3	Enzymy.....	17
3.5	Využití.....	18
3.5.1	Uplatnění v molekulární biologii.....	18
3.5.1.1	DNA polymerasy.....	18
3.5.1.2	DNA ligasy.....	18
3.5.1.3	Proteasy.....	18
3.5.2	Aplikace ve škrobárenství.....	18
3.5.2.1	α -Amylasy.....	19
3.5.3	Bělení papíru.....	19
3.5.4	Čištění odpadních vod.....	19
4	Psychrofilní mikroorganismy.....	20
4.1	Charakteristika.....	20
4.2	Oblasti výskytu.....	20
4.3	Psychrofilny mezi mikroorganismy.....	21
4.4	Adaptace na nízké teploty.....	21
4.4.1	Struktura membránových lipidů.....	21
4.4.2	Enzymy adaptované na chladné prostředí.....	21
4.4.3	Proteiny proti promrzání.....	22
4.5	Využití.....	22
4.5.1	Detergenty.....	22
4.5.2	Textilní průmysl.....	22
4.5.3	Potravinářský průmysl.....	22

4.5.4	Bioremediace.....	23
4.5.5	Mrazírenský průmysl.....	23
5	Halofilní mikroorganismy.....	24
5.1	Charakterizace.....	24
5.2	Hypersalinní prostředí.....	24
5.3	Taxonomie.....	25
5.3.1	Halofilní archaea.....	25
5.3.2	Halofilní bakterie.....	25
5.3.3	Halofilní eukaryotické mikroorganismy.....	25
5.4	Mechanismus adaptace.....	26
5.4.1	Redukce osmotického tlaku.....	26
5.4.1.1	Akumulace intracelulárních iontů.....	26
5.4.1.2	Akumulace osmolytů.....	27
5.4.2	Proteiny v hypersalinním prostředí.....	27
5.4.3	Stabilizace membránové lipidové dvojvrstvy.....	27
5.5	Biotechnologické aplikace.....	27
5.5.1	Biodegradace organických sloučenin.....	28
5.5.2	Produkce biopolymerů.....	28
5.5.3	Bakteriorodopsin.....	28
5.5.4	Osmoticky aktivní látky.....	28
6	Piezofily.....	29
6.1	Charakteristika.....	29
6.2	Prostředí s vysokým tlakem.....	29
6.3	Piezofily mezi mikroorganismy.....	30
6.4	Adaptace na vysoký tlak.....	30
6.5	Uplatnění piezofilních mikroorganismů.....	31
7	Život při extrémním pH.....	33
7.1	Extrémní pH.....	33
7.1.1	Alkalické prostředí.....	33
7.1.2	Kyselé prostředí.....	33
7.2	Acidofily.....	34
7.2.1	Zastoupení mezi mikroorganismy.....	34
7.2.2	Mechanismus adaptace.....	34
7.2.3	Aplikace acidofilů.....	35
7.2.3.1	Biotěžba.....	35
7.2.3.2	Ostatní využití acidofilů.....	35
7.3	Alkalofily.....	36
7.3.1	Adaptace na vysoké vnější pH.....	36
7.3.2	Využití alkalofilů.....	37
7.3.2.1	Enzymy.....	37
7.3.2.2	Farmaceutický průmysl.....	37
7.3.2.3	Potravinářský průmysl.....	37
8	Závěr.....	38
9	Seznam použitých zdrojů.....	39
10	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	43

1 ÚVOD

Jako extrémofilní mikroorganismy označujeme takové mikroorganismy, které obývají prostředí, které se z lidského hlediska jeví být extrémním a pro jiné mikroorganismy by bylo nepochybně neobyvatelné. Jak už ale z názvu vyplývá, tyto mikroorganismy jsou na své prostředí dobře adaptované a vyhledávají ho, často ani nejsou schopné v jiném prostředí žít. Do jisté míry je to jejich konkurenční výhoda před jinými organismy.

Většina známých extrémofilů pochází z domény archea, některé z domény bacteria. Extrémofilní eukarya jsou zastoupena některými houbami.

Extrémofilní mikroorganismy jsou zajímavé zejména proto, že v důsledku adaptace na extrémní prostředí často obsahují unikátní sekvence aminokyselin, bylo z nich izolováno množství zajímavých enzymů a často tvoří i speciální metabolity. Tyto enzymy a specifické metabolity jsou průmyslově využívány a v biotechnologických aplikacích mají velký potenciál do budoucna. V současné době se využívají zejména ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, v oblasti molekulární biologie a při čištění odpadních vod.

2 EXTRÉMofilní MIKROORGANISMUSY

2.1 Extrémní podmínky

Většina mikroorganismů potřebuje k udržení života mírné životní podmínky jako neutrální prostředí, teplotu od 20 do 40 °C, tlak vzduchu 1 atm a adekvátní množství vody, živin a soli. Avšak existují i mikroorganismy, které jsou schopné přežít v oblasti kyselých a termálních pramenů, v solných jezerech, na poušti nebo na dně oceánu. Tyto mikroorganismy, známé jako extrémofily, vyžadují pro svůj růst a rozmnožování extrémní podmínky jako vysoké či nízké hodnoty teploty, pH, tlaku nebo koncentrace soli. Jsou schopné žít i při nízké koncentraci živin, malé dostupnosti vody, působení toxických látek a v oblasti zvýšené radiace. [1]

Mikroorganismy, které se dokáží přizpůsobit více extrémním podmínkám pak nazýváme polyextrémofilní mikroorganismy. Jako příklad lze uvést *Sulfolobus acidocaldarius*, který prospívá za nízkého pH a teplot okolo 80 °C. [2]

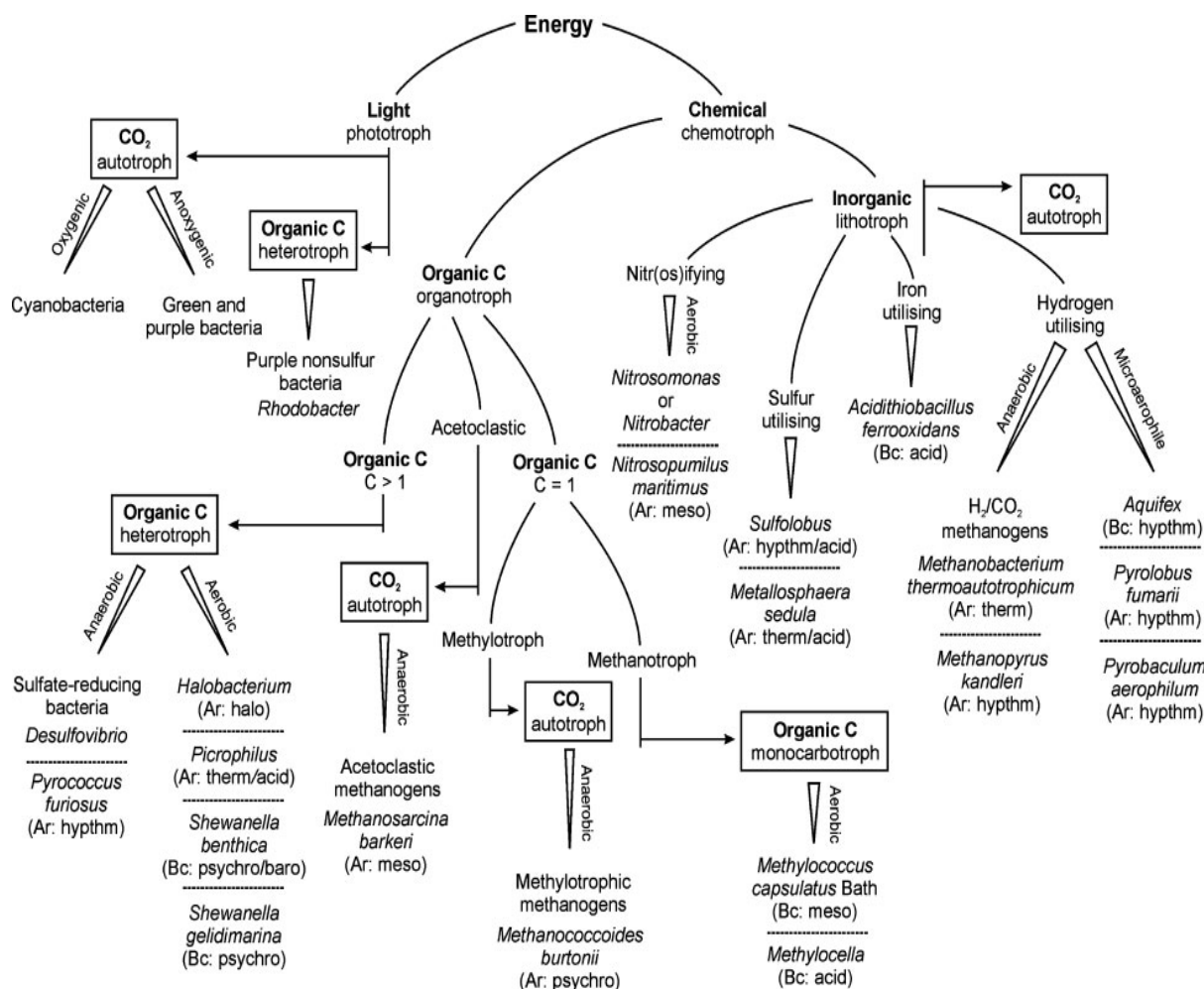
2.2 Původ extrémofilů

Lze říci, že studium extrémofilních mikroorganismů pomohlo přetvořit evoluční strom života. Rozdíly při sekvencování 16S rRNA ukázaly, že organismy mohou být rozděleny do tří domén. Původní dvě domény eukarya a bakteria byly obohaceny o archaea. Tato poslední zmíněná doména obsahuje jak geny, které se vyskytují u původních dvou domén, tak i geny zcela jedinečné. [3,4] Většina extrémofilních mikroorganismů, které byly doposud rozeznány pocházejí z domény archaea a bakteria, které zahrnujeme mezi prokaryota. Prokaryota jsou jednobuněčné mikroorganismy, které tvoří funkčně a morfologicky diferencované tkáně. Všudypřítomnost prokaryot na Zemi je dána schopností přizpůsobit se převládajícím energetickým a výživovým zdrojům. Tato jejich metabolická různorodost je uvedena na obr. 1. [5]

2.2.1 Archaea – odlišnosti od bakterií

Archaea zahrnují tři skupiny prokaryot, které jsou schopny prosperovat v extrémním prostředí: halofily, termoacidofily a methanogenní bakterie. Jejich unikátní schopnosti jsou dány jejich odlišným složením:

- ❖ Cytoplazmatická membrána obsahuje lipidy a proteiny. Většina z těchto lipidů však nejsou fosfolipidy, ale lipidy obsahující etherové vazby. Jak eukaryotická, tak i bakteriální membrána obsahuje esterové vazby.
- ❖ Pokud je přítomna buněčná stěna, neobsahuje peptidoglykany.
- ❖ Ribozomy archaea jsou citlivé na inhibitory, které ovlivňují velkou jednotku 80S ribozomu eukaryot a naopak jsou rezistentní ke mnoha inhibitorům, které ovlivňují bakteriální ribozomy. [6]



Obr. 1: Klasifikace mikroorganismů (Bc = Bakteria, Ar = Archaea) dle požadavků na energii (křivka) a uhlík (horizontální čáry) s příklady zástupců jednotlivých extrémofilů (acid = acidofilní, baro = barofilní, halo = halofilní, hypthm = hypertermofilní, meso = mesofilní, therm = termofilní, psychro = psychrofilní). Některé mikroorganismy nemají unikátní rozdělení (např. *Aquifex* sp. je schopen využívat H_2 , S^0 nebo $S_2O_3^{2-}$ jako zdroj energie. [5])

2.3 Adaptační podmínky

Pro mikroorganismus, který se vyskytuje v extrémních podmínkách, je rozhodující udržet si své funkce. Nejsnadnější přístup k dosažení tohoto cíle je udržet vnější prostředí mimo buňku. Příkladem tohoto může být *Dunaliella acidophila*, která se vyskytuje za pH 0,5. Ačkoliv je její cytoplazma neutrální, extracelulární enzymy jsou ke kyselému prostředí tolerantní. Pokud však není možné udržet vnější prostředí mimo, evoluční odpovědi jsou ochranné mechanismy, změna fyziologie a posílení opravných schopností. Výzkum je zaměřen na tři hlavní třídy biomolekul: nukleové kyseliny, membránové lipidy a proteiny. V nukleových kyselinách je neoddelitelně spojena funkce a struktura. DNA je napadnutelná vysokou teplotou, radiací, oxidací a také nemá obranné mechanismy vůči vysychání. Mimořádné úrovni radiace je schopný odolávat *Deinococcus radiodurans*, který obsahuje unikátní obranné mechanismy, které zahrnují sestavování roztržitých DNA. [2] Pro udržení životaschopnosti mikroorganismů v extrémních podmínkách byla nutná rovněž adaptace proteinů. Jednou ze základních strategií k udržení života je exprese „heat-shock“ proteinů

o malé molekulové hmotnosti, které se chovají jako chaperony a snižují denaturaci proteinů a také jejich agregaci. [5] Proteiny, nezávisle na tom, zda pochází z termofilních nebo mesofilních druhů, jsou složeny ze 20 základních aminokyselin. Pokud jsou vystaveny extrémnímu tlaku, teplotě nebo pH, dochází ke kovalentním modifikacím (deaminace, β -eliminace, výměna disulfidických můstků, oxidace, Maillardovy reakce, hydrolýza atd.). Aminokyseliny musí kompenzovat tuto degradaci buď použitím kompatibilní ochrany nebo zdokonalením mechanismu syntéz a reparací. Každý protein se snaží nahromadit elementy, které by mu pomohly ke stabilizaci. Výskyt nabitých skupin, síť vodíkových vazeb a hydrofobní interakce, každá z těchto přispívá ke stabilizaci svým způsobem. [7] K udržení optimální membránové fluidity je nutné přizpůsobit množství a typ lipidů v membráně. [2]

2.4 Rozdělení extrémofilů

Podle toho, ve kterých extrémních podmínkách jsou tyto organismy schopné přežít, je pak rozdělujeme do skupin, které jsou uvedeny v tab. 1. [2]

Tab. 1: Klasifikace a příklady extrémofilních mikroorganismů. [2]

Extremní veličina	Typ	Definice	Příklady
teplota	Hypertermofily Termofily Mesofily Psychrofilny	Růst > 80 °C Růst 60–80 °C 15–60 °C < 15 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i> , 113 °C <i>Synechococcus lividis</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Psychrobacter</i>
radiace			<i>Deinococcus radiodurans</i>
tlak	Barofily	Vysoký tlak	
vysychání	Xerofily	Tolerantní vůči nedostatku vody	<i>Arternia salina</i>
salinita	Halofily	Vysoký obsah solí (2–5 M NaCl)	<i>Dunaliella salina</i>
pH	Alkalofily Acidofily	pH > 9 Nízké pH	<i>Bacillus firmus</i> <i>Cyanidium caldarium</i>

2.5 Biotechnologické aplikace

Aplikace termofilních, psychrofilních, acidofilních, alkalofilních a halofilních mikroorganismů v průmyslových procesech otevírá novou éru v oblasti biotechnologie. Každá skupina těchto mikroorganismů má jedinečné vlastnosti, které mohou být využity v biotechnologickém průmyslu. Hlavním důvodem pro výběr enzymů právě z extrémofilů je jejich vysoká stabilita a snížené riziko kontaminace. Od těchto enzymů s výjimečnými vlastnostmi se očekává, že zaplní mezeru mezi biologickými a chemickými procesy. Obchodní význam enzymů dokládá široké uplatnění DNA polymeras z *Thermus aquaticus* a *Pyrococcus furiosus* v řetězové polymerázové reakci (PCR). Tato reakce spočívá v rychlém a účinném namnožení specifických sekvencí DNA a je celosvětově využívána v kriminalistice, analýze potravin nebo v klinické medicíně. [8] Dalším významným příkladem je aplikace celulasy 103, izolované z halofilní bakterie, která se používá pro rozrušení jemných mikroskopických vláken celulózy, na kterých se zachytávají nečistoty. Celý tento proces je významný tím, že probíhá bez poškození přírodní tkaniny. Enzymy jako

amylasy, polulanasy, xylanasy, proteasy a celulasy, které degradují polymery, hrají důležitou roli v potravinářském, chemickém, farmaceutickém, papírenském průmyslu a při zpracování odpadů. Průmysl jeví zájem rovněž o nízkomolekulární metabolity jako cyklodextríny nebo málo běžné lipidy. [9]

3 HYPERTERMOFILNÍ MIKROORGANISMY

Organismy s optimální teplotou růstu přesahující 45 °C se označují jako termofilní. [10] Teplota optimálního růstu hypertermofilních mikroorganismů je mezi 80 a 106 °C. V tomto teplotním intervalu již dochází rychlému rozpadu některých malých biomolekul. Pro druhy rodu *Methanopyrus*, *Pyrodictium* a *Pyrolobus* je teplota pod 80 °C ještě příliš nízká na to, aby byl podporován růst. Vůbec nejvyšší teplota růstu 113 °C byla zaznamenána u *Pyrolobus fumarii*. [11]

3.1 Biotopy hypertermofilů

Hypertermofilní mikroorganismy tvořící komunity v oblastech vysokých teplot je možné najít jak v pozemních, tak i v mořských vodách. Nejčastěji obývanými biotopy jsou vulkanicky a geotermálně vyhříváné hydrotermální systémy jako neutrální horké prameny nebo podmořská solná ústí. [12] Největší koncentrace termálních pramenů a sopečných oblastí s vulkanickou aktivitou se nachází v Yellowstonském národním parku, na Islandu, Novém Zélandu, v Japonsku a Rusku. [13]



Obr. 3: *Grand Prismatic Spring* v Národním parku *Yellowstone*. [14]

Teploty v aktivních vulkánech jsou pro živé mikroorganismy příliš vysoké (roztavená láva může přesahovat teplotu 1000 °C). Horké prameny a fumaroly spojené se sopečnou aktivitou již mají teploty výrazně nižší a jsou přímými kandidáty pro život termofilních mikroorganismů. Teploty termálních pramenů se pohybují od 30 °C do teploty varu (90-100 °C v závislosti na nadmořské výšce) a živé organismy se zde skutečně vyskytují. Fumaroly, které jsou složeny pouze z výronů par a plynů, mohou mít teploty výrazně vyšší než 100 °C a zdají se být bez živých organismů. [13]

Mořské hydrotermální systémy se vyskytují v mělkých i téměř nezměrných hlubinách. Jsou složeny z horkých fumarolů, pramenů, sedimentů a hlubokomořských ústí a jejich teplota dosahuje až 400 °C (příkladem jsou tzv. „černí kuřáci“). Pro tyto systémy je typická vysoká

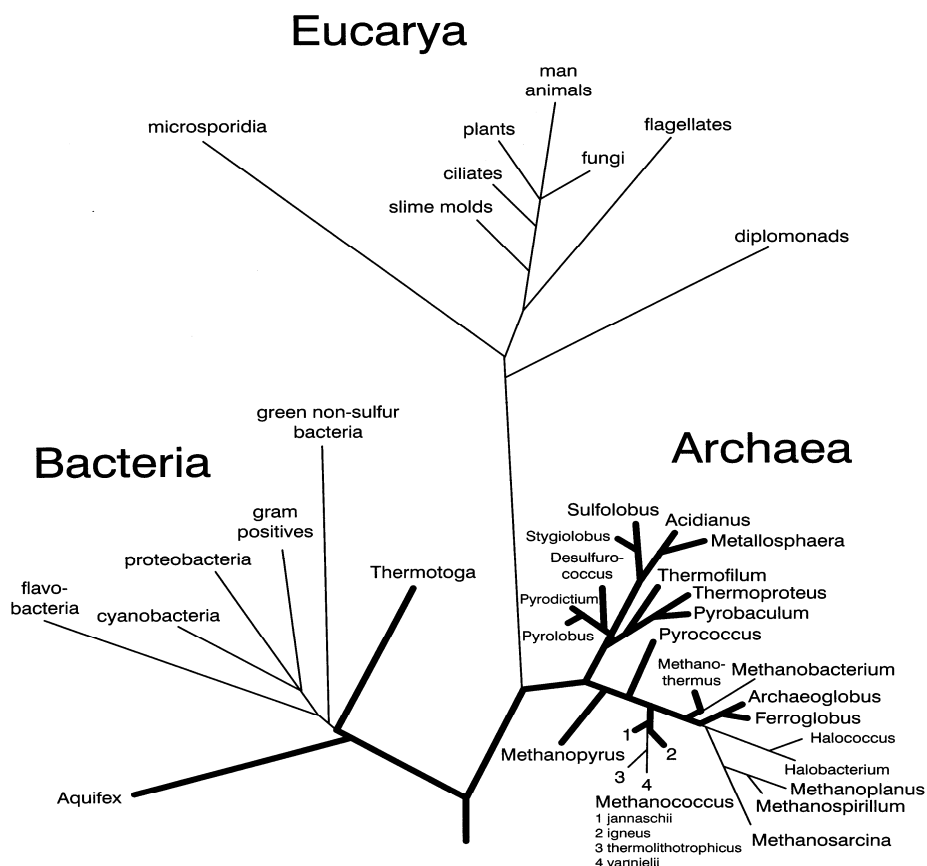
koncentrace chloridu sodného a s tím spojené mírně kyselé až zásadité pH. Výjimkou je extrémně alkalický termální pramen na pobřeží Reykjarnes v severozápadní části Islandu. Jak mělké, tak i hlubokomořské systémy jsou útočištěm pro členy rodů *Igneococcales*, *Thermococcales*, *Methanococcales*, *Archaeoglobales* a *Thermotogales*. Členové rodu *Methanopyrus* byly doposud nalezeny pouze ve větších hloubkách, zatímco bakterie *Aquifex* byla izolována jen z mělkých hydrotermálních systémů.

Umělé biotopy, jako doutnající odpadní uhelné hromady, obsahují rody *Thermoplasma* a *Sulfolobus*. Jiným nepřírodným prostředím pro hypertermofily jsou vroucí odpadní vody z vodních elektráren. Z přetlakového ventilu vodní elektrárny byl izolován *Pyrobaculum islandicum*. [12]

3.2 Taxonomie a fylogenetické vztahy

Hypertermofily jsou velmi rozmanité mikroorganismy, které jsou rozděleny do 10 řádů zahrnujících 29 rodů. Pro rozpoznání a charakterizaci nových taxonomických skupin je široce využívána malá ribozomální RNA (16S rRNA), dále pak obsah G+C v DNA, homologie DNA-DNA a základní morfologické a fyziologické rysy. [11]

V univerzálním fylogenetickém stromu hypertermofily představují všechny syté a krátké linie (obr. 3). Zástupce lze nalézt doménách bacteria a archaea. Představiteli první domény jsou *Aquifex* a *Thermotoga*, u archaea jsou to rody *Pyrodictium*, *Pyrolobus*, *Pyrobaculum*, *Desulfurococcus*, *Sulfolobus*, *Methanopyrus*, *Thermococcus*, *Methanothermus* a *Archaeoglobus*. [15]



Obr. 3: Hypertermofilní mikroorganismy jako součást fylogenetického stromu. [15]

3.3 Fyziologické vlastnosti

Hypertermofily jsou dobře adaptováni na své biotopy a pro svůj růst vyžadují vysoké teploty při různém pH prostředí, salinitě a redoxním potenciálu. V závislosti na jejich lokalitě vytvářejí komplexní ekosystém, který je složen z mikroorganismů produkujících a rozkládajících organickou hmotu. Primárními producenty jsou chemolitoautotrofní mikroorganismy, které využívají anorganické donory a akceptory elektronů pro získání energie. Přehled chemoautotrofních a chemoheterotrofních organismů a jejich schopnost využívat různé substráty je uvedena v tab. 2. [15]

3.3.1 Extrémní acidofilové

Extrémní acidofilní hypertermofily se vyskytují v pozemské nebo podmořské oblasti postvulkanického úniku horkých plynů bohatých na síru. Hlavními zástupci jsou rody *Sulfolobus*, *Metallosphaera*, *Acidianus* a *Stygiolobus*. Mají kulovitý až lalokovitý tvar a vzhledem k přístupu kyslíku se řadí mezi aerobní, fakultativně anaerobní i přísně anaerobní mikroorganismy. Optimální pH se pohybuje v rozmezí 2-3. [15] Nejvíce extrémní acidofilové *Picrophilus oshimae* a *Picrophilus torridus* mají pH optimum 0,7. [1]

3.3.1.1 *Sulfolobus*

Zástupci rodu *Sulfolobus* se řadí mezi aerobní mikroorganismy. Při jejich autotrofním růstu dochází k oxidaci síry, sulfidů na H_2SO_4 nebo vodíku na H_2O . V mikroaerobních podmínkách jsou schopni redukovat železitany a molybdenany. *Sulfolobus metallicus* roste vyluhováním ložisek sulfidických rud, při kterém dochází k rozpouštění iontů těžkých kovů jako Fe^{2+} , Zn^{2+} a Cu^{2+} . Někteří členové rodu *Sulfolobus* jsou fakultativní nebo obligátní heterotrofy využívající jako substrát cukry, kvasničný extrakt nebo peptony. [12,15]

3.3.1.2 *Metallosphaera*

Rod *Metallosphaera* se vyznačuje oxidací sulfidických rud jako jsou pyrit, chalkopyrit a sfalerit, tvorbou H_2SO_4 a rozpouštěním iontů těžkých kovů. [15]

3.3.1.3 *Acidianus*

Rod *Acidianus* je podobný rodu *Sulfolobus*. Je možné ho izolovat z mořských hydrotermálních oblastí se salinitou převyšující 4 %. Energie pro růst je získávána oxidací síry, sulfidů, vodíku nebo organické hmoty. *Acidianus brierleyi* je schopen oxidace sulfidických rud. Za anaerobních podmínek je *Acidianus* schopen redukovat elementární síru a využít H_2 jako donor elektronů pro tvorbu H_2S jako konečného produktu. [12,15]

3.3.1.4 *Stygiolobus*

Rod *Stygiolobus* se řadí mezi striktně anaerobní extrémofilní acidofily. Jako obligátní chemolitoautotrofní mikroorganismy získávají energii redukcí elementární síry. [15]

3.3.2 Mírní acidofilové a neutrofilové

Mírní acidofilové a neutrofilní hypertermofily se nacházejí v pozemských oblastech postvulkanické činnosti, v podmořských hydrotermálních systémech a v hlubokých ropných nádržích. Většina je striktně anaerobní.

3.3.2.1 Postvulkanická oblast

Tato oblast je obývána rody *Thermoproteus*, *Pyrobaculum*, *Thermofilum*, *Desulfurococcus*, *Sulfophobococcus*, *Thermosphaera* a *Methanothermus*. Pouze jeden zástupce rodu *Pyrobaculum* se vyskytuje v mořských oblastech. Touto výjimkou je *Pyrobaculum aerophilum*, který za anaerobních podmínek redukuje dusičnany a za mikroaerofilních podmínek kyslík.

Thermoproteus neutrophilus, *Pyrobaculum islandicum* a *Thermoproteus tenax* jsou chemolitoautotrofní anaeroby získávající energii redukcí síry vodíkem. *Pyrobaculum organotrophum*, *Thermoproteus uzoniensis* a *Thermofilum* jsou obligátně heterotrofní, respirující na síře a organických substrátech. *Methanothermus* jako chemoautolitotrofní rod redukuje oxid uhličitý vodíkem za vzniku methanu. Tento methanogen byl izolován pouze z oblasti horkých pramenů v Kerlingarfjöll na Islandu. Je tedy možné, že je v této oblasti endemickým druhem. Rod *Desulfurococcus*, *Sulfophobococcus* a *Thermosphaera* jsou obligátní heterotrofy. Zatímco *Desulfurococcus* respiruje na síře, pro *Sulfophobococcus* a *Thermosphaera* je elementární síra inhibítoem. [15]

3.3.2.2 Podmořské hydrotermální systémy

V podmořských oblastech se jako zástupci bakteriálního rodu vyskytují *Thermotoga* a *Aquifex*. *Thermotoga* fermentuje různé sacharidy jako jsou glukosa, škrob nebo xylany. Konečným produktem bývá většinou acetát, L-laktát, H₂ nebo CO₂. [15] Avšak vodík je inhibítoem pro růst, proto musí být v průběhu kultivace odstraňován. V přítomnosti elementární síry dochází k reakci s vodíkem za vzniku H₂S a ke zpomalení růstu nedochází.

Aquifex pyrophilus je striktní chemolitoautotrofní mikroorganismus rostoucí za mikroaerofilních podmínek. Jako donor elektronů pro jeho reakce slouží H₂ nebo S⁰, konečným produktem je voda nebo H₂SO₄. Alternativně mohou být redukovány dusičnany. *Aquifex pyrophilus* roste při teplotách vyšších jak 95 °C. Tuto schopnost žádný jiný zástupce bakteriální domény nemá.

Hlavními zástupci mořských oblastí domény Archaea jsou *Pyrolobus*, *Pyrodicticum*, *Methanopyrus*, *Methanococcus*, *Thermococcus*, *Pyrococcus* a *Archaeoglobus*. *Pyrolobus fumarii* dokáže prosperovat při 113 °C. To je teplota, při které žádný jiný doposud objevený organismus žít nedokáže. Řadí se mezi fakultativní anaeroby obligátně chemolitotrofní. energii získává redukcí dusičnanů, thiosíranů nebo kyslíku. Členové rodu *Pyrodicticum* a *Methanopyrus* rostou při teplotách převyšujících 110 °C. Buňky *Pyrodicticum* mají nepravidelný diskovitý tvar a tvoří unikátní síť kanálků (tubulů) a plošek. Jako chemolitoautotrofní mikroorganismy redukují síru. *Pyrodicticum abyssii* se řadí mezi heterotrofně rostoucí druhy fermentující peptidy. Různé organické substráty jako proteiny, sacharidy nebo komplexní organické substráty využívají ke svému růstu členové rodu *Pyrococcus*. Růst při pH větším než 10,5 je typický pro *Thermococcus alcaliphilus*. Příslušník stejného rodu *Thermococcus chitonophagus* se vyznačuje schopností degradovat chitin.

V ropných nádržích byly nalezeny zástupci dvou již zmíněných rodu *Thermococcus* a *Pyrococcus*. [12]

Tab. 2: Přehled zdrojů energie hypertermofilů. [16]

Typ výživy	Reakce jako zdroj energie	Rod
Chemoautotrofní	$H_2 + S^0 \rightarrow H_2S$ $2 H_2 + O_2 \rightarrow 2 H_2O$ $3 S + 3 O_2 + 2 H_2O \rightarrow 2 H_2SO_4$ $4 FeS_2 + 15 O_2 + 2 H_2O \rightarrow 2 Fe_2(SO_4)_3 + 2 H_2SO_4$ $4 H_2 + SO_4^{2-} + 2H^+ \rightarrow 4 H_2O + H_2S$ $4 H_2 + CO_2 \rightarrow 2 H_2O + CH_4$	<i>Thermoproteus</i> <i>Acidianus</i> <i>Sulfolobus</i> <i>Sulfolobus</i> <i>Archaeoglobus</i> <i>Methanopyrus</i>
Chemoheterotrofní	organická sloučenina + S \rightarrow H ₂ S + CO ₂ organická sloučenina + SO ₄ ²⁻ \rightarrow H ₂ S + CO ₂ organická sloučenina + O ₂ \rightarrow H ₂ O + CO ₂ organická sloučenina \rightarrow CO ₂ + karboxy kyselina organická sloučenina \rightarrow CO ₂ + H ₂	<i>Thermococcus</i> <i>Archaeoglobus</i> <i>Sulfolobus</i> <i>Staphylothermus</i> <i>Pyrococcus</i>

3.4 Mechanismus adaptace

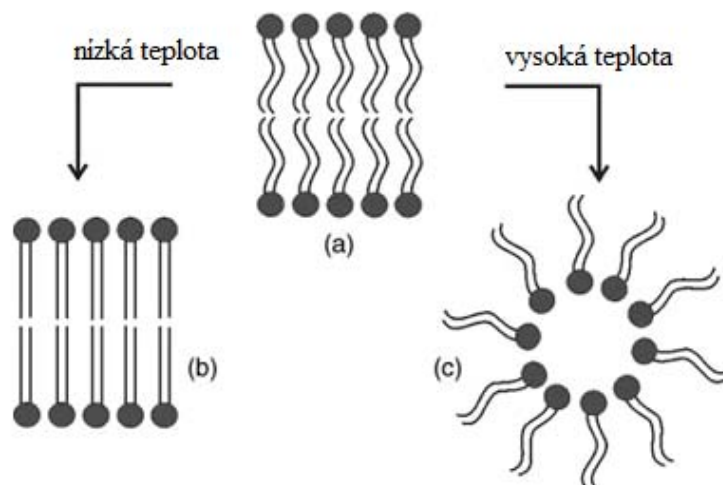
Je nutné, aby všechny buněčné komponenty byly odolné vůči teplotě. Nejvíce citlivé na teplo jsou lipidy, nukleové kyseliny a proteiny, a proto je výzkum zaměřen zejména na ně.

3.4.1 Nukleové kyseliny

Při teplotě nad 70 °C běžně dochází k denaturaci deoxyribonukleové kyseliny. U hypertermofilních mikroorganismů je stabilita nukleové kyseliny zvýšena přítomností jednomocných a dvoumocných solí, které zastíňují negativní náboje fosfátových skupin. Navíc KCl a MgCl₂ chrání DNA před depurinací a hydrolyzou. Vzrůst teploty tání DNA u hypertermofilů byl také připisován většímu obsahu G + C páru bází, které se vyskytují u těchto druhů častěji než u druhů mesofilních. Bylo však zjištěno, že obsah těchto bází není tak výrazný, aby teplotu tání významně ovlivňoval. Za stabilitu DNA při zvýšené teplotě je zodpovědná zejména IA DNA topoisomerasa (reverzní gyrasa) způsobující pozitivní nadšroubovicové vinutí DNA, které kovalentně uzavřenou DNA stabilizuje. [2,5]

3.4.2 Membránové lipidy

Se zvyšující se teplotou roste i fluidita membrány. Pro optimální funkci membrány je nezbytné udržet nízkou koncentraci hexagonální fáze (obr. 2c), která vzniká z fáze kapalina-krytal za vysoké teploty (obr. 2a). Fluidita membrány je řízena poměrem fosfatidylethanolaminu (PEA) a fosfatidylcholinu (PC), strukturou acylové řetězce, jeho délkou, umístěním a symetrií nenasycených řetězců. [2,5] Snížení fluidity membrány je spojeno s vyšším obsahem nasycených nerozvětvených mastných kyselin, existencí silnějších hydrofobních interakcí a zvýšeným obsahem fosfolipidů. [17] Jak již bylo zmíněno, u archaea se místo typických esterových vazeb v lipidech nacházejí vazby etherové. Tyto etherové vazby jsou působením zvýšené teploty degradovány méně ochotně než vazby esterové. Lipidy některých druhů hypertermofilních archaeí jsou charakteristické dibifytanylglycerol tetraetherovými membránovými motivy, které vytváří cyklopentanový kruh, který je stabilnější při zvýšené teplotě. [2,5]



Obr. 3: Uspořádání membránové lipidové dvojvrstvy v závislosti na teplotě:

(a) fáze kapalina-krytal přechází za nižších teplot do

(b) gelové fáze, nebo za vysoké teploty do (c) hexagonální fáze. [5]

3.4.3 Enzymy

Enzymy z termofilních mikroorganismů mají unikátní vlastnosti jako je teplotní, chemická a pH stabilita. Základem stability enzymů je hutnější sbalování proteinů, optimální rozložení náboje, minimalizace hydrofobního povrchu, stabilizace helixu a seskupení podjednotek. Tvorba oligomerů rovněž přispívá ke stabilitě.

Maximální účinnosti balení lze dosáhnout vyplněním dutin v molekulární struktuře a zvýšením hydrofobicity v těchto dutinách. Vyšší hladina isoleucinu, alaninu a prolinu se podílí na vyšší efektivitě balení do hydrofobních dutin a na mimořádné stabilitě smyček. Stabilizace helixu je závislá na výskytu aminokyselinových reziduí. Aminokyseliny, které jsou rozvětvené na β -uhlíku (např. valin, isoleucin nebo threonin) způsobují více konformačních omezení, a proto se v termostabilních proteinech vyskytují méně často. Dalším způsobem jak stabilizovat protein je přítomností více vazeb mezi polypeptidovými řetězci jako jsou vodíkové vazby a disulfidické můstky, které zvyšují konformační rigiditu. Významným stabilizačním faktorem jsou rovněž iontové páry, které jsou uspořádány v rozsáhlých sítích na povrchu enzymu. Při teplotě nad 100 °C je inaktivace proteinů způsobena hlavně chemickou modifikací proteinu než nevratným odvíjením. Příkladem je deaminace asparaginu a glutaminu nebo oxidace cysteinu, methioninu a tryptofanu. Enzymy s nižší úrovní těchto aminokyselin jsou potom méně náchylné k degradaci chemickou modifikací.

Ačkoli je většina enzymů vnitřně stabilních, některé intracelulární enzymy získaly svou stabilitu z intracelulárních faktorů životního prostředí. Přítomnost solí, koenzymů, substrátů, aktivátorů nebo obecných stabilizátorů (termamin, sorbitol) může stabilizovat enzym. Manipulací s podmínkami životního prostředí lze někdy dosáhnout vyšší stability než použitím genového inženýrství. [18]

3.5 Využití

Vzhledem k vysokým teplotám při růstu jsou vysoce teplotně stabilní i enzymy, což je velmi atraktivní pro biotechnologické aplikace. [15] Termofilní hydrolasy jako proteasy, lipasy, amylasy a xylanasy se uplatňují při výrobě detergentů, ve škrobárenství, v papírenském nebo mlékárenském průmyslu. Různé metabolity z hypertermofilů mohou vést k objevu nových léčiv. Příkladem je *Thermococcus*, který produkuje organické sloučeniny síry podobné lethioninu, z nichž některé jsou farmaceuticky aktivní. Hypertermofily jsou přímo využívány i v technických procesech. Rod *Sulfolobales* se používá při bioloužení sulfidických rud a při odsiřování uhlí. Druhy redukující sulfity se používají v bioremediaci za účelem odsiřování průmyslových odpadních plynů. [12]

3.5.1 Uplatnění v molekulární biologii

3.5.1.1 DNA polymerasy

DNA polymerasy jsou klíčovými enzymy při replikaci DNA. V současné době hrají hlavní roli v několika molekulárních biologických aplikacích jako je amplifikace DNA, její sekvencování a značení. Mimořádný pokrok byl dosažen v reakci PCR. V první PCR reakci byla použita DNA polymerasa bakterie *Escherichia coli*, která je teplotně labilní, a proto musela být přidávána v průběhu celého cyklu vždy po denaturaci a hybridizaci primeru. Dostupnost termostabilní DNA polymerasy nesmírně usnadnila automatizaci termálního cyklu. Taq polymerasa z *Thermus aquaticus* je první popsaná termofilní polymerasa a je stále hojně v PCR využívána. [18] Komerčně užívané jsou rovněž *Thermotoga maritima*, *Thermococcus litoralis* a *Pyrococcus furiosus*. [12]

3.5.1.2 DNA ligasy

DNA ligasy jsou optimálně aktivní v rozmezí teplot 45 až 80 °C. První termostabilní ligasa byla objevena v *Thermus thermophilus* HB8 v roce 1984. DNA ligasy jsou vynikajícím doplňkem k PCR technologii. Tyto enzymy jsou ideální pro ligaci přilehlých oligonukleotidů, které jsou hybridizovány na stejné cílové DNA. Tato vlastnost může být použita pro ligázovou řetězovou reakci (amplifikace DNA), analýzu mutací nebo pro syntézu genů. [19]

3.5.1.3 Proteasy

PRETAQ proteasa izolovaná z rodu *Thermus* Rt41A se používá při purifikaci DNA nebo RNA a při rozrušení buněčných struktur před metodou PCR. Proteasa S z *Pyrococcus furiosus* se vyznačuje vysokou přesností a je využívána pro fragmentaci proteinů před sekvencováním peptidu. Jiné hypertermofilní proteasy se používají pro N- nebo C-terminální proteinové sekvencování. Většina restriktivních endonukleáz je izolována z kmenů *Bacillus* a *Thermus* a jejich optimální aktivita je v rozmezí teplot 50 až 65 °C. [19]

3.5.2 Aplikace ve škrobárenství

Většina průmyslových procesů vyžaduje hydrolýzu škrobu na glukosové, maltosové nebo oligosacharidické sirupy. Kvašením těchto sirupů pak dochází k výrobě nejrůznějších chemických látek (ethanol, kyselina citronová). Zpracování škrobu obvykle zahrnuje dva kroky, zkapalňování a sacharifikaci, které probíhají za vysokých teplot.

3.5.2.1 α -Amylasy

α -Amylasy jsou endoaktivní enzymy, které štěpí α -1,4-glykosidické vazby. Používají se v první fázi přeměny škrobu. Při této fázi dochází k zahřívání škrobu ve vodě, což vede k nabobtnávání a vzniku želatiny. Dále je pak provedeno samotné zkapalnění, při kterém se využívají termostabilní α -amylasy. Nejvíce stabilní je α -amylasa z *Pyrococcus woesei*, která zůstává aktivní v průběhu 4 hodin v autoklávu při 120 °C. [18,19]

3.5.3 Bělení papíru

Xylan je hlavní polymerní složkou hemicelulosy. Xylanasy jsou enzymy katalyzující hydrolyzu xylanu. Právě tyto xylanasy mohou být použity při bělení papíru. Velký zájem budí to, že při jejich použití je sníženo množství použitého chloru a tím i dochází ke snížení vlivu na životní prostředí. Během enzymatické části procesu bělení dochází k hydrolyze polysacharidických řetězců ligninu a tím se vláknitá struktura otevírá. Takto se sníží spotřeba chemikálie při samotném bělení chlorem a zvýší optický jas. Některé kroky probíhají při teplotách nad 70 °C, proto je využití termostabilních enzymů vhodné, aby nemuselo docházet k ochlazování před provedením enzymatické reakce. Hypertermofilní xylanasy byly izolovány z rodu *Thermotogales*. [18,19]

3.5.4 Čištění odpadních vod

Při biologickém čištění odpadních vod se využívají zejména mikroorganismy, které jsou schopné degradace organických polutantů. V biologickém stupni čištění s normálním zatížením se odstraní pouze takové množství živin (solí dusíku a fosforu), které může být zabudováno do buněčné hmoty. Rozkladné procesy mohou probíhat buď anaerobně nebo aerobně. Za přístupu kyslíku (aerobně) jsou organické látky rozkládány na CO₂ a H₂O, zatímco při anaerobním procesu může docházet k přeměně na methan. Aerobní biologické čištění se využívá u silně znečištěných vod a při likvidaci kalů tzv. vyhníváním. Při aerobním čištění odpadních vod jsou mikroorganismy buď na pevné náplni filtru v imobilizované kultuře (biofiltr) nebo jsou volně unášeny ve vodné fázi. Průmyslově se využívá např. aerobní termofilní stabilizace kalů známá pod označením AEROTHERM. [20] Výhodou použití mikroorganismů adaptovaných na vysoké teploty jsou zejména vysoká rychlost biodegradace, nízké výnosy kalů a rychlá inaktivace patogenních mikroorganismů. Negativními aspekty naopak je špatná flokulace kalu při vysoké teplotě, náklady na zvyšování teploty reaktoru a problémy s pěněním. [21]

4 PSYCHROFILNÍ MIKROORGANISMY

4.1 Charakteristika

V chladném prostředí bylo objeveno mnoho rozmanitých druhů zahrnující zástupce archaeí, bakterií i eukaryot. Organismy vyskytující se za nižších teplot lze dělit na psychrotolerantní (také nazývány psychrotrofní) a psychrofilní. Psychrotolerantní mikroorganismy mohou prosperovat za teplot, při kterých dochází k tuhnutí vody, ale jejich růst dosahuje maximální rychlosti při teplotách přesahujících 20 °C. U psychrofilních mikroorganismů je optimální teplota pro růst pod 15 °C a růst již není možný, pokud teplota přesáhne 20 °C. [22]

4.2 Oblasti výskytu

Pokud vezmeme v úvahu rozsah trvale chladných lokalit, větší část naší planety je vystavena nízkým teplotám, často pod 0 °C. Tato prostředí zahrnují mimo jiné Antarktidu (obr. 4), arktické a horské oblasti, ale i hlubokomořské vody pokrývající 3/4 povrchu naší planety. [23] Psychrofilní mikroorganismy se nacházejí ve vodě (sladké, slané, stojaté i tekoucí), v půdě, v symbióze s rostlinami nebo chladnokrevnými živočichy. [12] Často jsou to polyextrémofilní mikroorganismy, což znamená adaptaci nejen na nízké teploty, ale velice často také na další podmínky prostředí. V sedimentech na dně oceánů, které některé psychrofilní mikroorganismy osidlují, čelí mikrobiální buňky nejen extrémně nízkým teplotám, ale i vysokému hydrostatickému tlaku. Proto se tyto organismy často označují jako baro-psychrofilní. Mikroorganismy vyskytující se na mořských ledovcích jsou vystaveny extrémně nízkým teplotám a rovněž vysoké koncentraci solí, a proto se často označují jako halo-psychrofilní. Na sněhové pokrývce ledovců a na trvale zasněžených horských štítech se musí mikroorganismy adaptovat také na silné ultrafialové záření. Endolytická mikrobiální společenstva lišejníků, kvasinek, cyanobakterií a heterotrofních bakterií, která je možné nalézt na skalách v suchých pouštích Antarktidy, se dlouhodobě setkávají s nedostatkem vody a živin. V alpských převisích a vysokohorských skalních puklinách jsou psychrofilní mikroorganismy vystaveny naprosté tmě a tímto se řadí mezi trogo-psychrofilny. [24]



Obr. 4: Antarktida, jako zdroj mnoha druhů psychrofilů a jiných extrémofilů. [25]

4.3 Psychrofilny mezi mikroorganismy

První bakterie schopná růstu při nízkých teplotách byla izolována v roce 1887 z konzervované ryby. Od této doby proběhlo mnoho studií s psychrofilními mikroorganismy izolovanými z půdy, vody, ledovců, sněhu nebo ledu. [12] Nejčastěji izolované druhy jsou:

- ❖ Gramnegativní bakterie: *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Moritella*, *Polaromonas*, *Psychroflexus*, *Polaribacter*, *Vibrio* a *Pseudomonas*.
- ❖ Grampozitivní bakterie: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*.
- ❖ Archaea: *Methanogenium*, *Methanococcoides* a *Halorubrum*.
- ❖ Kvasinky: *Candida* a *Cryptococcus*.
- ❖ Mikroskopické houby: *Penicillium* a *Cladosporium*.
- ❖ Mikroskopické řasy: *Chloromonas*. [24]

4.4 Adaptace na nízké teploty

Prizpůsobení mikroorganismů na extrémní chlad zahrnuje zejména změny na úrovni cytoplazmatické membrány a syntézu enzymů schopných udržovat svou katalytickou aktivitu za nízkých teplot. [26]

4.4.1 Struktura membránových lipidů

Fluidita membrány klesá při nízkých teplotách a při zvyšování teploty naopak roste. Pokud dojde ke snížení teploty, organismus často tento problém řeší zvýšením poměru nenasycených mastných kyselin k nasyceným mastným kyselinám v cytoplazmatické membráně. [2] Dále také dochází ke zkracování délky řetězce a k větvení mastných kyselin. [12] Fluidita membrány je rovněž částečně řízena poměrem fosfatidylethanolaminu a fosfatidylcholinu. Poměr PEA:PC u organismů adaptovaných na chlad je vyšší než u organismů vyskytujících se v mírných podmínkách. Větší množství PEA způsobuje vyšší flexibilitu a tím je minimalizována tvorba gelové fáze (obr. 2b), ke které za nižších teplot obvykle dochází. [5]

4.4.2 Enzymy adaptované na chladné prostředí

Pokud chtějí mikroorganismy přežít v chladnějším prostředí, jednou z nejdůležitějších věcí je udržení schopnosti syntézy enzymů, které jsou schopné optimálního výkonu za nízkých teplot. [26] Psychrofilní mikroorganismy mají enzymy s vysokou katalytickou aktivitou při teplotě kolem 0 °C, což jim umožňuje prosperovat při teplotách, při kterých by již byly základní funkce mesofilních mikroorganismů zastaveny. Tyto enzymy mají obvykle o 20-30 °C nižší teplotní optimum než odpovídající enzym z mesofilního druhu. [27]

Obecně platí, že při poklesu teploty dochází ke snížení kinetické energie reakce. Tato skutečnost je kompenzována zvýšením flexibility struktury chladově aktivních enzymů. Zvýšení konformační flexibility enzymu je nutné pro tvorbu vhodného komplexu enzym-substrát, kde flexibilita tedy kompenzuje nízkou aktivační energii enzymu. Výsledkem je nejen vysoká specifická aktivita za nižších teplot, ale i teplotní labilita enzymů. Flexibilita enzymu je dosaženo zejména snížením základní hydrofobicity molekuly, omezení iontových a elektrostatických interakcí nebo interakcí mezi aromáty. Žádoucí je naopak zvýšení přítomnosti skupin, které ochotně reagují s rozpouštědlem. Proteiny adaptované na chlad mají vyšší obsah aminokyselinových zbytků, které mají menší sterické požadavky. Zvýšená je frekvence výskytu glycinu, snížená naopak přítomnost prolinu nebo argininu. [5,22]

4.4.3 Proteiny proti promrznání

Proteiny zabráňující promrznutí (antifreeze proteins) mají schopnost vázat krystaly ledu na svůj rozsáhlý povrch a tím vytvářet termální hysterezi a snižovat teplotu, při které jsou schopné mikroorganismy růst. APFs byly prokázány v bakteriích obývajících antarktická jezera, příkladem může být *Marinomonas primoryensis*. [28]

4.5 Využití

Psychrofilní mikroorganismy a jejich produkty metabolismu nebo enzymy jsou velkým rezervoárem pro biotechnologické aplikace. [12] Enzymy aktivní při nízkých teplotách mají dvě vlastnosti, které jsou v biotechnologické aplikaci využívány nejčastěji. Jednak je to katalytická aktivita enzymu za nízké teploty, dále pak nízká termostabilita za zvýšené teploty. Ekonomickou výhodou používání enzymů z psychrofilních mikroorganismů je především úspora energie, jelikož zde nejsou požadavky na nákladné vytápěcí kroky. Činnost v chladném prostředí a v zimním období poskytuje zvýšené reakční výnosy, obstarává vysokou úroveň stereospecifity, minimalizuje nežádoucí chemické reakce, které mohou nastat za vyšších teplot. Výhodou také je, že vzhledem ke své teplotní labilitě je možné v případě potřeby rychle a snadno enzym deaktivovat. Tato schopnost má zvláštní význam v potravinářském průmyslu, kde je důležitá k zabránění jakékoli modifikace původně na teplo citlivého substrátu nebo produktu. [22]

4.5.1 Detergenty

Enzymy jako proteasy, lipasy, α -amylasy a celulasy se využívají jako přísady do detergenčních prostředků. Praní za studena je výhodné zejména ke snížení spotřeby energie a rovněž ke snížení opotřebení materiálu. Nevýhodou naopak je jejich nestabilita v okamžiku přidání do konečného produktu a rovněž jejich uskladňování. Tento problém se řeší používáním rekombinantních enzymů se zvýšenou stabilitou, zatímco vysoká katalytická účinnost při nízkých teplotách je zachována. [29]

4.5.2 Textilní průmysl

V textilní výrobě se hojně využívají bavlněná vlákna. Často z tkání těchto vláken vyčnívají vlákna vedlejší, která se podílejí na tvorbě žmolků. Dochází tak ke snižování hebkosti a celkové změně vzhledu oděvu. Tyto vlastnosti se zhoršují s každým dalším praním oděvu. Za vhodných podmínek lze provést předběžnou úpravu s celulasami, při které dochází k redukci vyčnívajících vláken, snižování tvorby žmolků, zvýšení odolnosti a měkkosti tkáně. Na druhou stranu je tato úprava pomocí běžných celulas doprovázena ztrátou mechanické odolnosti hlavního vlákna v důsledku nemožnosti inaktivace enzymu. Tento problém lze odstranit používáním celulasy z chladově aktivních enzymů, kterým lze snížit teplotu procesu a zvýšit mechanickou odolnost v důsledku spontánní rychlé inaktivace enzymů, která je možná vzhledem k jejich teplotní nestabilitě. [29]

4.5.3 Potravinářský průmysl

Potenciální využití chladově aktivních enzymů v potravinářském průmyslu je velmi hojné. Při výrobě džusů se uplatňují pektinasy, které usnadňují extrakci, čiření a snižují viskozitu. V masném průmyslu při zpracování masa se využívají proteasy, které způsobující měknutí masa. Enzymy jako amylasy, proteasy a xynalasy přispívají ke snížení doby kynutí těsta a ke zlepšení jeho vlastností. V mlékárenském průmyslu se využívá β -galaktosidasa neboli

laktasa. [29] Tento enzym katalyzuje hydrolýzu laktosy na monosacharidy, D-glukosu a D-galaktosu. [30] Tato reakce je nutným krokem pro správné trávení laktosy a v případě, že laktasa není v zažívacím traktu přítomna nebo nemá dostatečnou aktivitu, projeví se tzv. laktosová intolerance (většinou trávicí potíže, nevolnosti a bolesti hlavy). V dospělé populaci je laktosová intolerance velmi rozšířená po celém světě, protože laktasa je indukovatelný enzym a poté, co dítě přestane být kojeno, postupně ztrácí aktivitu. Podmínky a vlivy různých faktorů na enzymovou hydrolýzu laktosy byly podrobně zkoumány, laktasa byla izolována z různých zdrojů. [31] Komerčně je využívána β -galaktosidasa z *Kluyveromyces lactis*. Při ošetření mléka jsou pro udržení enzymové aktivity nejdůležitější teplota a tlak. Ideální β -galaktosidasa by měla být aktivní při pH 6,7-6,8 a teplotě 4 až 8 °C během expedice a skladování. Z toho hlediska je ideální chladově aktivní β -galaktosidasa z *Pseudoalteromonas haloplanktis*, izolovaná z Antarktidy. [30]

4.5.4 Bioremediace

Mikroorganismy adaptované na chladné prostředí jsou schopné degradace kontaminantů nacházejících se v půdě nebo ve vodním prostředí. Jejich činností v chladném prostředí dochází např. k biodegradaci ropných uhlovodíků. Na degradaci alifatických uhlovodíků se podílejí druhy *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* spp. nebo *Rhodococcus* spp. *Pseudomonas putida* zajišťuje degradaci aromatických uhlovodíků a společně s *Mycobacterium* sp. degradaci polycyklických aromatických uhlovodíků. [24]

4.5.5 Mrazírenský průmysl

Tvorba ledových zárodků byla zaznamenána jako vlastnost mnoha psychrotolerantních bakterií již v roce 1970. Rody *Pseudomonas*, *Erwinia* a *Xanthomonas* způsobují tvorbu ledových krystalů na povrchu listů nebo květu produkcí speciálních proteinů, které jsou schopné zaočkování tvorby ledu při teplotě v rozmezí -2 až -5 °C, kdy by jinak voda mohla zůstat v podchlazeném a tekutém stavu. Tyto proteiny jsou složeny ze tří domén, unikátní hydrofobní N-terminální domény, hydrofilní C-terminální domény a centrální domény, která je složena z opakujících se sekvencí. Bylo navrženo mnoho modelů vysvětlujících jakým způsobem proteiny iniciují tvorbu ledových krystalů z vody (Wolber a Warren, 1989; Kajava a Lindow, 1993). Proteiny našly uplatnění např. při výrobě zmrzliny a umělého sněhu a jako přísady ve zmrazených výrobcích. Geny zodpovědné za tvorbu těchto speciálních proteinů jsou tzv. *ina* geny. Bakterie, kterým tento gen chybí v důsledku možné genetické úpravy, se využívají jako ochrana proti mrazu. [12]

5 HALOFILNÍ MIKROORGANISMY

5.1 Charakterizace

Halofily lze definovat jako mikroorganismy, které pro svůj optimální růst vyžadují koncentraci solí vyšší jak 2,5 M NaCl. [5] Organismy schopné růst za zvýšené koncentrace soli, ale s optimální růstovou rychlostí bez přítomnosti solí, jsou pak považovány za halotolerantní. Neobvyklá je skupina mikroorganismů schopná růstu v rozsahu koncentrace soli od nuly po saturaci a s optimální růstovou rychlostí v přítomnosti soli. Tyto mikroorganismy se označují jako haloversatilní. [12]

Schopnost přežít v hypersalinním prostředí je dána schopností udržet osmotickou rovnováhu. [32] Halofilní mikroorganismy reagují na zvýšení osmolarity akumulací osmoticky aktivních látek v cytosolu, které je chrání před dehydratací a vysycháním cytoplazmy. Nejúčinnější osmotikum u většiny prokaryot je glycin betain. Výjimkou je *Halobacteriaceae*, kde se jako osmoticky aktivní využívají K^+ . [2] Mnozí zástupci mají v nepřítomnosti kyslíku schopnost fototrofního růstu, při kterém se využívá energie světla, které je pohlcované bacteriorodopsinem, a ATP-syntasa. [33]

5.2 Hypersalinní prostředí

Halofilní mikroorganismy se vyskytují v solných jezerech jako jsou Mrtvé moře nebo Velké solné jezero (Utah). [34] Obě jezera jsou bohatá na Na^+ a Cl^- , Mrtvé moře obsahuje navíc ještě Mg^{2+} . [12] Tyto jezera jsou často zbarvena červeně z důvodu výskytu mnoha pigmentovaných mikroorganismů, jako jsou halofilní archaea nebo zelená řasa *Dunaliella* bohatá na β -karoten (obr. 5). Dalším prostředím pro tyto mikroorganismy jsou slané potraviny a slané půdy. [34] Extrémní halofily byly izolovány z hypersalinního prostředí vzniklého odpařením mořské vody. [35]



Obr. 5: Řada *Dunaliella salina* se vyskytuje v mořských solných oblastech. Vysoká koncentrace karotenoidů slouží jako ochrana před intenzivním zářením a teplotou, kterým je vystavena. [36]

5.3 Taxonomie

Halofily mají své zástupce ve všech třech doménách: archaea, bacteria i eukarya. Avšak ve fylogenetickém stromu života je jen několik málo jednotných skupin, které jsou složeny výhradně z halofilů. Ve stejné fylogenetické větvi se pak nacházejí halofilní i nehalofilní zástupci, kteří se liší požadavky na sůl a tolerancí k ní. [37]

5.3.1 Halofilní archaea

V doméně archaea lze nalézt nejvíce mikroorganismů, kteří vyžadují prostředí s vysokou koncentrací soli. [37] Termín halobakterie se vztahuje k extrémně halofilním archaeím s červenou pigmentací. Halobakterie jsou členy řádu *Halobacteriales*, který zahrnuje pouze jednu čeleď *Halobacteriaceae*. Většina halobakterií vyžaduje pro svůj růst a zachování strukturní integrity buněk koncentraci soli okolo 1,5 M NaCl. Pokud v hypersalinní vodě dojde k saturaci, stávají se zde dominantní mikrobiální populací. Rody vyskytující se ve vodách, které jsou blízko bodu saturace, jsou *Haloarcula*, *Halobacterium* a *Halorubrum*. Halobakterie mohou být od halofilních bakterií rozlišeny na základě archeálních vlastností, zejména přítomností lipidů s etherovými vazbami. Většina je zbarvena červeně nebo oranžově díky přítomnosti karotenoidů C₅₀, některé jsou bezbarvé. Fialové zbarvení je možné pozorovat u druhů, které ve svých membránách obsahují bakteriorhodopsin. Karotenoidní pigmenty halobakterií jsou schopné pohlcovat sluneční záření, zvyšovat pokojovou teplotu.

Mnoho hypersalinních prostředí vykazuje také metanogenezi v důsledku přítomnosti halofilních metanogenů. Izolace je možná ze slaných jezer, slaného alkalického prostředí. Mikrobiální studie v těchto ekosystémech potvrzují, že H₂ není významným zdrojem energie pro metanogenezi v hypersalinním prostředí, pravděpodobně kvůli vysoké koncentraci sulfátů v těchto biotopech. Jako hlavní substrát jsou zde nízkomolekulární látky jako např. methylamin. Z tohoto hlediska je zde nutná přítomnost bakterií produkujících methylamin. Hlavním zástupcem halofilních methyltrofních metanogenů je rod *Methanohalophilus*. [12] Tento rod spolu s dalším zástupcem halofilních metanogenů *Methanohalobium* patří do řádu *Methanosarcinales*. [37]

5.3.2 Halofilní bakterie

Mírné halofilní bakterie a haloversatilní bakterie vyžadují koncentraci solí v rozsahu 1,5 až 3 M. Mnoho izolovaných mírných gram-negativních halofilů bylo přiřazeno k rodům *Halomonas* a *Halovibrio*. Jejich výskyt je v méně extrémních solných prostředích jako jsou např. sodná jezera. Několik halofilů rodu *Halomonas* a *Flavobacterium* bylo popsáno jako hlavní složka mikrobiální flóry antarktických jezer. Gram-pozitivní bakterie, které byly izolovány zejména ze solných půd, jsou zástupci rodů *Marinococcus*, *Sporosarcina*, *Salinicoccus*, *Bacillus*. [12]

5.3.3 Halofilní eukaryotické mikroorganismy

Horní limit koncentrace soli pro obratlovce je okolo 1,5 M. Nad tuto úroveň koncentrace soli se zástupci eukaryot vyskytují vzácně. Těmito výjimkami jsou např. Žábronožka solná (*Artemia salina*) nebo moucha rodu *Ephydra*. [12] Nejvíce byla prozkoumána zelená řasa *Dunaliella*, která se stala všeobecným modelem pro studium adaptace na extrémně slané prostředí pomocí organických osmotických kompatibilních roztoků, a také našla uplatnění v biotechnologických aplikacích. [37]

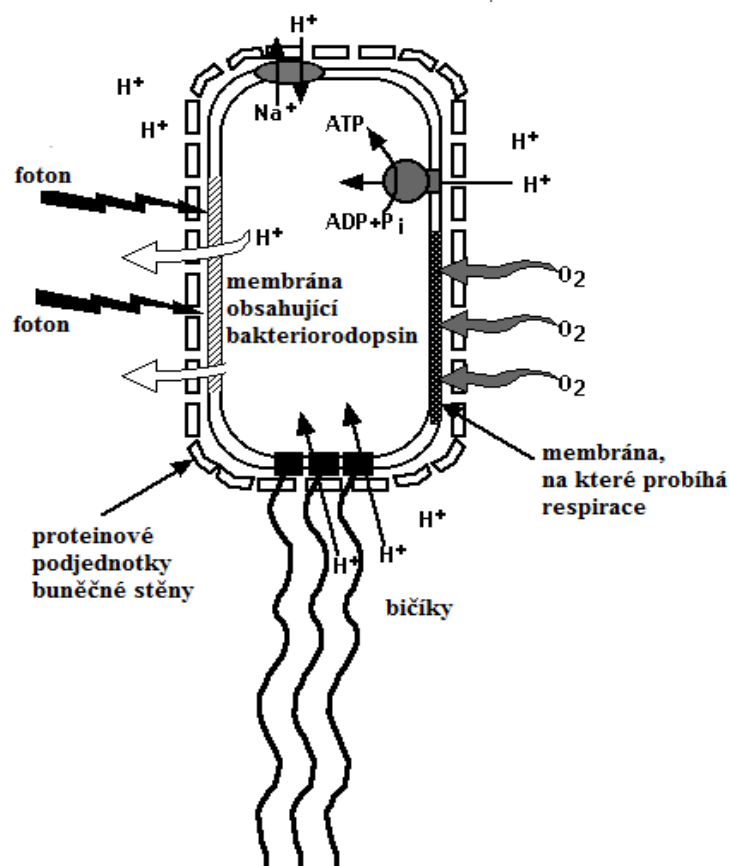
5.4 Mechanismus adaptace

5.4.1 Redukce osmotického tlaku

Základní vlastností všech halofilních mikroorganismů je skutečnost, že jejich cytoplazma musí mít přinejmenším stejnou osmolaritu jako okolní médium. Jsou dvě základní odlišné strategie, které tyto mikroorganismy pro udržení osmotické rovnováhy využívají. [37]

5.4.1.1 Akumulace intracelulárních iontů

Tato strategie je založená na akumulaci draselných a sodných iontů. [37] Uplatňují ji halobakterie a skupina anaerobních halofilních bakterií. Spíše než Na^+ je jako dominantní intracelulární kation využíván K^+ , jako dominantní anion pak Cl^- . U halobakterií je koncentrační gradient Na^+ přes cytoplazmatickou membránu uskutečňován pomocí aktivního antiportního systému Na^+/H^+ . Energie potřebná na přenos Na^+ ven z buňky je dodávána protonovým gradientem, který se vytváří během transportu elektronů v dýchacím řetězci nebo u některých druhů při absorpci světla bakteriorodopsinem (obr. 6). K^+ pravděpodobně pak vstupují do buněk pasivně, jako odpověď na membránový potenciál. [34] Akumulace intracelulárních iontů vyžaduje značnou adaptaci intracelulárního enzymatického systému na přítomnost soli. Je nutné, aby si proteiny udržely svou konformaci a aktivitu, i když je koncentrace soli blízká saturační koncentraci. Proteom těchto mikroorganismů má zvýšený podíl kyselých aminokyselin a u většiny proteinů dochází k denaturaci, pokud se vyskytnou v prostředí s nízkou koncentrací soli. [37]



Obr. 6: Energetická bilance rodu *Halobacterium*. [38]

5.4.1.2 Akumulace osmolytů

Druhá skupina halofilů produkuje nebo shromažďuje nízkomolekulární sloučeniny s osmotickým potenciálem. [12] Tyto osmolyty vyrovnávají osmotický tlak a umožňují funkci buňky pomocí běžných enzymů a proteinů, které by jinak při vysoké salinitě byly nefunkční. [39] Do této skupiny se řadí většina halofilních bakterií, halofilních metanogenních archaeí a eukaryotických řas a hub. [34] U prokaryot je známo velké množství osmolytů. Všechny jsou vysoce polární, obvykle bez náboje, nebo jako obojetné ionty. Běžnými osmolyty jsou cukry, glycin betain, tetrahydropyrimidiny (ektoiny), α -aminokyseliny (prolin, glutamin). Společnou vlastností osmoticky aktivních látek je kombinace polárních a relativně hydrofobních skupin. Díky těmto vlastnostem dochází k vylučování osmolytů z hydratační sféry proteinů. Toto vyloučení způsobuje pokles v entropii systému a stabilizaci proteinů. [12]

5.4.2 Proteiny v hypersalinním prostředí

Většina proteinů halobakterií obsahuje velké množství kyselých aminokyselin a malé množství zásaditých aminokyselin. Vysoká koncentrace kationtů uvnitř buňky může být zčásti potřebná k ochraně záporného náboje na povrchu proteinu. Příznivý je i vysoký obsah glutamátu, neboť glutamát má ze všech aminokyselin největší vaznost s vodou, což umožňuje zachovat hydratační sféru proteinu. Nevýhodou většiny proteinů halobakterií je skutečnost, že v prostředí s koncentrací soli menší než 1-2 M dochází k jejich denaturaci. [34] Od nehalofilních protějšků se rovněž liší i sníženou hodnotou pI, vysokým obsahem malých hydrofobních residuí (glycin, alanin, valin) a sníženým obsahem lysinu. [5]

5.4.3 Stabilizace membránové lipidové dvojvrstvy

U halofilních gramnegativních bakterií je odpovědí na zvýšenou koncentraci soli pokles v přítomnosti fosfatidylethanolaminu (PEA) a naopak zvýšení poměru anionických membránových lipidů fosfatidylglycerolu (PG) a difosfatidylglycerolu (DPG). Do řetězců mastných kyselin se rovněž více začleňují cyklopropany a uplatňují se dvojně vazby. [40] Hlavními složkami cytoplazmatické membrány u halobakterií jsou PG (4 %), PG-fosfát (65 %), PG-sulfát (4 %) a sulfáty glykolipidů (25 %). Lipidy obsahující sulfáty jsou přítomny pouze ve fotosyntetizujících membránách. [38]

5.5 Biotechnologické aplikace

Výhodou halofilů z hlediska biotechnologické aplikace je zejména nenáročnost jejich kultivace ve srovnání s ostatními extrémofily a rovněž menší nároky na aseptické podmínky při kultivaci. Zajímavá je syntéza enzymů při nízké vodní aktivitě, tj. v přítomnosti solí, ale také v organických rozpouštědlech. Pro biotechnologické využití slouží enzymy, proteiny, složky membrán i celé mikroorganismy. V lékařství se využívá protein z halobakterií, který se využívá k detekci protilátky proti produktům onkogenu u pacientů s rakovinou. V kosmetickém průmyslu se využívají komplexní lipidy zvané liposomy. V potravinářském průmyslu se jako kvalitní zdroj potravy pro sportovce nebo kosmonauty využívá cyanobakterie *Spirulina*, která je pro ně vhodná z hlediska nízkého obsahu nukleových kyselin a kvalitního spektra aminokyselin. [12]

5.5.1 Biodegradace organických sloučenin

Halofilní mikroorganismy jsou dobrými kandidáty pro bioremediaci v hypersalinním prostředí a čištění vod s vysokým obsahem solí. Extrémofilní halofilní archaea jsou schopny metabolizovat uhlovodíky. U rodu *Halobacterium* byla prokázána vysoká schopnost degradace C₁₀-C₃₀ alkanů v médiu obsahujícím 30 % NaCl. Příkladem jsou *Halobacterium salinarium*, *H. volcanii* a *H. distributum*. Halofily jsou schopné rovněž degradace aromatických sloučenin a organických rozpouštědel. *Halomonas organivorans* degraduje široké spektrum aromatických kyselin (např. kyselinu benzoovou, p-hydroxybenzoovou, salicylovou, fenylactovou). [41]

5.5.2 Produkce biopolymerů

Zavedení kontinuální kultivace halofilních archaeí sebou přinesla objev polyhydroxybutyrátu (PHB). *Halobacterium mediterranei* a *Alcaligenes eutrophus* produkují PHB jako prostředek pro ukládání energie z komplexních sacharidů a acetyl-CoA. [39] PHB je první izolovaný polyhydroxyalkanoát. Svými vlastnostmi se velmi podobá polypropylenu, který ve formě různých misek a fólií často používáme. Narozdíl od něj je však PHB rozložitelný v rozumném časovém horizontu. Rozklad PHB v prostředí skládky trvá řádově měsíce, u polypropylenu to mohou být až staletí. Nevýhodou PHB je, že se poblíž svého bodu tání rozkládá. Je tedy obtížné jej tavit a to znesnadňuje jeho zpracování. Zabudováním jiného polymeru do jeho struktury (např. 3-hydroxyvalerátu) a tím vytvoření kopolymeru má za následek eliminaci tohoto problému a rovněž dochází k výraznému zlepšení jeho mechanických vlastností. Právě možnost kopolymerizace nabízí široké možnosti přípravy materiálů o různých mechanických vlastnostech, ale také o různé biodegradabilitě a tedy potenciální možnost regulovat poločas rozpadu a mechanické vlastnosti připraveného materiálu. V dnešní době je uplatnění především jako speciální biodegradabilní a biokompatibilní materiál, a ne jako náhrada syntetických polymerů, jak bylo původně zamýšleno. Proces, ve kterém dochází k jeho izolaci je totiž finančně velice náročný. Uplatnění na trhu je spíše sporadické, PHB a kopolymer hydroxybutyrátu a hydroxyvalerátu se objevují pod obchodní značkou Biopol. [42]

5.5.3 Bakteriorodopsin

Bakteriorodopsin je membránový protein, který se vyskytuje pouze u mimořádně halofilních archaeí. Skládá se z proteinu opsinu a retinalu, což je molekula, která pohlcuje fotony. Pokud foton mající správném kvantum energie narazí na bakteriorodopsin, dojde ke konformační změně retinolu, která má za následek přenos protonu přes membránu. Bakteriorodopsin vytváří protonový gradient, který využívá ATP-syntasa k syntéze ATP za anaerobních podmínek. Bylo předloženo mnoho návrhů na užití bakteriorodopsinu v elektronice. Shockley-Ramova věta říká, že pohyb jednoho náboje, v tomto případě protonu, může vyvolat proud na sousední elektrodě. Tento indukovaný proud může být využit u fotodetektorů nebo elektronických senzorů. [39] Výsledkem jsou tedy biosenzory a bioelektronika. [12]

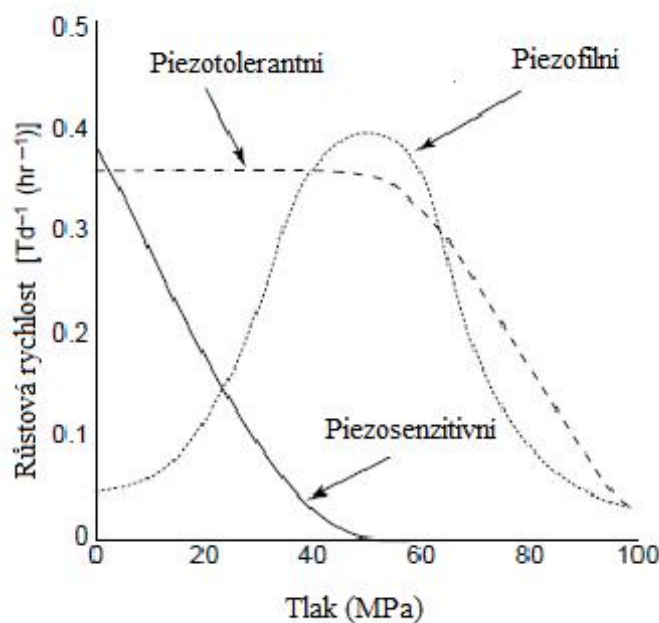
5.5.4 Osmoticky aktivní látky

Jak již bylo zmíněno, osmoticky aktivní látky jsou schopné stabilizovat hydratační sféru proteinu. Z tohoto důvodu je možné je použít jako ochránce vůči stresu nebo pro stabilizaci biomolekul, např. vakcín, které by bez jejich účinku nemohly být chlazeny. Stabilizovat je možné rovněž průmyslově využívané enzymy, které jsou funkční jen za extrémních podmínek. [12]

6 PIEZOFILY

6.1 Charakteristika

Mikroorganismy upřednostňující život za vysokého tlaku se označují jako piezofily (dříve nazývané barofily). Piezofilní mikroorganismy mají optimální rychlost růstu při tlaku vyšším než je tlak atmosférický. Piezotolerantní mikroorganismy jsou schopné růstu za vysokého tlaku, ale od piezofilních se liší tím, že optimální růstová rychlost těchto mikroorganismů je při hodnotách tlaku atmosférického. Citlivost na zvýšení tlaku vykazují mikroorganismy piezosenzitivní. Je ovšem nutné si uvědomit, že různé fyzikálně-chemické podmínky mohou velmi ovlivnit účinek vysokého tlaku na mikrobiální růstovou rychlost. Příkladem je *Shewanella benthica*, která vykazuje piezotolerantní růst při teplotě 4 °C (stejná rychlost růstu v rozmezí od 0,1 MPa do 50 MPa), ale při její optimální růstové teplotě 10 °C se chová jako piezofilní mikroorganismus (optimální rychlosti růstu je dosaženo až při tlaku 70 MPa). V této kapitole se jako piezofily budou označovat všechny mikroorganismy, které jsou schopny růstu za vysokého tlaku, tj. piezofilní a piezotolerantní. Schématické znázornění vztahu mezi mikrobiálními rychlostmi růstu a tlakem je uvedeno na obr. 7. [43]



Obr. 7: Vlastnosti mikrobiálního růstu při zvyšování hydrostatického tlaku. [43]

6.2 Prostředí s vysokým tlakem

Hlubiny moří jsou považovány za extrémní prostředí s vysokým hydrostatickým tlakem. Mořské mikroorganismy obývají prostředí, ve kterém jsou vystaveny tlaku od 0,1 až do 110 MPa. Dalšími extrémami tohoto prostředí jsou tma, nízká dostupnost živin a především nízká teplota (1–2 °C), s výjimkou hydrotermálních pramenů, kde teplota může dosahovat až 375 °C. Oceány mají průměrnou hloubku 3800 m a tlak 38 MPa. Na dně Mariánského příkopu, nejhlubším známém místě oceánu, je tlak 110 MPa. [43,44] Jako první byla z Mariánského příkopu izolována bakterie *Pseudomonas bathycetes*. [45] Prostředí

s vysokým tlakem jsou rovněž hluboká jezera (Bajkal, Vostok) a místa hluboko pod povrchem. [46]

6.3 Piezofily mezi mikroorganismy

Adaptace na vysoký tlak byla prokázána jak u eukaryot, tak i u prokaryot. První zahrnuje nižší eukaryota, obratlovce, ryby a dokonce i do velkých hloubek potápějící se mořské savce. Prokaryota mají své zástupce u archaeí i bakterií. Archaea jsou přítomna převážně v oblasti hlubokomořských hydrotermálních pramenů, bakterie obývají chladnější hlubokomořské lokality. [46] Piezofilní mikroorganismy lze rozdělit dle vztahu k teplotě. V tab. 3 jsou uvedeni zástupci termofilních, mezofilních a psychofilních piezofilů a zaměření jejich výzkumu. [43]

6.4 Adaptace na vysoký tlak

Vysoký tlak a nízká teplota snižují fluiditu membránové lipidové dvojvrstvy a tím potlačují její funkci. Piezofily tedy musí mít nějaký mechanismus, který umožňuje jejich lipidům adaptaci na hlubokomořské prostředí. Bylo prokázáno, že odpovědí na vysoký tlak je zvýšené množství nenasycených mastných kyselin v lipidech, které působí proti zvýšené viskozitě způsobené tlakem. Obecně byly bakterie považovány za neschopné produkovat polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Velký počet bakteriálních kmenů, izolovaných ze suchozemského prostředí a z mělkých moří, je schopen produkce mastných kyselin s řetězcem kratším než 20 uhlíkových jednotek. Avšak, bakterie izolované z hlubin moří obsahují ve svých lipidech PUFA jako jsou kyselina docosahexaenová (DHA, 22:6 (n-3)) a kyselina eicosapentaenová (EPA, 20:5 (n-3)). PUFA mají relativně nízké body tání, což napomáhá při udržování správné fluidity membránových lipidů. [47]

Reverzní regulace vnějších membránových proteinů tlakem byla prokázána u *Photobacterium profundum* SS9. Při vyšším tlaku (28 MPa) dochází k 10 až 100krát vyšší expresi OmpH proteinu, zatímco při tlaku 0,1 MPa je nejvyšší produkce OmpL proteinu. Navíc, při 40 MPa je exprimován další tlakem regulovatelný protein OmpI. Protein OmpH je považován za relativně nespecifický porin, který usnadňuje vstřebání živin při zvýšených oligotropních podmínkách v hloubkách moří. [48]

Přechod k helikální struktuře DNA je nejprostudovanějším aspektem DNA. Helikální struktura DNA je vysokým tlakem stabilizována. Experimentem byla prokázána vyšší stabilizace nativní DNA při tlaku 200 MPa než při tlaku 0,1 MPa za stejné teploty. Jiný experiment na druhou stranu poukázal na skutečnost, že u spor a fágů tlak způsobuje poškození DNA. [12]

K denuraci proteinu obvykle dochází při tlaku větším než 200–300 MPa. Nicméně působení tlaku nad 100 MPa již způsobuje strukturální změny proteinu, které vedou ke ztrátě funkce. [12] Interakce protein-protein je důležitá v různých biologických systémech zahrnujících multimerické enzymy, ribosomy, cytoskeletární a signální proteiny. Tyto interakce jsou velmi citlivé na zvýšení tlaku. Hydrostatický tlak způsobuje disociaci mnoha multimerických proteinů, jelikož tyto procesy jsou spojeny s negativními objemovými změnami. Působením tlaku dochází k solvataci nabitých skupin, které se podílejí na tvorbě solných můstků, a vystavení nepolárních skupin rozpouštědlu. Příkladem je disociace ribozomových podjednotek, která je *in vitro* usnadňována zvýšením tlaku, doprovázená negativní objemovou změnou –242 ml/mol. [43]

Tab. 3: Výzkum vlivu vysokého tlaku na piezofilní mikroorganismy. [43]

Mikroorganismus	Optimální růstové podmínky		Výzkum
	tlak	teplota	
Psychrofilní piezofily			
<i>Colwellia hadaliensis</i> BNL-1	75–94 MPa	2 °C	fyzilogie
<i>Moritella japonica</i> DSK1	50 MPa	15 °C	fyzilogie
<i>Moritella yayanosii</i> DB21MT-5	80 MPa	10 °C	membránové lipidy
<i>Photobacterium profundum</i> SS9	28 MPa	9 °C	Expresse genu, membránové proteiny a mastné kyseliny
<i>Photobacterium profundum</i> DSJ4	10 MPa	10 °C	fyzilogie
<i>Shewanella benthica</i> , kmeny	50–70 MPa	10–15 °C	fyzilogie, exprese genu, membránové mastné kyseliny
Termofilní piezofily			
<i>Methanococcus igneus</i>	51 MPa	90 °C	stabilita hydrogenasy za vysokého tlaku
<i>Methanococcus jannaschii</i>	75 MPa	86-90 °C	stabilita hydrogenasy za vysokého tlaku
	51 MPa	90 °C	metanogeneze
<i>Palaeococcus ferrophilus</i> DMJ	30 MPa	84 °C	fyzilogie
<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5	20–40 MPa	73–112 °C	syntéza proteinů
<i>Pyrococcus furiosus</i>	45 MPa	107,5 °C	stabilita GDH a DNA polymerasy za vysokého tlaku
<i>Thermococcus aggregans</i> TY	20 MPa	75 °C	fyzilogie
<i>Thermococcus barophilus</i> MP	40 MPa	85 °C	fyzilogie
<i>Thermotoga maritima</i>	51 MPa	95 °C	stabilizace GAPDH za vysokého tlaku
<i>Thermus aquaticus</i>	45 MPa	100 °C	stabilita DNA polymerasy za vysokého tlaku
Mezofilní piezofily			
<i>Desulfovibrio profundus</i> 500-1	15 MPa	30 °C	aktivita desulfurikace
<i>Pseudomonas</i> sp. BT1	10 MPa	30 °C	membránové mastné kyseliny
<i>Pseudomonas</i> sp. MS300	60 MPa	25 °C	produkce α -maltotetrahydrolasy

6.5 Uplatnění piezofilních mikroorganismů

Uplatnění lze nalézt při zpracování a sterilizaci potravinářských surovin, kde se vysoký tlak (až několik stovek MPa) uplatňuje při tvorbě gelu, škrobových zrn, při změně lipidové fáze, koagulaci nebo denaturaci bílkovin. Použití vysokého tlaku má stejný efekt jako vysoká teplota, s rozdílem, že použití tlaku vede k lepšímu uchování chuti a barvy. Navíc, enzymy, které mohou pracovat za zvýšeného tlaku a teploty mají velké výhody v biotechnologických aplikacích. Enzymatické reakce, které vedou k negativním změnám v objemu ($\Delta V < 0$), jsou při zvyšování tlaku upřednostňovány. Změna objemu může být použita jako metoda pro kontrolu reakční specifity. Například α -chymotrypsin katalyzuje hydrolýzu jak anilidu ($\Delta V < 0$), tak i esteru ($\Delta V > 0$). V reakční směsi, která obsahuje oba substráty

i α -chymotrypsin v organickém médiu, může být regulován průběh změnou tlaku ve prospěch jedné či druhé reakce. [49]

Membránové lipidy piezofilních bakterií obsahují téměř 70 % polynenasycených mastných kyselin, které pomáhají snižovat hladinu cholesterolu, chrání před kardiovaskulárními chorobami, snižují riziko vzniku rakoviny a jsou rovněž potřebné pro přirozený embryonální vývoj, zejména zraku a nervů. [48]

Přestože existuje mnoho potenciálních biotechnologických aplikací piezofilů i jejich enzymů, je pouze několik praktických aplikací. Tato skutečnost je způsobena nesnadnou kultivací mikroorganismů adaptovaných na vysoký tlak. Proto také vlastnosti enzymů a dalších buněčných složek nebyly doposud plně prozkoumány. [49]

7 ŽIVOT PŘI EXTRÉMNÍM pH

7.1 Extrémní pH

Biologické procesy mají tendenci se odehrávat ve středním rozmezí pH spektra. Intracelulární i vnější pH často spadá do tohoto rozmezí. [2] Ačkoliv acidofilní a alkalofilní extrémofily mají vnitřní hodnoty pH blízké neutrálnímu prostředí, jejich extracelulární enzymy musí být stabilní a aktivní při extrémním pH. [50]

7.1.1 Alkalické prostředí

Pouze málo alkalických prostředí na Zemi je stabilních. Nejčastěji jsou to uhličitánová jezera, ve kterých je uhličitán sodný hlavním zdrojem alkality. Uhličitánová jezera mohou mít pH vyšší jak 10,5. Při zvyšování alkality vypařováním vody jsou rovněž zakonzentrovávány i soli jako NaCl, které činí dané prostředí prostředím s vysokou koncentrací soli. Zda jezero obsahující uhličitán bude alkalické, záleží na poměru koncentrace uhličitánu na jedné straně a koncentraci vápníku a hořčíku na straně druhé. Pokud je koncentrace uhličitánu větší než koncentrace všech kationtů, jezero bude alkalické. Přírodní prameny mají obecně nízkou koncentraci solí a pH nepřesahující 9. [51] Zástupce alkalofilů lze rovněž nalézt v alkalických půdách. [5]

7.1.2 Kyselé prostředí

Kyselé prostředí může být vytvořeno geotermálními procesy na zemském povrchu (obr. 8). Vulkanická síra je oxidována na SO_3 , který reaguje s vodou za vzniku H_2SO_4 . Vypařováním vody dochází k zakonzentrování kyseliny v jezerech. V takto vysoce kyselém prostředí můžeme nalézt zástupce domény archaea, kteří jsou schopni žít při pH menším jak 0. [51]



Obr. 8: Malé jezero Crater lake leží v kráteru sopky na Bílém ostrově. Charakteristické zelené zbarvení je důsledkem přítomnosti síry a extrémofilních mikroorganismů. Teplota vody jezera se pohybuje okolo 50 °C, pH je přibližně 1. [52]

7.2 Acidofily

Acidofily jsou mikroorganismy prosperující za nízkého pH. [5] Extrémní acidofily mají optimální růstovou rychlost při pH 3 a nižším, mírní acidofily v rozmezí pH 3 až 5. Acidotolerantní jsou mikroorganismy s optimem pro růst při pH > 5, ale vykazující aktivitu i při nízkém pH. [53]

7.2.1 Zastoupení mezi mikroorganismy

Acidofily se nejčastěji nacházejí v archaeální a bakteriální doméně a jsou součástí mnoha biogeochemických procesů zahrnující cyklus síry a železa. [54] Schopnost oxidace těchto prvků je využívána k vyplavování kovů z důlních odpadů a odpadních vod. [55] Extrémní aciditu vykazují aerobně heterotrofní *Picrophilus oshimae* a *Picrophilus torridus*, kteří byli izolováni z japonských půd prostoupených sopečnými plyny a mají optimální podmínky pro růst při pH 0,7 a teplotě 60 °C. Prokaryotické acidofily lze rozdělit do tří skupin na základě teplotního rozmezí jejich růstu. Mezi mezofilní acidofily se řadí *Thiobacillus ferrooxidans* a mezi mírně termofilní *Bacillus acidocaldarius* a *Thermoplasma acidophilum*. Zástupci termofilní skupiny jsou *Sulfolobus acidocaldarius* a *Metallosphaera sedula*. [5]

Pouze několik jednobuněčných eukaryot je schopno žít při pH nižším jak 1. Nejlépe popsaná je červená řasa *Cyanidium caldarium*, která byla izolovaná z prostředí o pH 0,5, avšak její optimální pH růstu je při pH 2–3. Schopnost přežít při pH kolem 0 mají rovněž zelená řasa *Dunaliella acidophila* a zástupci hub *Acontium cylatium*, *Cephalosporium* sp. a *Trichosporon cerebriae*. [2]

7.2.2 Mechanismus adaptace

Jak již bylo zmíněno, acidofily pro svou existenci vyžadují neutrální vnitřní prostředí. Narozdíl od mikroorganismů, kteří žijí v neutrálním vnějším prostředí, acidofily jsou schopni tolerovat o několik řádů vyšší pH gradient (ΔpH). Tento pH gradient přes cytoplazmatickou membránu je neoddelitelně spojen s bioenergetikou buňky, protože je hlavním přispěvatelem protonmotivní síly. Ačkoliv příliv protonů přes F_0F_1 ATPasu produkuje ATP, intenzivní buněčná protonace, pokud není kontrolována, může rapidně rozptylovat pH gradient. Protonací je zhoršena funkce proteinů i nukleových kyselin, neboť volné intracelulární protony narušují enzymovou aktivitu a intracelulární procesy jako je transkripce DNA, syntéza proteinů. Acidofily využívají různé mechanismy, které brání vstupu protonů přes cytoplazmatickou membránu nebo eliminují protony a jejich účinky v cytoplazmě, a tím udržují pH stálost vnitřního prostředí. Mezi tyto mechanismy, udržující ΔpH , patří zejména vysoká nepropustnost cytoplazmatické membrány pro protony a snížení velikosti pórů v membránových kanálech. *Bacillus acidocaldarius* a *Thermoplasma acidophilum* odstraňují nadbytek protonů z cytoplazmy pomocí aktivních protonových pump. Organické kyseliny jsou v acidofilech nežádoucí z hlediska jejich disociace na protony. Tento problém řeší heterotrofní acidofily degradací organických kyselin. Všechny mikrobiální buňky obsahují velké množství tlumících molekul v cytoplazmě, které obsahují zásadité aminokyseliny (např. lysin, histidin nebo arginin) schopné izolace protonů. Nízké pH způsobuje již zmiňované poškození DNA a proteinů, což acidofily řeší zvýšenou expresí chaperonů, které slouží jako opravné mechanismy. [54]

Extracelulární proteiny mají schopnost funkce v prostředí s nízkým pH. [32] Ve srovnání s proteiny adaptovanými na neutrální prostředí mají odlišné složení. Příkladem je enzym α -amylasa z termoacidofila *Alicyclobacillus acidocaldarius*, který vykazuje 30% snížení

v počtu nabitých aminokyselinových residuí (bazických i kyselých). Protein obsahující měď, rusticyanin, byl izolován z *Alicyclobacillus ferrooxidans*. Rusticyanin vykazuje optimální aktivitu při $\text{pH} \leq 2$ a kolem aktivního místa, které je tvořeno Cu, je rovněž snížený obsah nabitých residuí. Mechanismus adaptace proteinů na prostředí s nízkým pH však ještě není zcela ujasněn. [5]

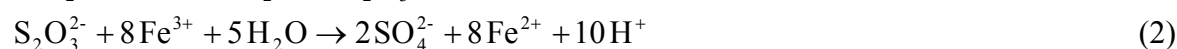
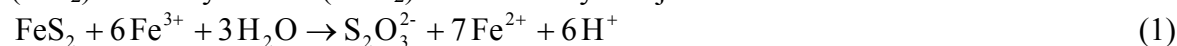
7.2.3 Aplikace acidofilů

7.2.3.1 Biotěžba

Mikroorganismy jsou významné z hlediska jejich využití při extrakci a získávání kovů z rud a odpadů. Procesy, při kterých mikroorganismy oxidují minerály, jsou v biotechnologických aplikacích nazývány biotěžbou. Ve srovnání s konvenčními metodami jako je např. pyrometalurgie, jsou bioprocesy výhodné z hlediska nižších nákladů, nižších energetických vstupů, menší produkce chemicky aktivních odpadů a jiných přínosů pro životní prostředí (např. nulová produkce škodlivých plynů). Bioprocesy sulfidických minerálů lze rozdělit na bioloužení a biooxidaci. Při bioloužení je kov extrahován do roztoku a při biooxidaci daný kov zůstává součástí minerálu. Bioloužením je možno odstranit např. měď z chalkopyritu, biooxidace slouží naopak pro rozpouštění pyritu nebo arsenopyritu, které dále usnadňuje extrakci drahých kovů kyanidem. Biotěžba je rovněž využívána k extrakci uranu, kobaltu, niklu nebo zinku z polymetalických rud.

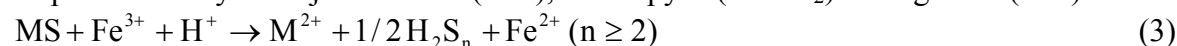
Bioprocesy probíhají v promíchávacích tancích, ve kterých je vždy zajištěna dostatečná aerace. Používané mikroorganismy jsou zejména *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* a *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Lze je využít k bioloužení pyritu zinku a olova a biooxidaci pyritu nebo arsenopyritu. Pro bioloužení polymetalických minerálů jsou vhodné *Leptospirillum ferriphilum* a *Acidithiobacillus caldus*. [53]

Bioloužení je chemický proces, ve kterém jsou za vyplavení kovů odpovědné ionty Fe^{3+} a H^+ . Mikroorganismy musí být tedy především schopné vytvářet látky potřebné k loužení a rovněž si vytvořit prostor pro průběh reakce. Jako reakční prostor může sloužit exopolysacharidová vrstva. Proces rozpouštění minerálů neprobíhá pro všechny sulfidy stejným způsobem. Thiosulfátový mechanismus se uplatňuje při oxidaci nerozpustných sulfidů jako jsou pyrit (FeS_2) a molybdenit (MoS_2). Reakce vystihující tento mechanismus má dva kroky.



Výsledkem jsou ve vodě rozpustné sulfáty.

V případě polysulfidového mechanismu je nutný útok obou iontů Fe^{3+} a H^+ . Uplatňují se zde rozpustné sulfidy kovů jako sfalerit (ZnS), chalkopyrit (CuFeS_2) nebo galenit (PbS).



Elementární síra je relativně stabilní, ale může být oxidována dále na sulfát pomocí *Acidithiobacillus thiooxidans* nebo *Acidithiobacillus ferrooxidans* [56]

7.2.3.2 Ostatní využití acidofilů

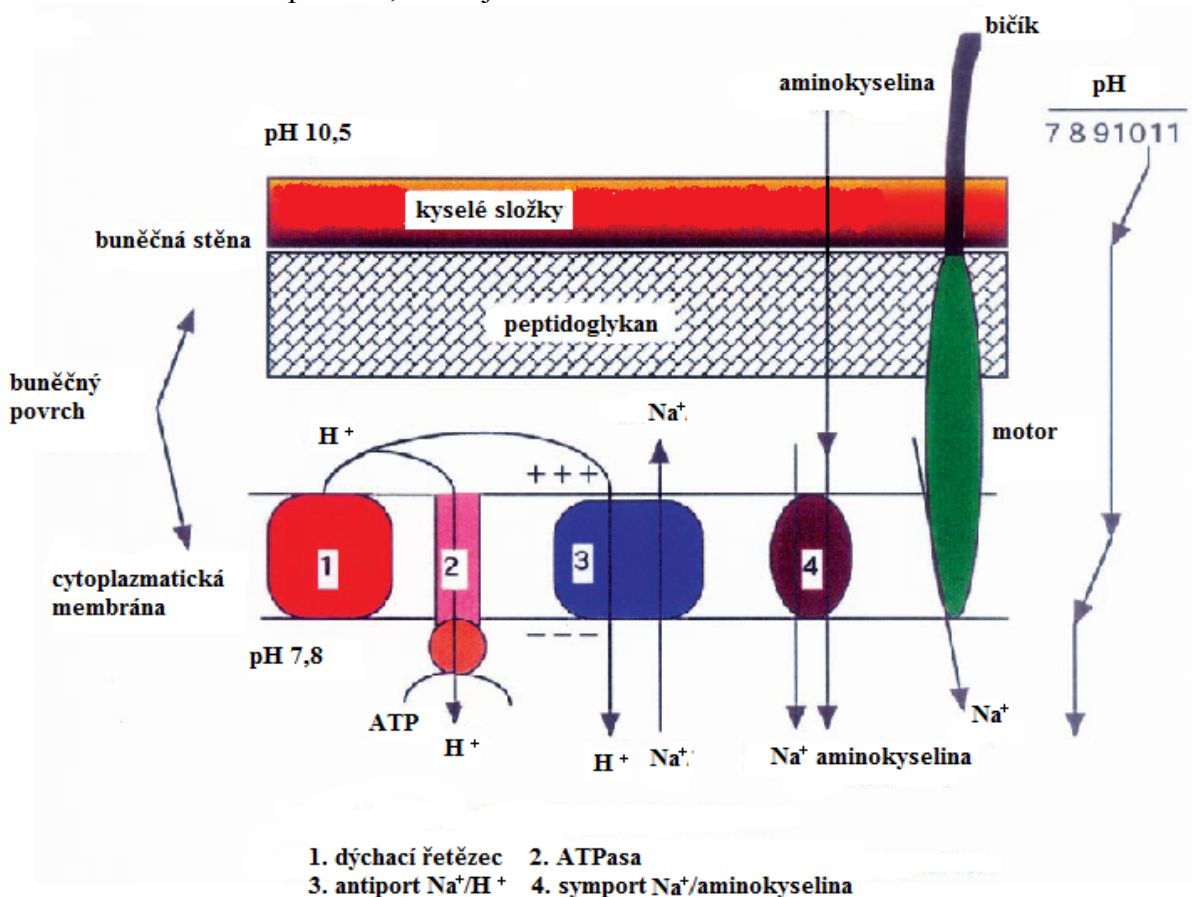
Biokatalyzátory z acidofilů se uplatňují při hydrolyze polymerů. Při zpracování škrobnatých surovin se využívají amylasy, polulanasy, glukoamylasy a glukosidasy, které jsou aktivní za nízkého pH. [32] Heterotrofní acidofily lze využít při degradaci škodlivin v kyselých odpadních vodách. [12]

7.3 Alkalofily

Mikroorganismy, které mají optimální růstovou rychlost při vysokém pH, lze obecně nazývat alkalofily, nebo je možné je rozdělit na alkalofily a haloalkalofily. Alkalofily vyžadují pro svůj růst $\text{pH} > 9$, jejich optimální růst je při $\text{pH} 10$. Haloalkalofily kromě vysokého pH vyžadují rovněž vysokou salinitu (více jak 33 % NaCl). Alkalofilní mikroorganismy jsou zastoupeny u prokaryot i eukaryot. Nejvíce zástupců je mezi bakteriemi (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*), dále jsou to různé druhy mikroorganismů patřící mezi aktinomycety, plísně a kvasinky. [12,57]

7.3.1 Adaptace na vysoké vnější pH

Intracelulární pH se udržuje kolem 8, přestože pH vnějšího prostředí se může pohybovat v rozmezí 8–11. Schopnost udržet rozdílné pH vnějšího a vnitřního prostředí je dána zejména změnou ve stavbě buněčné stěny a výměnou iontů z cytoplazmy do média antiportem Na^+/H^+ . Mechanismus redukce pH z 10,5 na 8 je uveden na obr. 9.



Obr. 9: Mechanismus regulace intracelulárního pH . [57]

Buněčná stěna chrání vnitřní obsah buňky od vnějšího vysoce alkalického prostředí. Jsou zde značné odlišnosti ve složení buněčné stěny alkalofilních zástupců rodu *Bacillus* a zástupců tohoto rodu, kteří jsou adaptovaní na neutrální prostředí. U alkalofilů buněčná stěna obsahuje kromě peptidoglykanu určité kyselé složky, jako jsou kyseliny galakturonová, glukonová, glutamová, asparagová a fosforečná. Negativní náboj těchto složek snižuje intracelulární pH v těchto místech na $\text{pH} 9$. Další snižování pH až na hodnotu 8 se odehrává na úrovni cytoplazmatické membrány. Cytoplazmatická membrána udržuje stálost pH vnitřního

prostředí využitím antiportních systémů Na^+/H^+ a K^+/H^+ , a řízeným vylučováním H^+ ATPasou. Alkalofily pro svůj růst vyžadují Na^+ . Protonmotivní síla v buňkách je vytvářena elektronovým transportním řetězcem a vylučováním H^+ , které byly transportovány do buňky při syntéze ATP. Zpětná inkorporace H^+ do buňky je spojena s kotransportem různých substrátů. V případě transportního systému závislého na Na^+ , dochází k výměně H^+ a Na^+ pomocí antiportního systému Na^+/H^+ a tím k tvorbě sodíkmotivní síly, která je hnací silou symportu substrátu a Na^+ . [57]

7.3.2 Využití alkalofilů

7.3.2.1 Enzymy

Průmyslově nejvíce využívané enzymy z alkalofilů jsou proteasy, celulasy, lipasy a polulanasy. Uplatňují se zejména jako detergenty. Hlavním důvodem využívání enzymů právě z alkalofilů je jejich dlouhodobá stabilita v detergenčních prostředcích, snížení energetických nákladů při praní za nižších teplot a rychlejší zisk produktu. Velmi výhodná je rovněž stabilita v přítomnosti dalších detergenčních přísad, jako jsou aktivní bělidla, změkčovače, odbarvovače nebo parfémy. Alkalofilní enzymy lze využít i při čištění odpadních vod (celulasy, pektinasy, xylanasy). Xylanasy se rovněž používají pro biologické procesy bělení v papírenském průmyslu a při hydrolýze xylanu. [58] Cyklodextrin produkovaný alkalickou cyklodextringlukotransferasou se používá v potravinářském, chemickém a farmaceutickém průmyslu. [12] Alkalické amylasy se využívají při degradaci škrobu. [57]

7.3.2.2 Farmaceutický průmysl

Mikroorganismy jsou vysoce efektivní v jejich schopnosti vyrobit mnoho druhů bioaktivních látek. Při kultivaci bakterií v prostředí s vysokou alkalitou jsou izolována nová antibiotika. Alkalofilní zástupce rodu *Nocardia* při kultivaci v médiu o pH 10 produkuje antibiotikum fenazin. Mikroorganismy izolované z alkalických salinních jezer vykazují antimikrobiální aktivitu vůči *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis* a *Candida albicans*. Tyto poznatky podporují další výzkumné práce zaměřené na identifikaci metabolitů produkovaných alkalofilními bakteriemi.

Ve farmaceutickém průmyslu se využívají již zmíněné cyklodextríny, které zvyšují stabilitu a rozpustnost antibiotik, hormonů a vitamínů. [58]

7.3.2.3 Potravinářský průmysl

V potravinářském průmyslu se využívá řasa *Spirulina* izolovaná z alkalických jezer. Kultivace v alkalickém hypersalinním prostředí je výhodná z hlediska nemožnosti invaze a růstu dalších kontaminujících mikroorganismů. Flóra jezera, ve kterém se vyskytuje, je tedy monospecifická a zisk je možný jednoduchou filtrací. Rybník ponechaný pouze pro kultivaci řasy *Spirulina* může produkovat 125krát více bílkovin než kukuřice pěstovaná na stejně rozsáhlé ploše. *Spirulina* je jedním z nejlepších zdrojů γ -linoleové kyseliny a je rovněž bohatým zdrojem vitamínů. Navíc její buněčné stěna neobsahuje celulosu, což je vhodné pro lidi trpící střevní malabsorpcí nebo pro starší lidi, kteří mají problém s trávením složitějších bílkovin. [58]

8 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo charakterizovat mikroorganismy, které obývají extrémní prostředí. Bylo provedeno rozdělení těchto mikroorganismů na základě toho, jaké extrémní podmínky vyžadují, uveden mechanismus adaptace a využití v biotechnologických aplikacích.

Hypertermofilní mikroorganismy vyžadují pro svůj růst a rozmnožování teplotu nad 80 °C, je možné je nalézt zejména v geotermálních pramenech. Nejznámějšími zástupci jsou rody *Pyrococcus*, *Thermococcus* a *Methanococcus*, které se zařazují mezi archaea. Mechanismus jejich adaptace je založen zejména na přestavbě cytoplazmatické membrány, která si udržuje nízkou fluiditu navýšením obsahu nasycených nerozvětvených mastných kyselin, delšími řetězci a silnějšími hydrofobními interakcemi. Za stabilitu DNA je zodpovědná reverzní gyrasa, základem stability enzymů je hutnější sbalování proteinů, optimální rozložení náboje, minimalizace hydrofobního povrchu a stabilizace helixu. Termostabilní enzymy našly uplatnění v různých odvětvích průmyslu, nejvýznamnější je využití DNA polymeras v PCR. Celé mikroorganismy se pak uplatňují při čištění odpadních vod.

Psychrofilní mikroorganismy se vyskytují za velmi nízkých teplot v oblastech Antarktidy a Arktidy. Nízkým teplotám se přizpůsobily zvýšením podílu nenasycených mastných kyselin v membránách, zvýšením konformační flexibility enzymů a syntézou tzv. antifreeze proteinů. Uplatnění našly zejména jako detergenty při praní za studena, v textilním a potravinářském průmyslu.

Mikroorganismy prosperující v místech s vysokou koncentrací soli jsou halofily. Schopnost přežít v hypersalinním prostředí solných jezer je dána schopností udržet si osmotickou rovnováhu. Redukce osmotického tlaku může být založená na akumulaci intracelulárních iontů, nebo na akumulaci osmolyticky aktivních látek. Osmolyty mohou být používány jako protektanty při zmrazování, transmembránový protein bakteriorhodopsin se uplatňuje v bioelektronice. Celé mikroorganismy se využívají při čištění odpadních vod obsahujících vysoký obsah solí a jsou rovněž zkoumány z hlediska možnosti produkce biopolymerů.

Další skupinou extrémofilů jsou piezofily, které je možné nalézt v hloubkách oceánů a jezer, kde jsou vystaveny extrémně vysokému tlaku. Působení vysokého tlaku způsobuje snížení fluidity membrány, ke kterému u piezofilů nedochází díky navýšení množství nenasycených mastných kyselin. Výzkum je zaměřen zejména na studium stability enzymů za vysokého tlaku, fyziologii a membránové lipidy, které jsou zdrojem prospěšných nenasycených mastných kyselin.

Schopnost růstu a reprodukce v extrémním prostředí pH mají acidofily a alkalofily. Acidofilní mikroorganismy byly izolovány převážně z kyselých jezer v oblasti vulkanické činnosti. Neutrální pH vnitřního prostředí si udržují díky vysoké nepropustnosti cytoplazmatické membrány pro protony a snížení velikosti pórů v membránových kanálech. Vzhledem ke schopnosti oxidovat síru se celé mikroorganismy využívají při biologickém loužení kovů, jejich enzymy ve škrobárenských procesech.

Uhličitánová jezera jsou typickým stanovištěm pro alkalofily. Enzymy z těchto mikroorganismů, které jsou stabilní v prostředí s vysokým pH, našly uplatnění především jako detergenty, při čištění odpadních vod, v papírenském průmyslu při hydrolýze xylanu, při degradaci škrobu. V potravinářském průmyslu se využívá řasa *Spirulina*, která je zdrojem bohatým zdrojem γ -linoleové kyseliny a vitamínů.

Výzkum extrémofilních mikroorganismů je velmi perspektivní, a proto lze očekávat, že tyto mikroorganismy budou i nadále předním objektem vědeckého zájmu.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SATYANARAYANA, T., RAGHUKUMAR, C., SHIVAJI, S. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*. 2005, vol. 89, no. 1, s. 78-90.
- [2] ROTHSCHILD, Lynn J., MANCINELLI, Rocco L. Life in extreme environments . *Nature*. 2005, vol. 409, s. 1092-1101.
- [3] FUJIWARA, Shinsuke . Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, vol. 94, no. 6, s. 518-525.
- [4] MADIGAN, Michael T., MARRS, Barry L. Extremophiles. *Scientific American*. 1997, vol. 276, no. 4, s. 82-87.
- [5] PACKCHUNG, Amalie A. H., SIMPSON, Philippa J.L, CODD, Rachel. Life on earth. Extremophiles continue to move the goal posts. *Environmental chemistry*. 2006, vol. 3, no. 2, s. 77-93.
- [6] MCKANE, L., KANDEL, J. *Microbiology: essentials and applications*. 2nd ed. New York : McGraw-Hill. 1996. 843 s. ISBN 0-07-045154-0.
- [7] JAENICKE , Rainer, BÖHM, Gerald. The stability of proteins in extreme environments. *Current Opinion in Structural Biology*. 1998, vol. 8, is. 6, s. 738-748.
- [8] AGUILAR, Alfredo. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews*. 1996, vol. 18, no. 2-3, s. 89-92.
- [9] SCHIRALDI, Chiara, DE ROSA, Mario. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends in Biotechnology*. 2002, vol. 20, no. 12, s. 515-521.
- [10] MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V., CLARK, D.P. *Brock biology of microorganisms*. 12th ed. 2009. 1168 s. ISBN 0-321-53615-0.
- [11] STETTER, Karl O. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*. 1999, vol. 452, is. 1-2, s. 22-25.
- [12] HORIKOSHI, Koki, GRANT, William D. *Extremophiles : Microbial life in extreme environments*. 1998. 322 s. ISBN 0-471-02618-2
- [13] BROCK, Thomas D. *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. 1987. 465 s. ISBN 0-387-90309-7
Dostupný z: <<http://digital.library.wisc.edu/1711.dl/Science.BrockTher>>.
- [14] *Life at High Temperatures* [online]. 2005 [cit. 2009-05-01]. Dostupný z: <<http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/LAHT/B1>>.
- [15] HUBER, Harald, STETTER, Karl O. Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 1998, vol. 64, is. 1, s. 39-52.
- [16] SKLENÁŘOVÁ, K. *Termofilní mikroorganismy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 35 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Libor Babák, Ph.D.
- [17] EDWARDS, C. *Microbiology of extreme environments*. New York : McGraw-Hill. 1990. 218 s.

- [18] BRUINS, Marieke E., JANSSEN, Anja E. M., BOOM, Remko M. Thermozyms and their applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2001, vol. 90, no. 2, s. 155-186.
- [19] VIEILLE, Claire, ZEIKUS, Gregory J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*,. 2001, vol. 65, no. 1, s. 1-43.
- [20] FRANKOVÁ, T. *Aplikace termofilních mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 40 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Libor Babák, Ph.D.
- [21] CHOUDHARY, M. K. *Landfill leachate treatment using a thermophilic membrane bioreactor*. 2005. 93 s. Vedoucí diplomové práce Prof. C. Visvanathan.
- [22] CAVICCHIOLI, Ricardo, SIDDIQUI, Khawar S., ANDREWS, David, SOWERS, Kevin R. Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002, vol. 13, is. 3, s. 253-261.
- [23] GEORLETTE, D., et al. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004, vol. 28, is. 1, s. 25-42.
- [24] DUDOVÁ, P. *Psychrofilní a psychrotolerantní mikroorganismy a jejich využití k biodegradaci škodlivin*. Brno: Masarykova univerzita, Fakulta přírodovědecká, 2006. 36 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Dana Horáková, CSc.
- [25] *UNSW Environmental Microbiology Initiative* [online]. 2007 [cit. 2009-05-01]. Dostupný z: <<http://www.emi.science.unsw.edu.au>>.
- [26] METHÉ, Barbara, NELSON, Karen E., FRASER, Claire M. It's a cold world out there (but the prospects are hot). *Trends in Microbiology*. 2004, vol. 12, no. 12, s. 532-534.
- [27] STIBOR, Michal, KRÁLOVÁ, Blanka. Psychrofilní a psychrotrofní mikroorganismy, jejich adaptace a využití v moderních biotechnologiích. *Chemické listy*. 2001, roč. 95, č. 2, s. 91-97.
- [28] D'AMICO, Salvino, COLLINS, Tony, MARX, Jean-Claude, FELLER, Georges, GERDAY, Charles. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep*. 2006, vol. 7, no. 4, s. 385-389.
- [29] GERDAY, Charles, et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in biotechnology*. 2000, vol. 18, no. 3, s. 103-107.
- [30] HOYOUX, A., JENNES, I., DUBOIS, P., GENICOT, S., DUBAIL, F., FRANCOIS, J.M., BAISE, E., FELLER, G., GERDAY, C. Cold-adapted β -galactosidase from the antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, vol. 67, no. 4, s. 1529-1535.
- [31] RUDOLFOVÁ, Jana, ČURDA, Ladislav. Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. *Chemické listy*. 2005, roč. 99, č.3, s. 168-174.
- [32] VAN DEN BURG, Bertus. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*. 2003, vol. 6, no. 3, s. 213-218.

- [33] GOO, Young A., ROACH, Jared, GLUSMAN, Gustavo, BALIGA, Nitin S., DEUTSCH, Kerry, et al. Low-pass sequencing for microbial comparative genomics. *BMC genomics* [online]. 2004, vol. 5, no. 1. [cit. 2009-05-01]. Dostupný z: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov>>.
- [34] MADIGAN, Michael T., OREN, Aharon. Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion in Microbiology*. 1999, vol. 2, no. 3, s. 265-269.
- [35] RODRIGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRAQUERO, F., RAMOS-CORMENZANA, A. Isolation of extreme halophiles from seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 1979, vol. 38, no. 1, s. 164-165.
- [36] *Jan Marini C-ESTAMINS: Dunaliella Salina — Carotenoids Complex* [online]. 1996 [cit. 2009-05-01]. Dostupný z: <<http://www.treatment-skincare.com/May-2007/C-ESTAMINS.html>>.
- [37] OREN, Aharon. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems* [online]. 2008, vol. 4. [cit. 2009-05-01]. Dostupný z: <<http://www.salinesystems.org>>.
- [38] *Halobacteria* [online]. 1999 [cit. 2009-05-01]. Dostupný z: <<http://www.micro.siu.edu/Micr425/425Notes/09-Halobact.html>>.
- [39] YANG, Yihwa, LEVICK, Daniel T., JUST, Caryn K. Halophilic, Thermophilic, and Psychrophilic Archaea: Cellular and Molecular Adaptations and Potential Applications. *The Journal of Young Investigators* [online]. 2009, vol. 19, is. 11 [cit. 2009-05-01]. Dostupný z: <<http://www.jyi.org>>.
- [40] GIORDANO, Assunta, VELLA, Filomena M., ROMANO, Ida, GAMBACORTA, Agata. Structural elucidation of a novel phosphoglycolipid isolated from six species of Halomonas. *Journal of Lipid Research*. 2007, vol. 48, no. 8, s. 1825-1831. Dostupný z: <www.jlr.org>.
- [41] LE BORGNE, Sylvie, PANIAGUA, Dayanira, VAZQUEZ-DUHALT, Rafael. Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2008, vol. 15, no. 2-3, s. 74-92.
- [42] *Polyhydroxyalkanoáty – Přírozeně odbouratelné plasty* [online]. 2007 [cit. 2009-05-01]. Dostupný z: <<http://www.gate2biotech.cz/polyhydroxyalkanoaty-prorozene-odbouratelne-plasty>>.
- [43] ABE, Fumiyoshi, HORIKOSHI, Koki. The biotechnological potential of piezophiles. *TRENDS in Biotechnology*. 2001, vol. 19, no. 3, s. 102-108.
- [44] KATO, Chiaki, QURESHI, Mohammad Hassan. Pressure response in deep-sea piezophilic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 1999, vol. 1, no. 1, s. 87-92.
- [45] KATO, Chiaki, LI, Lina, NOGI, Yuichi, NAKAMURA, Yuka, TAMAOKA, Jin, HORIKOSHI, Koki. Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, challenger deep, at a depth of 11,000 meters. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, vol. 64, no. 4, s. 1510-1513.
- [46] BARTLETT, D.H. Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002, vol. 1595, is. 1-2, s. 367-381.

- [47] YANO, Yutaka, NAKAYAMA, Akihiko, ISHIHARA, Kenji, SAITO, Hiroaki. Adaptive changes in membrane lipids of barophilic bacteria in response to changes in growth pressure. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, vol. 64, no. 2, s. 479-485.
- [48] RADJASA, Ocky Karna. Deep-sea bacteria and their biotechnological potentials. *Journal of Coastal Development*. 2004, vol. 7, no. 3, s. 109-118.
- [49] GOMES, Joseph, STEINER, Walter. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*. 2004, vol. 42, no. 4, s. 223-235.
- [50] HOUGH, D. W., DANSON, M. J. Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*. 1999, vol. 3, is. 1, s. 39-46.
- [51] VAN DE VOSSENBERG, Jack L.C.M., DRIESSEN, Arnold J.M, KONINGS, Wil N. Adaptations of the cell membrane for life in extreme environments. *Cell and Molecular Response to Stress*. 2000, vol. 1, s. 71-88.
- [52] *Life in hot springs* [online]. 2007 [cit. 2009-05-01]. Dostupný z: <<http://www.teara.govt.nz/EarthSeaAndSky/HotSpringsAndGeothermalEnergy/LifeInHotSprings/3/ENZ-Resources/Standard/3/1/en#breadcrumbtop>>
- [53] JOHNSON, D. B. Biodiversity and interactions of acidophiles: Key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 2008, vol. 18, is. 6, s. 1367-1373.
- [54] BAKER-AUSTIN, Craig, DOPSON, Mark . Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *TRENDS in Microbiology*. 2007, vol. 15, no. 4, s. 165-171.
- [55] HORIKOSHI, Koki. Discovering novel bacteria, with an eye to biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 1995, vol. 6, is. 3, s. 292-297.
- [56] RAWLINGS, Douglas E. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories* [online]. 2005, vol. 4, no. 13 [cit. 2009-05-01]. Dostupný z: <www.pubmedcentral.nih.gov>.
- [57] HORIKOSHI, Koki. Alkaliphiles . *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B*. 2004, vol. 80, no. 4, s. 166-178.
- [58] ULUKANLI, Z., DIGRAK, M. Alkaliphilic Micro-organisms and Habitats. *Turk Journal Biology*. 2002, vol. 26, s. 181-191.

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ADP + P _i	Adenosindifosfát + fosfátová jednotka
ATFs	Proteiny zabraňující promrznutí
ATP	Adenosin trifosfát
DHA	Kyselina docosahexaenová
DPG	Difosfatidylglycerol
EPA	Kyselina eicosapentaenová
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GDH	Glutamátdehydrogenasa
OmpH	Vnější membránový protein H
PC	Fosfatidylcholin
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PEA	Fosfatidylethanolamin
PG	Fosfatidylglycerol
PHB	Polyhydroxybutyrát
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny