

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů

Studijní program: Geologie

Studijní obor: Praktická geobiologie



Michal Kovács

**Extremofilní organizmy a jejich prostředí - možnosti Ramanovy spektroskopie pro
identifikaci klíčových biomarkerů**

Extremophiles and their environments - possibilities of using Raman spectroscopy for key
biomarkers detection

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Jan Jehlička, Dr.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 8. 2013

.....

Michal Kovács

Pod'akovanie

Za odborný dohľad, rady a pomoc patrí poďakovanie predovšetkým profesorovi RNDr. Janu Jehličkovi, Dr. Vďaka patrí aj Mgr. Adamovi Culkovi Ph.D., za pomoc pri vzniku praktickej časti tejto bakalárskej práce.

Abstrakt

Na Zemi se vyskytuje obrovská různorodost prostředí pro život. Většinu z nich, z hlediska člověka, ovlivňují faktory s extrémními hodnotami. Díky velké druhové diverzitě, a to hlavně ve světě mikroorganismů, se vytvořily adaptace, které tyto podmínky pomáhají zvládat. Organismy, žijící v těchto podmínkách, nazýváme extrémofily. Každý z nich zanechává určité stopy po své existenci, ať už současné nebo minulé. Vhodnou metodou se tyto stopy, které nazýváme biomarkery, dají identifikovat. Tato bakalářská práce přináší stručný přehled základních extrémofilů a prostředí, ve kterých se vyskytují. Dále stručně popisuje využití Ramanovy spektroskopie v identifikaci významných biomarkerů, například i pro potřeby exobiologie.

Abstract

The Earth has a huge variety of living environments. Most of them, in terms of human, are affected by factors with extreme values. Species diversity, especially in the world of microorganisms, have created adaptations that help manage these conditions. Organisms, which live in these conditions, are called extremophiles. Each of them leaves a trace of their existence, whether present or past. These traces are called biomarkers and if we use appropriate method, we are able to identify them. This bachelor thesis brings a brief overview of the basic extremophiles and the environment in which they live. Furthermore, briefly describes the use of Raman spectroscopy to identify significant biomarkers, such as for the needs of exobiology.

Obsah

Úvod	1
1.0 Extrémofilný organizmus	2
1.1 Život v extrémoch	3
2.0 Typy extrémnych prostredí	4
2.1 Nízka teplota	4
2.2 Vysoký tlak	7
2.3 Vysoká teplota	8
2.4 Vysoká salinita	11
2.5 Extrémy pH	13
2.5.1 Nízke pH	14
2.5.2 Vysoké pH	15
3.0 Nepravý extrémofil	17
3.1 Odolnosť voči radiácii	17
3.2 Ďalšie druhy nepravých extrémofilov	18
4.0 Ramanova spektroskopia	19
4.1 Aplikácia v prírodných vedách	20
5.0 Exobiológia	20
6.0 Porovnanie dvoch druhov spektrometrov	21
Diskusia	23
Záver	24
Zoznam použitej literatúry	26
Internetové zdroje	33

Úvod

Obrovská diverzita života sa na Zemi začala rozvíjať pred vyše 3,5 mld. rokov. Prokaryoty boli prvými organizmami a mikroorganizmami, ktoré v tej dobe započali svoj vývoj. Približne o 2,1 miliardy rokov neskôr sa objavujú prvé eukaryotné organizmy a evolúcia zložitejších mnohobunkových rastlín a živočíchov začala asi pred 650 miliónmi rokov (Staley a Gosink, 1999). Za toto obdobie sa prokaryoty rozlične adaptovali na podmienky prostredí, ktoré sa vplyvom dynamických vlastností Zeme výrazne diferencovali. Výrazne sa na tom podieľal pohyb tektonických platní, ktorý spôsobil rozpad jednotného kontinentu a kozmopolitné rozšírenie prokaryot, ktoré sa museli prispôbiť rozličným životným podmienkam, často extrémnym. Prokaryota sa dokázali rýchlo evolučne vyvíjať a to vďaka svojej veľkosti a spôsobu rozmnožovania. Napokon, počas ich existencie sa táto vlastnosť nijak podstatne nezmenila. Využitím vertikálneho a horizontálneho génového transferu, sa môžu medzi jedincami aktívne šíriť vhodné adaptácie pre extrémne podmienky.

Pochopenie fyziologickej podstaty mikroorganizmov je základným krokom k aplikácii týchto organizmov v ďalších odvetviach vedy. Jednou a v posledných rokoch intenzívne skúmanou vetvou je oblasť exobiológie. Ide o obor študujúci možnosti života vo vesmíre. Nato, aby sme boli schopní pochopiť extrémne podmienky, ktoré vo vesmíre vládnu a dokázali ich spojiť s možnosťou života určitých organizmov, musíme najprv dôkladne preskúmať princípy života organizmov, ktoré sa nachádzajú na Zemi a to konkrétne extrémofilov, ktorí žijú v podobných podmienkach aké vládnu vo vesmíre, prípadne na iných vesmírnych telesách. Veľká pozornosť je venovaná najmä štvrtej planéte našej Slnecnej sústavy, Marsu, u ktorej sa predpokladá história, hlavne geologická, podobná Zemi. Intenzita bádania bola posilnená najmä dôkazom prítomnosti kvapalnej vody na Marse, ktorá tu zanechala nevyvrátiteľné stopy svojej činnosti. Záujem sa sústreďuje aj na Jupiterov mesiac Európa, kde sa predpokladá prítomnosť oceánu pod povrchovým ľadom. Takéto prostredia by mohli zachovať stopy po prítomnosti organických látok, pokiaľ sa tam nejaké v minulosti nachádzali. Zdokonalenie technológií, ktoré nám tieto stopy môžu odhaliť, viedlo k tomu, že niektoré z nich tvoria vybavenie sond vyslaných napríklad na Mars (napr. Curiosity).

Jednou z týchto technológií, ktorá by mohla pomôcť pri identifikácii významných biomarkerov, je Ramanova spektroskopia. Touto metódou sa zaoberá aj výskumný tím prof. RNDr. Jana Jehličky, Dr., na Ústave geochemie, mineralógie a nerastných zdrojov Prírodovedeckej fakulty Univerzity Karlovej v Prahe. Pod jeho dohľadom táto práca vznikla. Na tomto pracovisku sa snažia o budovanie databázy Ramanových spektier biomarkerov

extrémofilov so zameraním na halofily. Takisto sa tu aktívne študuje distribúcia týchto biomarkerov a testujú pokročilé, miniaturizované Ramanove spektrometre.

Bakalárska práca prináša stručný prehľad základných skupín extrémofilov a prostredí, v ktorých sa vyskytujú. Zameriava sa na charakter prostredia a základné adaptácie extrémofilov na dané stresové faktory. Ďalej sa snaží poukázať na dôležitosť porozumenia fyziológie extrémofilov, ktorá je predkrokom pre úspešné využitie metodiky potrebnej pre charakterizáciu významných biomarkerov. V tomto smere poukazuje na význam Ramanovej spektroskopie vo výskume extrémofilov a využitie tejto metódy v obore exobiológie. Takisto prináša stručný popis praktického využitia dvoch druhov spektrometrov na príklade vzorky sadrovca, ktorý bol kolonizovaný určitými druhmi organizmov.

1.0 Extrémofilný organizmus

Väčšina vyšších organizmov žije, rastie a prosperuje za konvenčných podmienok ako priemerná teplota, pH, salinita, dostupnosť vody, uhlíka alebo energie, hladina kyslíka alebo tlak. Tieto parametre, ktoré definujú priemerné hodnoty ako teplota 37 °C, pH 7,4, salinita od 0,9 % do 3 % a tlak 1 atm sú pohodlné napríklad pre ľudské bytosti a kedysi boli považované za tzv. normálne alebo fyziologické podmienky. Neskoršie výskumy rôznych životných prostredí ukázali, že obrovské množstvo organizmov (hlavne mikroorganizmov), žije skôr v extrémnych podmienkach a v podstate ich niektoré priam vyžadujú. Takéto podmienky sú pre ľudí samozrejme nehostinné (Grant, 1988; Aguilar, 1996; Aguilar *et al.*, 1998; Antranikian *et al.*, 2005).

Pojmom extrémofil alebo extrémofilný organizmus sa väčšinou popisuje mikroorganizmus žijúci v extrémnych podmienkach prostredia, v ktorých je schopný optimálne rásť. Naproti tomu extrémotolerantný mikroorganizmus je taký, ktorý tieto podmienky dokáže prežiť, no optimálneho rastu dosahuje pri miernejších podmienkach (Wilson a Brimble, 2008). Termín extrémofil bol prvý krát navrhnutý MacElroyom v roku 1974 (MacElroy, 1974).

Iniciatíva ľudí vo výskume extrémofilov viedla k zdokonaľovaniu technológií a metód, ktoré pomohli nahliadnuť do prostredí kedysi považovaných za neobývateľné a vytvorila možnosti, ako tieto mikroorganizmy izolovať. Každé prostredie obsahuje živý organizmus, ale dôležité je, či sme schopní jeho prítomnosť rozoznať (Arahal *et al.*, 2000). V dnešnej dobe sa predpokladá, že identifikovaných je menej než 2 % existujúcich mikroorganizmov.

V niektorých prípadoch sa predpokladá, že extrémofily sú pôvodná skupina, iné príklady hovoria o sekundárnej adaptácii (Wiegel a Adams, 1998).

1.1 Život v extrémoch

Výskumy extrémofilných organizmov získali na svojej dôležitosti hlavne v posledných dvoch dekádach rokov. Stále sa v súčasnosti jedná o nedostatočne preskúmanú faunu s vysokým potenciálom pre rôzne vetvy výskumu vo vede. Najväčšia pozornosť je venovaná termofilným mikroorganizmom, no do objektu záujmu sa postupne dostávajú aj ostatné skupiny organizmov. Extrémofily sú skúmané aj z hľadiska výskumu života na iných planétach a pomocou nich sa mnohí snažia dokázať hypotézu, že pôvodne prišiel život na Zem z vesmíru (Canganella a Wiegel, 2011). Za hlavné typy extrémnych prostredí sú považované vysoká a nízka teplota, vysoký tlak, vysoké a nízke pH a vysoká salinita. Nedávno sa do tejto klasifikácie začali radiť aj organizmy schopné tolerovať radiáciu alebo vysoké koncentrácie ťažkých kovov, ale schopnosť optimálneho rastu si zachovávajú hlavne pri absencii týchto stresových faktorov a preto nemôžu byť považované za pravých extrémofilov (Hendry, 2006).

Prostredie	Organizmus
nízka teplota	psychrofil / psychrotolerant (psychrotrop)
vysoká teplota	termofil / termotolerant
vysoký tlak	barofil / barotolerant
zvýšená salinita	halofil / halotolerant
vysoké pH	alkalofil / alkalotolerant
nízke pH	acidofil
Príklady "nepravých" extrémofilov	
1. odolnosť voči radiácii (Röntgenové / gamma / UV / infračervené / viditeľné žiarenie)	
2. odolnosť voči extrémnym suchám	
3. tolerancia nízkeho obsahu živín v prostredí (oligotrofné prostredia)	
4. tolerancia zvýšeného obsahu rozpúšťadla v prostredí (toluén, benzén, rôzne alkoholy atd.)	

Tab. 1 Základné rozdelenie extrémnych prostredí a extrémofilov (upravené podľa Canganella a Wiegel, 2011).

2.0 Typy extrémnych prostredí

2.1 Nízka teplota

Väčšina našej planéty je permanentne studená (< 5 °C). Viac ako dve tretiny Zeme sú pokryté morskou vodou, prevažne oceánskou s konštantne nízkou teplotou, a to približne 2 °C. Napriek tomu, práve tieto oblasti tvoria viac než 80 % biosféry. Patria sem časti oceánov, polárne a alpínske areály, vrchná atmosféra a Antarktické skaly (Cavicchioli *et al.*, 2002; Russel, 1990). Medzi chladné oblasti môžeme radiť aj habitaty vytvorené ľudskou rukou a to napríklad chladiace zariadenia, ktoré môžu obsahovať rôzne plesne alebo baktérie. Výhodou takýchto zariadení je schopnosť zabrániť mikrobiálnej kontaminácii pri kultivácii mikroorganizmov (Canganella a Wiegel, 2011).

Ľad je samozrejme častým prvkom v mnohých chladných prostrediach. Dlhú dobu bol považovaný len za médium schopné zachovať život, ktorý po rozmrazení dokáže aktívne fungovať. Mnohé objavy ale dokázali, že v prostredí ako napríklad morský ľad alebo akrecie horských a pevninských ľadovcov, sú mikroorganizmy schopné viesť aktívny život, podstatne odlišný od iných (Christner *et al.*, 2000; Price a Sowers, 2004). Extrémofilné mikroorganizmy, ktoré sa práve a hlavne v týchto podmienkach vyskytujú, nazývame psychrofilné a psychrotropné. Psychrofilné mikroorganizmy veľmi dobre znášajú nízke teploty prostredia a dokážu vňom aktívne rásť (max. 15 °C). Psychrotropné mikroorganizmy v kludových štádiách takisto žijú v nízkych teplotách, no pre svoj optimálny rast preferujú teploty okolo 20 °C. Niektoré organizmy dokážu rásť pri teplotách blízkych -20 °C, avšak v tejto dobe nie je dostatok dát, ktoré by ukázali najnižšiu možnú teplotu pri ktorej by mohli prosperovať (Canganella a Wiegel, 2011).

Extrémne nízka teplota (väčšina týchto organizmov žije pri < 5 °C)	
psychrofil	optimálny rast pri max. 15 °C, skôr nižšie teploty (často blízko -20 °C)
psychrotolerant (psychrotrop)	tolerancia nízkych teplôt, optimálny rast okolo 20 °C

Tab. 2 Základné rozdelenie organizmov v prostredí extrémne nízkych teplôt (upravené podľa Canganella a Wiegel, 2011).

Najviac zastúpené sú psychrofilny tzv. gram-negatívneho typu (tenká vrstva peptidoglykánu + druhá vonkajšia membrána). Zahŕňajú druhy ako *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Serratia*, *Escherichia*, *Psychroflexus*, *Psychromonas*, *Psychrobacter* a mnohé ďalšie (Maruyama *et al.*, 2000). Psychrofilny patriaci do kmeňov *Firmicutes* a *Actinobacterium* (tzv. gram-pozitívny typ - silná peptidoglykánová vrstva), zahŕňajú členov rodov *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter* a *Micrococcus* (Ruger *et al.*, 2000). Organizmy, žijúce v takýchto stresových prostrediach, prispôbili svoju fyziológiu a chemickú stavbu niektorých orgánov (Deegenars a Watson, 1998).



Obr. 1 Vľavo: Gram-negatívna psychrofilná baktéria druhu *Serratia* (upravené podľa URL 1). Vpravo: Příklad chladného, extrémofilného prostredia - McMurdo Dry Valleys, Antarktída (upravené podľa URL 2).

Redukcia teploty spomaľuje väčšinu fyziologických procesov. Mení interakcie medzi proteínmi, redukuje priepustnosť membrány, mení normu pre prijaté častice z okolia a zvyšuje viskozitu vody, ktorá by mohla spôsobiť vznik intracelulárneho kryštálu ľadu. Enzými ako ATP-ázy (syntéza ATP) a mastné kyseliny sa často stávajú predmetom denaturácie. Významne teplotne senzitivnou sa ukazuje v týchto podmienkach aj translácia (Gerday *et al.*, 2000; Cheng, 1998; Mindock, 2001; Cavicchioli *et al.*, 2002). Organizmy, ktoré prežijú zamrznutie v ľade musia odolať faktorom ako vysušenie, solárna iradiácia, mrznutie, perióda letargie v zamrznutom stave a nakoniec rozmŕzanie. Hlavným faktorom, ktorý pomáha pri týchto stresových situáciách je schopnosť bunky zmenšiť svoj objem na minimum a zmeniť kompozíciu bunecných membrán - viac nenasýtených mastných kyselín v cytoplazmatickej membráne (vyššia fluidita), proteíny chladového šoku, zmena štruktúry enzýmov (viac polárnych aminokyselín). Mnoho organizmov má hrubé, pigmentované bunkové steny alebo extracelulárne polysacharidy okolo buniek (Christner *et al.*, 2000). Najbežnejšie fotoprotektívne zlúčeniny sú melaníny, karotenoidy a aminokyseliny. Ľad

poskytuje frigidné a stabilné prostredie a je často predmetom štúdia anabiózy, ako jedného z najdôležitejších prístupov mikroorganizmov k prostrediu s nízkymi teplotami. Ochrňuje mikroorganizmy pred UV žiarením, oxidáciou a chemickým zničením. Nukleové kyseliny a proteíny v stave anabiózy rapídne znižujú svoje rozpadové hodnoty a teda poškodenie alebo zničenie DNA je výrazne minimalizované (Ma *et al.*, 1999). V ľade dokážu niektoré organizmy zostať životaschopné aj 750 000 rokov a v permafroste je to takmer 3 milióny rokov (Rivkina *et al.*, 2000). To už sa dá často hovoriť o žijúcich fosíliách. Preto podmienky, ktoré vládnu v polárnych oblastiach s konštantnými teplotami okolo -50 °C, poskytujú jedno z najpriaznivejších prostredí na Zemi pre zachovanie DNA.

Za nízkych teplôt sa znižuje kinetická energia reagujúcich molekúl čo je kompenzované flexibilnou štruktúrou enzýmov, ktoré sú práve v chlade aktívne. Tento jav spôsobí zvýšenie konformačnej flexibility (rôzne usporiadania molekúl). Enzýmy mezofilov alebo termofilov zasa vytvárajú štruktúry skôr rigidnejšieho charakteru a preto spôsobujú vysokú termostabilitu (Fields., 2001). Vysoká flexibilita enzýmov má za následok vysokú špecifickú aktivitu v chladných podmienkach. Dve vlastnosti týchto enzýmov majú zrejmy význam pre aplikáciu v biotechnológii. Je to ich katalytická aktivita za nízkych teplôt a nízka termostabilita za zvýšených teplôt. Tieto vlastnosti môžu byť častokrát zvýšené tzv. enzýmovým inžinierstvom. Toto zahŕňa zmenu vrodenných vlastností ako zvýšenie termolability a/alebo katalytickej aktivity za nízkych teplôt, modifikáciu pH profilov alebo iné biochemické vlastnosti. Navyše tieto metódy zvýšenia aktivity termostabilných enzýmov za nízkych teplôt plne alebo čiastočne zachovávajú ich termálnu stabilitu (Cavicchioli *et al.*, 2002). Na chlad adaptované enzýmy sú veľký ekonomický benefit, hlavne kvôli šetreniu energie a financií pri drahých zahrievacích postupoch. Fungujú v chladných prostrediach a počas zimných období, zvyšujú zisk z reakcií, minimalizujú nežiaduce chemické reakcie, ktoré by sa za vyšších teplôt mohli objaviť a môžu byť veľmi ľahko a rapídne inaktivované, pokiaľ je to nutné (Gerday *et al.*, 2000; Russell., 1998). Schopnosť tepelne inaktivovať tieto enzýmy má využitie napríklad v potravinárskom priemysle, kde sa môže zabrániť rôznym modifikáciám tepelne senzitivných substrátov a produktov. V molekulárnej biológii sa využíva tepelná inaktivácia napríklad v sekvenčných procesoch, kedy musí byť aktivita enzýmu ukončená včas pred začatím ďalšieho procesu. Za účelom organickej syntézy môžeme v chlade aktívne enzýmy nájsť v rôznych organicko-vodných rozpúšťadlách (Gerday *et al.*, 2000; Owusu., 1999; Sellek a Chaudhuri., 1999). Mnoho extrémofilných mikroorganizmov skrýva významný potenciál pre biotechnológiu a mnohé z nich sú zatiaľ neobjavené a nepreskúmané.

2.2 Vysoký tlak

Dno najhlbších morí a oceánov je svetom, ktorý je vystavený extrémne vysokému tlaku a nízkej teplote (1-2 °C), ale v blízkosti hydrotermálnych prieduchov môže teplota dosahovať aj 400 °C. Napriek týmto podmienkam je mnoho organizmov schopných žiť a rásť v tomto prostredí. Ako ukázali výskumy vo fyziológii a molekulárnej biológii týchto organizmov, ich rast je ovplyvnený vzťahom medzi teplotou a tlakom hlbokomorského prostredia (Horikoshi, 1998). ZoBell a Morita boli jedni z prvých, ktorí sa pokúsili o izoláciu týchto bakteriálnych mikroorganizmov a nazvali ich barofily (piezofily), (ZoBell a Morita, 1957). No prvá barofilická baktéria bola izolovaná v roku 1979 (Yayanos, 1979). Barofilné baktérie dosahujú optimálneho rastu za tlaku > 40 MPa, ale barotolerantné baktérie dosahujú optimum v raste za tlaku < 40 MPa a sú schopné rásť aj za atmosférického tlaku (Horikoshi, 1998). V podstate bolo zistené, že niektoré organizmy rastú dokonca lepšie pri tlakoch rovných alebo vyšších ako 2,5 atmosfér (Kato *et al.*, 1996a).

Extrémne vysoký tlak	
barofil (piezofil)	optimálny rast za tlaku > 40 MPa
barotolerant	optimálny rast za tlaku < 40 MPa a sú schopné rásť aj za atmosférického tlaku

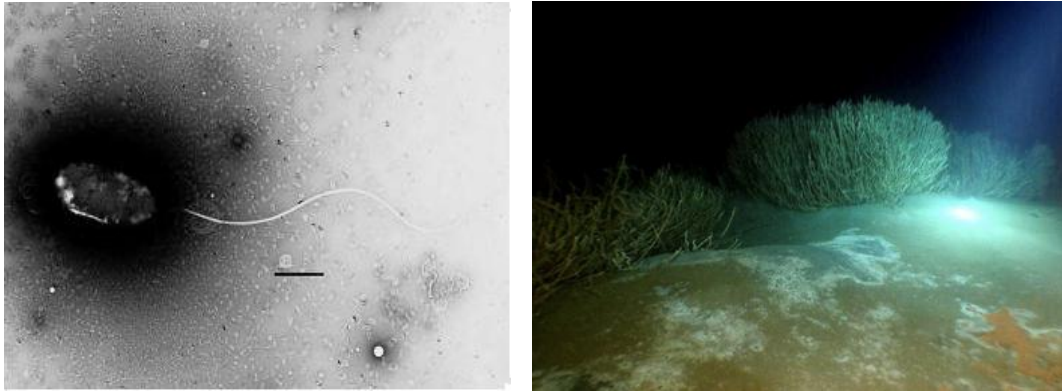
Tab. 3 Základné rozdelenie organizmov v prostredí extrémne vysokého tlaku (upravené podľa Horikoshi, 1998).

V literatúrach si musíme častokrát uvedomiť, že barofilné organizmy sú v podstate zároveň psychofilné, pretože teplota na dne oceánu je väčšinou menej než 4 °C. A barofily izolovaný z hydrotermálnych podmorských prieduchov zasa musia byť termofilné, pretože teplota tu môže byť značne vysoká.

Väčšina hlbokomorského dna je stabilné, chladné a tmavé prostredie. Preto je veľká pravdepodobnosť prítomnosti starobylých životných foriem, u ktorých mohlo dôjsť ku pozastaveniu evolučného vývoja. Štúdium týchto životných foriem by mohlo priniesť objavy a informácie o pôvode života a jeho evolúcii. Samozrejme, je najprv veľmi dôležité pochopiť princípy a procesy života v tejto časti biosféry (Horikoshi, 1998).

Obligátne piezofily (psychofilné) patria všeobecne do piatich rodov proteobaktérií: *Photobacterium*, *Shewanella*, *Colwellia*, *Moritella* a *Psychromonas* (Delong *et al.*, 1997). Mnoho výskumov bolo zameraných na kompozíciu membránových lipidov v súvislosti so

zvyšujúcim sa tlakom, pričom sa sledovalo, ako si organizmy zaistia vhodnú fluiditu membrány (Yano *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2000). Genetické výskumy identifikovali v barofiloch gény adaptované na vysoký a atmosférický tlak, ktorých aktivita bola regulovaná práve zmenami v tlaku (Kato *et al.*, 1996b).



Obr. 2 Vľavo: Obligátny barofil *Photobacterium profundum* (upravené podľa URL 3). Vpravo: Príklad hlbokomorského prostredia so zvýšeným tlakom (upravené podľa URL 4).

Aplikácia týchto extrémofilov môže byť veľmi užitočná v biotechnologickej oblasti. Napríklad gény a proteíny získané z barofilných baktérií sú adaptované na vysokotlakové podmienky, takže môžu byť využité pri rozvoji vysokotlakových bioreaktorov. Barofilné enzýmy majú charakteristickú špecifiku substrátu a môžu byť veľmi užitočné v priemyselnej aplikácii proteáz a glukanáz pre detergenty a DNA polymerázy (pridávanie nukleotidov v replikácii DNA) v PCR amplifikácii (namnoženie úseku DNA), (Horikoshi, 1998).

2.3 Vysoká teplota

Organizmy, ktoré dokážu prosperovať a ťažiť z prostredia so zvýšenou teplotou oproti optimu, sa nazývajú termofily (thermo-toleranti). Pôvodne boli za termofilné prokaryoty označované mikroorganizmy s optimom pre rast medzi 45 °C a 80 °C (Cavicchioli a Thomas, 2000). S rozvojom nových kultivačných techník sa táto teplota priblížila 113 °C (*Pyrolobus fumarii*), a zistilo sa z pozorovania tzv. "black smokers" (čierni fajčiari), že mnohé termofily uprednostňujú prostredia so zvýšeným hydrostatickým tlakom v okolí hlbokomorských termálnych prieduchov (Stetter, 1996). Organizmy sa potom rozdelili do troch skupín: hypertermofily ($T_{opt} \geq 80$ °C), extrémne termofily ($T_{opt} = 70$ °C - 80 °C), a mierne termofily ($T_{opt} = 45$ °C - 70 °C). Toto sú všeobecne prispôsobené definície (Mesbah a Wiegel, 2008;

Wagner a Wiegel, 2008). Špeciálne miesto patrí tzv. teplotne tolerantným termofilom, ktorí rastú optimálne v rozpätí okolo 35 °C (Wiegel, 1990). No pre život znášajú aj vyššie teploty.

Extrémne vysoká teplota		optimálna teplota
termofil	a) hypertermofil	≥ 80 °C
	b) extrémny termofil	70 °C - 80 °C
	c) mierny termofil	45 °C - 70 °C
termotolerant		okolo 35 °C

Tab. 4 Základné rozdelenie organizmov v prostredí extrémne vysokých teplôt (upravené podľa Mesbah a Wiegel, 2008; Wagner a Wiegel, 2008; Wiegel, 1990).

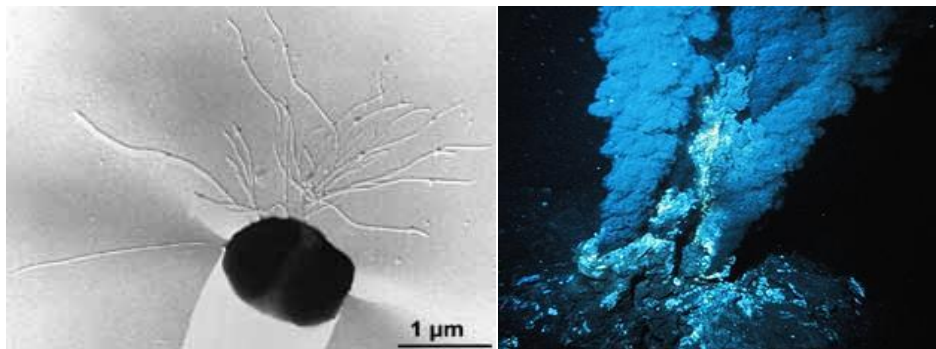
Medzi prirodzené prostredia termofilov sa na Zemi radia terestrické vulkanické lokality, ktoré presahujú teploty podmorských hydrotermálnych systémov prekračujúce 300 °C. Ďalej sem patria napríklad podzemné zásoby ropy alebo povrchy pôd, ktoré sú slnkom zohriate až do 65 °C. Samozrejme sú tu prostredia vytvorené ľudskou rukou a to napríklad komposty (okolo 60 °C - 70 °C, ale môžu dosiahnuť aj 100 °C), haldy, prostredia vytvorené priemyselnými procesmi alebo ohrievačmi vody (Oshima a Moriya, 2008). Hlbokomorské prostredie je vo všeobecnosti chladné, ale v súčasnosti sa vie, že sa tam nachádzajú oblasti s výrazne ohriatou vodou a rozsiahla stále-horúca vulkanická oceánska kôra pod bokmi stredoocéánskeho hrebeňa a inými skalnatými štruktúrami. Aj plytšie oceánske vody sú ohrievané geotermálne. Mnoho prostredí je ohrievaných len dočasne a preto by to mohol byť dôvod, že sa u termofilných organizmov žijúcich v takýchto podmienkach vyvinula schopnosť veľmi rýchleho rastu. Oceánske hĺbky sú pod extrémne vysokým tlakom kvôli výške vodného stĺpca nad nimi a preto je väčšina izolovaných termofilov z týchto oblastí piezotolerantných a niektorí sú skutočne piezofilní (Pledger *et al.*, 1994; Summit *et al.*, 1998; Takai *et al.*, 2008).

Väčšina hypertermofilov patrí do domény archea a mnohé z nich vykonávajú bežné metabolické procesy ako metanogenéza; anaeróbná respirácia cez redukciu síranu, síry, dusičnanu alebo železa; aeróbná respirácia alebo dokonca fermentácia (kvasenie). Niektorí zástupci pre svoj rast preferujú teploty varu (Imanaka, 2008). Rekord v maximálnej teplote rastu drží *Methanopyrus kandleri*, gram-pozitívna anaeróbná archea, izolovaná z veľkej hĺbky oceánu blízko Japonska. Je schopná rastu pri 122 °C a vysokom tlaku (Takai *et al.*, 2008).

Špecifickým enzýmom všetkých hypertermofilov a zároveň znakom, podľa ktorého sa dajú ľahko identifikovať, je reverzná gyráza. Tento enzým je druh topoizomerázy a dokáže vytvoriť pozitívny superhelix, ktorý zabezpečí vysokú termostabilitu DNA (Sato *et al.*, 2003). Objav hlbokomorských hydrotermálnych prieduchov v roku 1977 otvoril cestu pre výskum ekosystémov, ktoré sú založené na primárnej produkcii chemosyntetických extrémnych a hypertermofilných baktérií (Priour *et al.*, 1995).

Zástupci hypertermofilných archea zahŕňajú rody ako *Archaeoglobus*, *Thermodiscus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Sulfolobus*, *Methanococcus* ad. Medzi baktérie patria rody *Thermotoga* a *Aquifex* (Canganella a Wiegel, 2011).

Extrémne a mierne termofily ako anaeróbne baktérie zahŕňajú zástupcov ako *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Rainey *et al.*, 1994), alebo etanol produkujúcu *Thermoanaerobacterium ethanolicus* (Wiegel, 1992). Medzi aeróbne patrí napríklad *Bacillus stearothermophilus* (Canganella a Wiegel, 2011).



Obr. 3 Vľavo: Príklad hypertermofilnej archea rodu *Pyrococcus* (upravené podľa URL 5). Vpravo: Príklad hypertermofilného prostredia v okolí podmorských hydrotermálnych systémov (upravené podľa URL 6).

Z evolučného hľadiska sú hypertermofilné organizmy obsiahnuté hlavne v najhlbších, evolučne najmenej vyvinutých vetvách fylogenetického stromu. Často využívajú substráty, o ktorých sa predpokladá, že prevažovali v prvotnom terestrickom zložení a produkujú látky prevažujúce v súčasnej geochémii. Toto nám indikuje, že mohli byť prvé životné formy na planéte (Wiegel a Adams, 1998). Táto možnosť je jeden z dôvodov, prečo sú termofilné organizmy študované tak extenzívne, no plné porozumenie princípov termostability si bude žiadať ďalšie výskumy a rozvoj v genetike, ktoré sú potrebné pre aplikáciu termofilov v budúcnosti.

2.4 Vysoká salinita

Pokiaľ by sme chceli rozdeliť vyššie organizmy do dvoch skupín, môžeme ich radiť na tie, ktorých bunky vyžadujú relatívne nízke koncentrácie NaCl (pre ľudí približne 0 % - 0,9 % - tzv. normálne alebo fyziologické podmienky), a tie, ktorých bunky vyžadujú zvýšené koncentrácie (napríklad morským rybám sa darí pri 3 % NaCl - salinita oceánov alebo ľudských slz). Koncentrácia 3 % znamená 30 gramov NaCl na liter vody (g/L). Avšak veľmi vysoká koncentrácia soli v hypersalinných jazerách, pôdach, soľankách alebo v rôznych prostrediach vytvorených ľudskou rukou, vylučuje vývoj väčšiny rýb, bezstavovcov, rastlín alebo dokonca aj niektorých prokaryot. Napriek tomu tu nájdeme mikroorganizmy, ktoré tu prosperujú. Organizmy žijúce v morskom prostredí ako ryby, cicavce alebo bezstavovce, sa museli naučiť tolerovať salinitu morskej vody a preto ich môžeme nazvať aj halotolerantné. Optimálny vývoj dosahujú za koncentrácií 0 % - 0,5 % NaCl, ale nakoľko sa nachádzajú v morskej vode, môžu tolerovať koncentrácie do 3 % (Canovas *et al.*, 1996). V kontraste k nim stoja obligátne halofily, ktorý pre svoj vývoj vyžadujú vyššie koncentrácie NaCl než 3 %. Preto ich podľa potreby množstva NaCl pre optimálny rast môžeme rozdeliť na: slabo halofilné (2 % - 5 %), mierne halofilné (5 % - 20 %), extrémne halofilné (20 % - 30 %), (Larsen, 1962). Niektoré iné definície hovoria o pravých halofiloch, ktorí rastú optimálne pri alebo nad 10 % NaCl. Asi najviac používané sú definície od pána Orena.

Extrémna salinita		koncentrácia NaCl v prostredí
halofil	a) slabý halofil	2 % - 5 %
	b) mierny halofil	5 % - 20 %
	c) extrémny halofil	20 % - 30 %
halotolerant	0 % - 0,5 % - optimálny rast (tolerancia do 3 % , napr. morské ryby, cicavce, bezstavovce)	

Tab. 5 Základné rozdelenie organizmov v prostredí extrémne vysokej salinity (upravené podľa Larsen, 1962; Canovas *et al.*, 1996).

Habitaty, ktoré obsahujú vysoké koncentrácie soli sú veľmi rozmanité. Niektoré by sa dali dokonca označiť za neobvyklé a predsa sú obývané halofilmi. Patria sem napríklad ropné

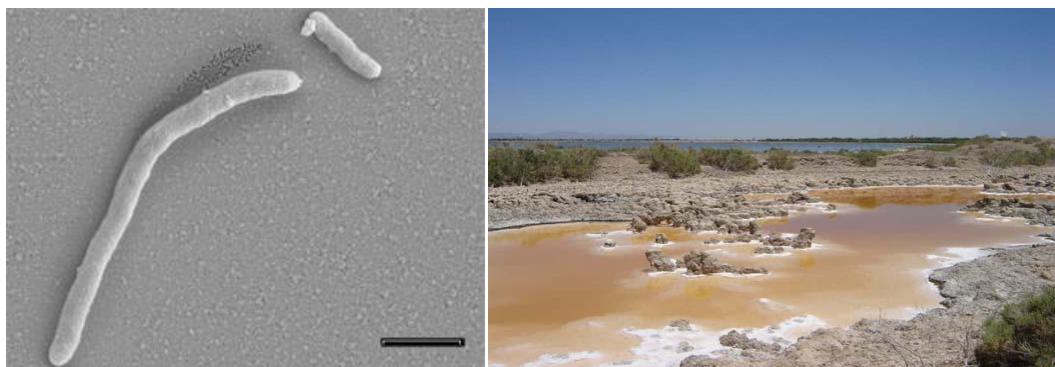
polia v Severnom mori (Lien *et al.*, 1998), uchované slané jedlá (Kobayashi *et al.*, 2000), a nosné dutiny púštnych leguánov (Deutch, 1994; Lawson *et al.*, 1996), avšak oceány, hypersalinné jazerá alebo evaporitmi pokryté plochy sú stále prevládajúce habitaty (Antunes *et al.*, 2008). Halotolerantné alebo halofilné mikroorganizmy boli izolované aj z morského ľadu polárnych oblastí (Bowman *et al.*, 1998). Salinita je samozrejme rozličná v rôznych habitatoch a jej rozsah môže byť od brakických vôd až po plne nasýtené vody, alebo od približne 0,5 % do 37 %, a viac. Prevažujúce sú Na⁺ a/alebo Cl⁻ soli, avšak Mg⁺⁺ alebo Ca⁺⁺ soli môžu byť takisto hojné (Canganella a Wiegel, 2011).

Aby mohli halofilné prokaryoty optimálne rásť, vyžadujú prítomnosť sodíkových iónov, čo spôsobí správne fungovanie membránovej respirácie, prijímanie živín alebo výroby ATP (Unemoto, 2000). Samozrejme sa musia vyhnúť toxickým hladinám sodíka v cytoplazme, ktoré získajú difúziou iónov z hypersalinného prostredia. Napriek tomu si mnoho halofilných baktérií udržiava zvýšené hladiny sodíkových iónov v cytoplazme (tzv. kompatibilné soluty - zvýšenie vnútorného osmotického tlaku). Vďaka ich intracelulárnym štruktúram a enzýmom adaptovaným a závislým na týchto hladinách, sú v prípade potreby schopné aktívne vytlačiť prebytočný sodík cez membrány (Deppenmeier *et al.*, 1999; Eddy a Jablonski, 2000), a tak vytvoriť gradient sodíkových iónov, využiteľný pre ďalšie procesy. Niektoré metanogénne (halofilné) baktérie využívajú sodíkovú pumpu na spojenie procesov prenosu metylu a Na⁺ cez cytoplazmatickú membránu. Sodíkový iónový gradient je takisto dôležitý pri syntéze ATP (Deppenmeier *et al.*, 1996; Baumer *et al.*, 2000). Prokaryoty, ktoré žijú v hypersalinnom prostredí, teda vyrovnávajú osmolaritu vnútri a zvonka bunkových obalov a zabezpečujú si tak vnútrobunkovú pevnosť medzi iónmi (hladina KCl alebo NaCl), (Galinski a Trüper, 1994), alebo akumulujú rozpustné organické látky (Roberts, 2005; Empadinhas a da Costa, 2008). Existenciu v prostredí s vysokou pevnosťou iónových väzieb umožňujú zložité vnútrobunkové úpravy a unikátne vlastnosti cytoplazmatických membrán. Štrukturálne a enzymatické proteíny halofilov sú takisto adaptované na činnosť v prostredí s vysokými koncentraciami rozpustných látok. Vnútrobunkové enzýmy niektorých obligátne halofilných archea sú stabilné a aktívne za vysokých koncentrácií solí, ale pod 2 - 3 M KCl denaturujú (Eisenberg, 1995).

Halofilné prokaryoty zahŕňajú anaeróbne a aeróbne archea aj baktérie. Anaeróbne baktérie reprezentujú fermentatívne, síran redukujúce a fototrofné rody, vrátane psychrofilov, mezofilov a termofilov (Ollivier *et al.*, 1994).

Slabé a mierne halofily, ktorý spracúvajú síran, sú zastúpené rodmi ako *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema* a

Desulfohalobium. Fototrofné rody sú napríklad *Chromatium*, *Chlorobium*, *Rhodospirillum*, *Rhodobacter*, *Thiocapsa* alebo *Ectothiorhodospira*. Dva druhy sú extrémne halofily, a to *Halorhodospira halophila* a *Halorhodospira halochloris* (Imhoff a Trüper, 1977). Medzi anaeróbne metanogénne archea patria rody ako *Methanohalophilus*, *Methanosalsum* alebo *Methanohalobium* (Ollivier *et al.*, 1998). Aeróbne archea sú zastúpené čeľad'ou *Halobacteriaceae* (Canganella a Wiegel, 2011; zhrnutá Oren *et al.*, 1997).



Obr. 4 Vľavo: Mierne halofilná baktéria rodu *Desulfohalobium* (upravené podľa URL 7). Vpravo: Extrémne hypersalinný rybník, Salton Sea, Kalifornia (upravené podľa URL 8).

2.5 Extrémy pH

Bunky vyšších organizmov, vrátane ľudí, existujú stabilne v rámci úzkeho rozsahu pH hodnôt. Väčšinou sú tieto hodnoty charakterizované okolo pH 7,4 a označované ako fyziologické. Morské ryby a bezstavovce uprednostňujú pre svoj život pH 8,1 - 8,4, čo je pH morskej vody. Naproti tomu mikroorganizmy sú schopné prosperovať za väčšieho rozsahu pH hodnôt než väčšina ľudských alebo iných eukaryotických buniek. Niektoré mikroorganizmy dokonca vyžadujú extrémne blízke koncom pH škály a nie sú schopné žiť pri neutrálnom pH (Canganella a Wiegel, 2011). Takéto extrémne organizmy označujeme ako acidofilné alebo alkalofilné. Záleží na hodnote pH prostredia, v ktorom sa nachádzajú.

Prvé výskumy zamerané na alkalofilov prebehli niekedy v 70. rokoch 20. storočia a špecializovali sa na enzýmy užitočné pre priemysel (Horikoshi, 1971). Jedna, čiastočne dôležitá priemyselná aplikácia, bola produkcia cyklodextrínu a jeho použitie v potravinárstve, chemikáliách alebo liečivách (Horikoshi, 1996).



Ob. 5 Vľavo: Acidofilná, zelená riasa *Dunaliella acidophila* (upravené podľa URL 9). Vpravo: Alkalické, slané jazero (ang. soda lake), San Luis Obispo, Kalifornia (upravené podľa URL 10).

2.5.1 Nízke pH

Organizmy uprednostňujúce extrémne nízke hodnoty pH sa nazývajú acidofilné. Vo všeobecnosti sú schopné rásť pri hodnotách $\text{pH} < 5$, avšak optimum dosahujú medzi hodnotami 2 - 4. Väčšina z nich si vyvinula veľmi efektívne mechanizmy pre udržanie vnútornej homeostázy. Vnútorne hodnoty pH v cytoplazme musia byť blízke neutrálnemu pH (Canganella a Wiegel, 2011).

Tento stav (osmotickej rovnováhy) dosahujú napríklad vytvorením reverzného membránového potenciálu a to čiastočným odchýlením vnútorného toku protónov (transport draslíku). Mnoho acidofilov má vyvinuté vysoko nepriepustné bunkové membrány, ktoré sú schopné zadržať prítok protónov do bunky a takisto pomocou transportérov v membráne exportovať protóny smerom z bunky. Množstvo týchto transportných molekúl je väčšie než u mikroorganizmov žijúcich v neutrálnom pH. Celkovo sa snažia znížiť energetické nároky pri transporte potrebných živín do bunky. Pomoc pri dosiahnutí pH homeostázy môžu poskytnúť aj enzýmy alebo chemické látky, ktoré sú schopné viazať alebo izolovať protóny. V porovnaní s mikroorganizmami žijúcimi v neutrálnom pH, majú acidofily účinnejší systém na opravu DNA a proteínov, ktorý je v prostredí nízkeho pH nevyhnutný (Booth, 1985; Johnson, 1998; Dopson *et al.*, 2004; Baker-Austin a Dopson, 2007). Niektoré termofilné a zároveň acidofilné mikroorganizmy majú tendenciu zvyšovať množstvo purínov (stavba DNA a RNA) v kodónoch, ktoré sú omnoho odolnejšie voči teplotnej denaturácii než pyrimidíny, ale nanešťastie sú za nízkeho pH veľmi citlivé na kyslú hydrolyzu a to môže spôsobiť s tým spojené mutácie (Canganella a Wiegel, 2011).

Acidné habitaty sú v prírode veľmi hojné a je niekoľko prírodných procesov, ktoré ich môžu vytvoriť. Napríklad prokaryotický metabolizmus, ktorý zahŕňa nitrifikáciu, akumuláciu

organických kyselín počas fermentatívneho alebo aeróbného metabolizmu alebo oxidácia elementárnej síry. Niektoré pôdy vulkanického pôvodu (solfatary, fumaroly), sú vo všeobecnosti acidné a bohaté na elementárnu síru, ako aj mnoho horúcich prameňov a oblastí, ktoré ich obklopujú. Väčšina extrémne acidných prostredí vďaka svoj vznik antropogénnej činnosti, a to ťažbe kovov a uhlia (Johnson, 1998; Bond *et al.*, 2000).

Organické zlúčeniny, ktoré niektoré acidofily vytvárajú, v spojení s ich toleranciou voči ťažkým kovom, ich popisuje ako vhodných kandidátov pri bioremediácii acidných odpadných vôd, ktoré sú kontaminované ťažkými kovmi a toxickými organickými zlúčeninami (Gemmell a Knowles, 2000).

Jedna z najviac preskúmaných acidofilných prokaryot je baktéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* (pH < 3), ktorá dokáže oxidovať železo alebo síru (Leduc a Ferroni, 1994). Medzi ďalších acidofilov patrí zelená riasa *Dunaliella acidophila*, ktorá je adaptovaná na pH v rozmedzí 0 - 3 (Cavicchioli a Thomas, 2000), alebo termofilne-acidofilná riasa *Cyanidium caldarium*, ktorá sa skúmala hlavne pre jej reguláciu polyfosfátu (Nagasaka a Yoshimura, 2008). Aj niektoré protozoá sú obligátne acidofily, ako napríklad *Vahlkampfia* sp., ktorá môže rásť pri pH 1,6 a živí sa inými acidofilnými baktériami (Johnson a Rang, 1993).

Extrémne nízke pH		
acidofil	schopnosť rastu pri pH < 5	
	optimum	pH 2 - 4

Tab. 6 Základná charakteristika mikroorganizmov v prostredí extrémne nízkeho pH (upravené podľa Canganella a Wiegel, 2011).

2.5.2 Vysoké pH

Organizmy preferujúce vysoké hodnoty pH nazývame alkalofilné. Niektoré organizmy však vysoké hodnoty pH nepreferujú, ale dokážu ich tolerovať. Tieto nazývame alkalotolerantné (optimum pH < 8,5; max. pH ≥ 9), (Wiegel, 1998). Mikroorganizmy, ktoré nazývame alkalofily, rastú optimálne za pH > 9, no za hodnôt blízkych neutrálnemu pH rastú veľmi pomaly alebo vôbec (Canganella a Wiegel, 2011).

Kľúčovú úlohu pri udržaní intracelulárneho pH v rozmedzí 7 - 8,5 má bunkový povrch. Avšak v súčasnej dobe niesú tieto adaptačné mechanizmy dostatočne preskúmané, v porovnaní s acidofilmi (Canganella a Wiegel, 2011).

Alkalofilov môžeme izolovať aj z prostredí ako záhradná pôda. Častejšie ich ale nachádzame v prostrediach extrémne alkalických a to hlavne v alkalických jazerách (ang. "soda lakes"), v ktorých je vysoký obsah uhličitanu sodného (Na_2CO_3), ktorý sa na dne pretvára v tzv. kalcinovanú sódu, nasýtenú sodnými soľami (chlorid, karbonát, bikarbonát), s pH okolo 10. V okolí týchto jazier môže byť prítomné veľké množstvo evaporitov (Duckworth *et al.*, 1996). Vplyvom priemyselnej činnosti človeka sa vytvorili niektoré neprirodzené alkalické prostredia (papierne, garbiarne, detergenty, ...), (Canganella a Wiegel, 2011). Mikrobiálne procesy ako amonifikácia alebo redukcia sulfátu vedú k vytvoreniu stabilného, trvalo alkalického prostredia (Cavicchioli a Thomas, 2000).

Niektorá alkalofily sú anaeróbne, mnoho je halofilných, ale väčšina z nich je halotolerantných (Zhilina *et al.*, 1996). Alkalofilné mikroorganizmy vyžadujú pre svoj rast a metabolizmus ióny sodíka. Tie zabezpečujú intracelulárne množstvo H^+ iónov na vysokej úrovni (protónový gradient), vďaka čomu môžu aeróbne alkalofily udržať pH cytoplazmy o približne dve jednotky nižšie než pH okolia a anaeróbne približne o jednu jednotku (Mesbah *et al.*, 2009). Intracelulárne enzýmy alkalofilov majú vyššie rýchlosti katalýzy za približne neutrálnych hodnôt pH, naproti tomu enzýmy exkretované majú rýchlejšiu katalýzu za pH optimálneho rastu alkalofilov (Larson a Kallio, 1954).

Taxóny, ktoré patria do alkalofilov sú napríklad prokaryoty (vrátane cyanobaktérií), a to niektorí členovia radu *Chroococcales* a niekoľko druhov z rodu *Spirulina*, z archeí sú to napríklad *Halorubrum vacuolatum*, *Natrialba magadii* alebo niektoré druhy *Natrococcus* (Canganella a Wiegel, 2011).

Extrémne vysoké pH			
alkalotolerant	optimum pH < 8,5		max. pH \geq 9
alkalofil	fakultatívny	min. pH < 8	opt. pH > 8,5; pri hodnotách blízkych neutrálnemu pH (6,5) niesú schopné rastu, alebo rastú veľmi pomaly
	obligátny	min. pH > 8	

Tab. 7 Základné rozdelenie organizmov v prostredí extrémne vysokého pH (upravené podľa Wiegel, 1998).

3.0 Nepravý extrémofil

Pojmom nepravý extrémofilný organizmus sa rozumie jedinec, ktorý toleruje extrémne podmienky prostredia, no pre svoj optimálny rast a vývoj preferuje absenciu týchto stresových faktorov (Hendry, 2006). Ďalej sú uvedené niektoré vybrané typy tzv. nepravých extrémofilov.

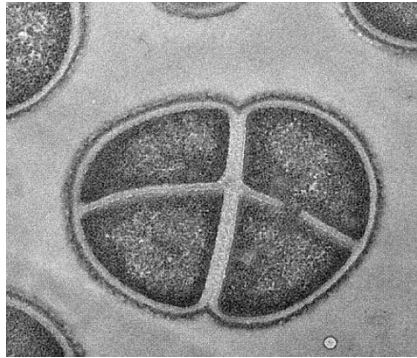
3.1 Odolnosť voči radiácii

Zem je neustále ostreľovaná rôznymi typmi elektromagnetického žiarenia, ktoré ovplyvňujú jej biosféru. Zdroje môžu byť prírodné, ako napríklad Slnko, no častokrát je pôvod žiarenia v ľudských aktivitách. Takýto človekom vytvorený typ žiarenia o krátkych vlnových dĺžkach môže byť gamma žiarenie alebo Röntgenové žiarenie, ktoré môžu spôsobiť stratu elektrónov z atómu alebo ich ionizáciu. Pravidelné vystavenie DNA Röntgenovému žiareniu spôsobí zničenie bází alebo narušenie základnej štruktúry, vrátane mutácií, alebo dokonca smrť organizmu. Ultrafialové žiarenie má väčšinou väčšie vlnové dĺžky (220 - 300 nm) a takisto môže zničiť DNA tak, že vytvorí tymínové diméry. Niektoré mikroorganizmy majú mechanizmy, ktoré tieto poškodenia dokážu opraviť. Našťastie je väčšina UV žiarenia absorbovaná zemskou atmosférou predtým, než dosiahne povrch. Napriek tomu sa UV žiarenie využíva pri procese sterilizácie povrchov alebo vzduchu.

Viditeľné svetlo a žiarenia o vyšších vlnových dĺžkach ako infračervené alebo rádio vlny, sú v podstate veľmi málo škodlivé pre bunkové štruktúry. Niektoré oblasti na Zemi sú v priebehu roka dlhšiu dobu a intenzívnejšie vystavené radiácii. Ide napríklad o oblasti s tenšou atmosférou (územia blízko pólův, špeciálne so sezónnym poklesom alebo výzdvihom hodnoty ozónovej diery), alebo oblasti, ktoré sú vystavené väčšiemu množstvu slnečného žiarenia (v blízkosti rovníka). Mikroorganizmy používajú rôzne pigmenty (napr. karotenoidy - ničia nebezpečné kyslíkové radikály; melanín), ktoré dokážu škodlivý účinok rozličných foriem žiarenia absorbovať, alebo stlmiť (Canganella a Wiegel, 2011).

Mnohé mikroorganizmy, napríklad z kmeňa baktérií *Firmicutes*, si vyvinuli adaptácie ako vytvorenie endospór (peptidoglykán a odolné proteíny), ktoré dokážu ochrániť DNA pred poškodením a to spojením tejto molekuly s malými, v kyseline rozpustnými proteínmi výtrusov (Setlow, 1994). Rod *Deinococcus* takisto obsahuje vysoko aktívny systém na opravu DNA. V prípade poškodenia genómu, využije poškodené genómy ostatných svojich buniek,

ktoré pospája do jedného funkčného. Vytvorí sa tak templát, pomocou ktorého dokáže opraviť alebo nahradiť radiáciou poškodené DNA (Battista, 1997).



Obr. 6 Príklad rezistentnej baktérie *Deinococcus radiodurans* (upravené podľa URL 11).

3.2 Ďalšie druhy nepravých extrémofilov

V posledných pár dekádach rokov bolo preskúmaných veľké množstvo mikroorganizmov a preto nie je ničím výnimočným, že pojem extrémofil sa začal vzťahovať aj na iné, než hlavné skupiny extrémofilov. Prieskum extrémofilných mikroorganizmov ide ruka v ruku s rozvojom a záujmom o exobiológiu. Nakoľko je téma extrémofilov pomerne obsiahla, je bližšie priblíženie skupín pravých extrémofilov prvoradá a je podstatné aspoň okrajovo spomenúť skupiny tzv. "nepravých" extrémofilov, z ktorých jedna z tých dôležitejších skupín bola stručne popísaná už v predchádzajúcom texte.

Medzi ďalšie významné skupiny patria mikroorganizmy, ktoré sú schopné odolávať podmienkam suchého prostredia, ktoré môže spôsobiť vysušenie celého organizmu. Za najsuchšie miesto na Zemi je považovaná púšť Atacama na západnom pobreží Južnej Ameriky, ktorá poskytuje vhodné prostredie pre výskum práve takýchto extrémnych mikroorganizmov, ktoré sú významnými obyvateľmi tejto oblasti (Wettergreen *et al.*, 2005; Dress *et al.*, 2006). Medzi dôležité organizmy vo výskume takýchto typov extrémofilov sú hlavne lišajníky. Pomocou nich sa dajú pochopiť niektoré molekulárne osobitosti a fyziológia mikroorganizmov.

Výskum sa zameriava aj na skupiny mikroorganizmov schopné tolerovať rôzne typy rozpúšťadiel, ktoré by iným organizmom spôsobili nenávratné poškodenia lipidových štruktúr v membránach (Hirayama *et al.*, 1998). Jedným z takýchto mikroorganizmov je rod *Pseudomonas*, ktorý dokáže tolerovať vysoké koncentrácie toluénu (10 % - dokonca 50 %)

(Inoue a Horikoshi, 1989). Väčšinu mikroorganizmov by zabila už koncentrácia 0,01 % toluénu v prostredí (Hirayama *et al.*, 1998).

Za extrémne podmienky sa považujú aj prostredia so zníženým obsahom živín, ktoré organizmy pre svoj rast potrebujú. Takýmto prostrediam sa vraví aj oligotrofné. Z takéhoto prostredia bola izolovaná napríklad ultramikrobaktéria *Sphingomonas*, ktorá sa dokáže úspešne zotavovať po vplyve UV-B radiácie. Je to spôsobené faktom, že žije a darí sa jej vo vrchných častiach vodného stĺpca a tak si vytvorila mechanizmus, ktorý jej umožňuje žiť v bezkonkurenčnom prostredí (Joux *et al.*, 1999).

4.0 Ramanova spektroskopia

Využitie Ramanovej spektroskopie sa považuje za nedeštruktívnu, analytickú metódu, schopnú identifikovať látky v rôznych skupenstvách (pevné, kvapalné, plynné). Jedná sa o veľmi rýchlu metódu, ktorá na základe rozptýleného žiarenia, ktoré je spätne detegované, vytvorí tzv. Ramanove spektrum. Na základe porovnania tohto spektra so spektrami, ktoré sú uložené v rôznych databázach sa zistí, o akú pozorovanú látku sa jedná. Pri meraní sa využíva laserového žiarenia o rôznych vlnových dĺžkach.

V súčasnej dobe má Ramanova spektroskopia využitie v rôznych oblastiach. Je to napríklad oblasť umenia, kedy sa využíva pri zisťovaní veku obrazov, sôch, alebo pri overovaní ich pravosti. Takisto je možnosť využitia v kriminalistike (drogy), alebo v prírodných vedách, čo je z časti popísané v tejto bakalárskej práci. Proces miniaturizácie Ramanových spektrometrov vedie k rozširovaniu využitia tejto metódy.

Aj táto metóda má svoje výhody a nevýhody. Medzi hlavné výhody patrí rýchlosť, nedeštruktívnosť, schopnosť pracovať s kvapalným, plynným aj pevným skupenstvom (amorfné, organické a anorganické látky), možnosť práce s malým množstvom vzorku, praktickosť, mobilita, rozsiahle využitie (kriminalistika, umenie, exobiológia atď.).

Na druhej strane stoja nevýhody, medzi ktoré patria problémy pri meraní ultrastopových množstiev, kovov, vysoká teplota laseru (opatnosť pri meraní organických látok) - dá sa nastaviť. Niektoré vhodné molekuly sa dajú detegovať aj v nízkych obsahoch. Nie všetky látky musia mať nutne Ramanove spektrum. Problém môže nastať pri prítomnosti fluorescencie, ktorá v niektorých látkach zakryje významné pásy nameraného spektra. Jednou z možností ako tomu zabrániť, je zvolenie laseru o vhodnej vlnovej dĺžke, ktorá fluorescenciu nespôsobí.

4.1 Aplikácia v prírodných vedách

Rozsiahle využitie Ramanovej spektroskopie zasahuje veľkou časťou do oblasti prírodných vied, ako bolo naznačené už v predchádzajúcom texte.

Významnou zložkou každej živej bunky a tým pádom aj organizmu, je voda. Pre život ako ho poznáme je to základný element, potrebný ako zdroj živín, rozpúšťadlo pre biochemické procesy a vytvára prostredie pre život. Ramanova spektroskopia má význam aj z hľadiska mineralógie a to z toho dôvodu, že je schopná v minerálnych fázach rozpoznať obsahy vody (v podobe H_2O alebo OH), čo môže znamenať prítomnosť určitých druhov mikroorganizmov, častokrát extrémofilných. V časti o extrémofilných mikroorganizmoch bola demonštrovaná rôznorodosť prostredí, v ktorých je život schopný prosperovať. V týchto prostrediach je vysoká pravdepodobnosť, že tu organizmus zanechá nejaké stopy po svojej minulej alebo súčasnej existencii, ktoré sa dajú považovať za dôkaz života na danom mieste. Takéto látky, alebo stopy, sa nazývajú biomarkery. Ramanova spektroskopia nám pomáha tieto látky detegovať a charakterizovať. Jedným z významných biomarkerov sú pigmenty, konkrétne karotenoidy, ktoré sú organické látky produkované hlavne rastlinami, ale napríklad aj mikroorganizmami. Tie im slúžia napríklad ako ochrana pred škodlivou radiáciou alebo zdroj energie, pretože dokážu likvidovať nebezpečné kyslíkové radikály. Pomocou Ramanovej metódy je v teréne možné identifikovať biomarkery priamo na mieste. Tohto faktu sa využíva aj vo výskume prof. RNDr. Jana Jehličky, Dr. a jeho tímu. Takisto je možnosť merania rôznych biomarkerov priamo v hornine, bez potreby narušenia štruktúry danej horniny.

5.0 Exobiológia

Ďalšou významnou oblasťou, kde sa Ramanova spektroskopia uplatňuje, je exobiológia (astrobiológia). Tento vedný obor, ako už bolo spomenuté v úvode, je akési spojenie viacerých zameraní (biológia, geológia, geochémia, biochémia a mnoho ďalších), ktoré vzájomne spolupracujú a snažia sa preskúmať možnosti života vo vesmíre a popísať podmienky pre život, ktoré sú v rôznych jeho častiach a hlavne telesách veľmi odlišné. V podstate sú to podmienky extrémne. Vzhľadom k obmedzeným možnostiam výskumu na iných vesmírnych telesách (financie, vzdialenosť, technológie), je výskum extrémnych prostredí uskutočňovaný hlavne na Zemi. Nakoľko je naša planéta rôznorodá, čo sa týka prostredí a životných podmienok, výskum je lokalizovaný hlavne do extrémnych oblastí. Ide

o miesta extrémne aridné alebo chladné, oblasti s extrémnymi teplotami alebo salinitou. Prípadne viaceré faktorov naraz (púšť Atacama - práca Vitek *et al.*, 2012). Dáta, ktoré sa takto získajú sú vyhodnotené a na ich základe sa orientuje smer výskumu v exobiológii, ktorý sa môže zamerať na iné vesmírne telesá.

Aktívne skúmaným vesmírnym telesom je planéta Mars. Po preukázaní existencie vody na "Červenej planéte" sa výskum ešte zintenzívnil. Preskúmalo ju už niekoľko pozemských sond, niektoré na jeho povrchu stále operujú a iné misie sú naplánované do budúcnosti. Jednou z takých má byť aj misia ExoMars (ESA - 2018), ktorej súčasťou sa má stať miniaturizovaný Ramanov spektrometer. Jeho úlohou bude preskúmať povrch a zrejme aj oblasť pod povrchom (približne 2 metre). Výhodou je rýchlosť a nedeštruktívnosť metódy a samozrejme okamžitá detekcia organických látok, ktoré sú pre exobiológiu veľmi dôležité. Takisto je výskum exobiológie zameraný aj na charakter prostredí iných vesmírnych telies (Európa, Titán) a pozornosť sa sústreďuje aj na zloženie hornín. V tejto oblasti by mohol dôležitú úlohu zohrať opäť Ramanov spektrometer, ktorý túto analýzu dokáže sprostredkovať. Problémom by mohli byť opäť otázky financií a politiky.

6.0 Porovnanie dvoch druhov spektrometrov

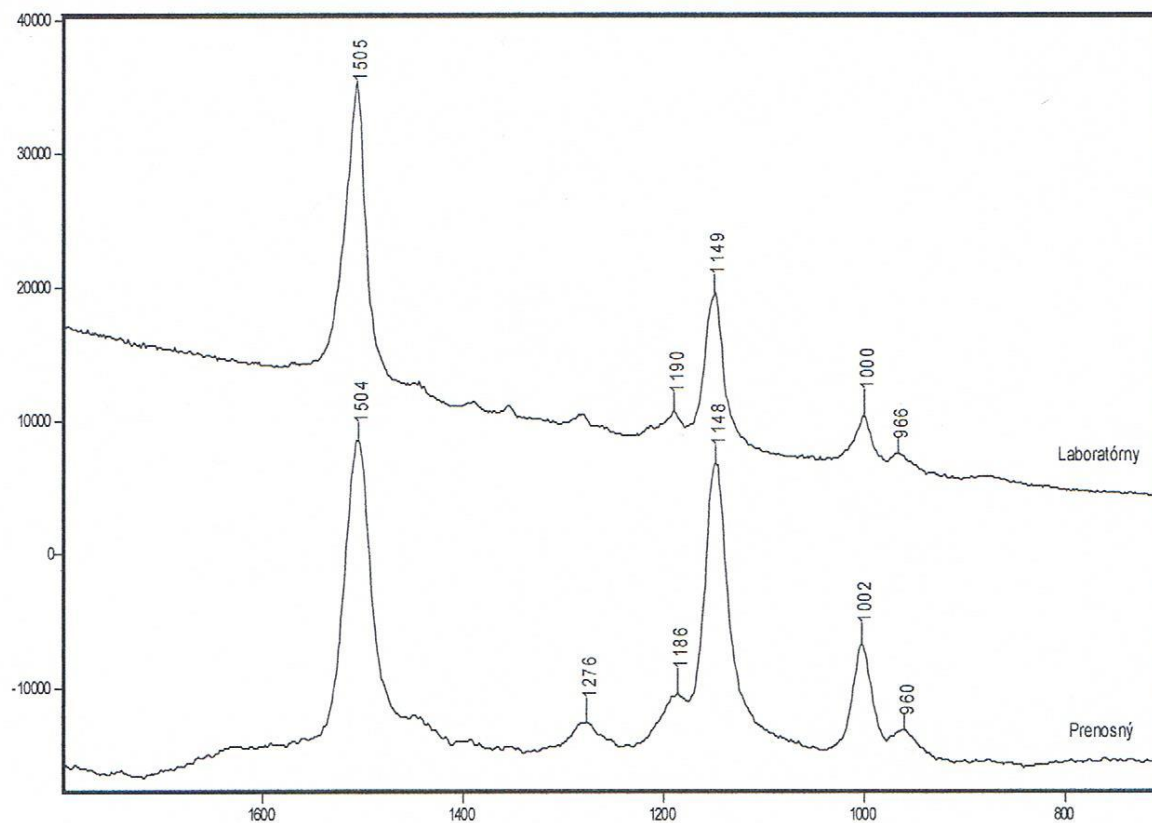
Praktické využitie tejto metódy sme sa rozhodli demonštrovať na vzorke sadrovca z lokality Eilat, štát Izrael. Vzorka pochádza z evaporitov Červeného mora. Miestami sú dnové vrstvy sadrovca kolonizované halofilnými organizmami. Povrchová oranžová vrstva je obývaná cyanobaktériami rodu *Halothece*, pod nimi leží vrstva zelených, filamentárnych cyanobaktérií rodu *Phormidium* a najhlbšia vrstva je tvorená červenými, anoxygénymi fototrofnymi. Prítomnosť týchto organizmov sme sa rozhodli dokázať pomocou dvoch druhov Ramanovho spektrometra a pomocou identifikácie ich charakteristického pigmentu. Predchádzajúce štúdiá dokázali prítomnosť karotenoidu spiriloxanthinu a bacteriochlorophylu v študovanej červenej vrstve.

Prvé meranie sme uskutočnili na laboratórnom (statickom) Ramanovom mikrospektrometri, ktorý používa argónový laser o vlnovej dĺžke $\lambda = 514$ nm. Ako štandard pre kalibráciu prístroja sme použili kryštál diamantu. Vhodným výberom akumulácie, intenzity a doby expozície sme dosiahli očakávaný výsledok (viď graf 1). Takisto sme minimalizovali prejav šumu, ktorý môže byť rušivým elementom pri meraní. Spôsobuje ho napríklad okolitý vzduch, alebo celkové prostredie, v ktorom sa spektrometer nachádza.

Typicky sa v nameranom spektre karotenoidov objavia tri peaky. Výsledné spektrum sa potom porovnávalo s existujúcou databázou a určila sa zhoda.

Nakoľko je množstvo druhov pigmentov v organizmoch veľmi vysoké, nie sú všetky existujúce karotenoidy pomenované. Z tohto dôvodu sa vytvárajú obsiahle databázy, ktoré nám umožňujú spoľahlivo porovnať namerané spektrá a týmto zistiť zhodu alebo odchýlku. Samozrejme, nie všetky látky na Zemi sú v týchto databázach zaznamenané.

V ďalšom kroku sme meranie opakovali, tentokrát však za použitia prenosného Ramanovho spektrometra o vlnovej dĺžke $\lambda = 532$ nm. Pre kalibráciu prístroja sme použili bezfarebný benzonitril, ktorý sa často používa aj ako rozpúšťadlo. Namerané hodnoty nám opäť dali tri peaky, ktoré sa zhodovali s databázou spektier. Navyše sa s miernou odchýlkou (kt. bola v norme) zhodovali aj s nameranými hodnotami na laboratórnom mikrospektrometri (viď graf 1).



Graf 1 Namerané Ramanove spektrá. Obe spektrá preukázali tri signifikantné peaky, ktoré charakterizujú skupinu pigmentov - karotenoidy. Osa x udáva hodnoty tzv. Ramanovho posunu (shift) v cm^{-1} . Osa y udáva hodnoty rozptylu žiarenia (počet fotónov). Merania sú takmer identické, čo dokazuje presnosť a správnosť merania.

Získané Ramanove spektrá obsahujú pásy karotenoidu: cca 1 505, 1 149 a 1 000 cm^{-1} . Tieto hodnoty môžu byť považované za blízke hodnotám získaným pri štúdiu organizmu *Ectothiorhodospira marismortui*, ktorá produkuje spiriloxanthin (bližšie popísané v práci Jehlička *et al.*, 2012). Iným možným kandidátom by mohol byť bakterioruberin, bežný u mnohých halofilov, avšak ten v uvedenej polohe popísaný nie je. Výskumom pigmentu bakterioruberin sa zaoberal bližšie výskum Jehlička *et al.*, 2013, ktorý pomocou Ramanovej spektroskopie študoval výskyt tohto pigmentu v extrémne halofilných archea a baktériách.

Takto zistené hodnoty nám dokázali, že oba prístroje sú schopné pracovať presne a poskytnúť spoľahlivé dáta. Nieje to však pravidlo a ako už bolo uvedené v časti výhody a nevýhody Ramanovej spektroskopie, každá metodika výskumu má svoje chyby, kvôli ktorým treba k riešenému problému pristupovať opatrne.

Diskusia

Porovnaním získaných informácií o téme extrémofilných mikroorganizmov a zameraním sa hlavne na ich základnú charakteristiku zistujeme, že popisy a informácie sa často pohybujú okolo akéhosi priemeru. Preto nemôžeme povedať, že existuje nejaký použiteľný štandard. Preto sa v rôznych publikáciách stretávame s individuálnym prístupom a často je problém zvoliť, ktorý popis je pre nás najvhodnejší. Pokiaľ napríklad popisujeme maximálnu teplotu, pri ktorej je organizmus schopný prosperovať a prežiť, zistíme, že autori síce vymedzia tri skupiny termofilov, ale každej je priradené iné rozpätie teplôt. Je potom na nás, aby sme zvolili to, ktoré je pre nás vhodné. Prípadne, ak máme dostatok informácií, vytvoriť si skupiny vlastné. Vtom prípade sa ale dostávame opäť na začiatok problému, pretože sme znova vytvorili ďalšiu charakteristiku. Pochopiteľne, každý autor uznáva svoju pravdu, pretože pri jej vytváraní ju podkladá množstvom dát a informácií, ktoré sú výsledkom dlhodobého výskumu. Takto nám hranice, pokiaľ až extrémny spôsob života zasahuje, značne varujú. Výskum sa preto pohybuje v akomsi kruhu, ktorý je problém opustiť.

Pri používaní Ramanovej spektroskopie sa namerané dáta porovnávajú s existujúcimi databázami spektier. Preto je potrebné, aby sa pre daný typ laseru, ktorý bol pri meraní použitý, vytvárali hromadné databázy. Tie potom urýchlia popis výsledkov meraní. Samozrejme, takéto súbory spektier už existujú, no v budúcnosti je potreba ich rozširovať.

Posúvanie hraníc využitia rôznych metód je prvoradý krok v exobiologickom výskume. Pomôže nám to lepšie pochopiť princípy a hranice života na Zemi a použiť tieto informácie vo výskume života vo vesmíre.

Záver

Životné podmienky, ktoré sa na Zemi vytvorili v rôznych prostrediach, sú zdrojom obrovskej druhovej diverzity. Každý z týchto organizmov si vytvoril špecifické adaptácie na prežitie v danom prostredí. Aby sme správne pochopili princíp života organizmov žijúcich v danom prostredí, musíme najprv správne pochopiť charakter prostredia. Faktory, ktoré vplývajú na životné prostredie organizmov, sú napríklad teplota, tlak, salinita, pH, slnečné žiarenie a ďalšie. Na väčšine miest našej planéty dosahujú často extrémnych hodnôt, čím vplývajú na základný prvok potrebný pre život ako ho poznáme, a to je voda.

Pokiaľ chcú organizmy žijúce v takýchto podmienkach úspešne prosperovať a tým pádom využívať vodu ako zdroj života, musia sa vhodne adaptovať. Organizmy, ktoré sa extrémnym podmienkam prostredia prispôbili, nazývame extrémofily. Jedná sa prevažne o mikroorganizmy. Faktor, ktorý dosahuje extrémnych hodnôt, udáva špecifický názov extrémofila. Za pravých extrémofilov sú považované termofily, psychrofil, barofily, halofily, alkalofily a acidofily. Nepravé extrémofily sú napríklad organizmy odolné voči rôznym druhom radiácie alebo extrémnemu suchu. Skupiny extrémofilov sa v dnešnej dobe značne rozširujú a to hlavne kvôli intenzívnemu výskumu v tejto oblasti a aj vďaka neustále sa posunujúcim hraniciam charakteristiky extrémneho života. Je dôležité, aby boli tieto hranice jednotné, a to z dôvodu zrozumiteľnosti vymedzenia jednotlivých skupín. Individuálny prístup k jednotlivým skupinám extrémofilov a neustále sa posunujúce hranice extrémneho života však tento krok dosť komplikujú.

Výskum extrémofilov je veľmi dôležitý krok pre ďalšie odvetvia vedy. Správne pochopenie fyziologickej podstaty mikroorganizmov je prvoradé pre aplikáciu princípov života extrémofilov v obore exobiológie. Exobiológia je veda zaoberajúca sa možnosťami života v okolitom vesmíre a vesmírnych telesách. V poslednej dobe sa sústredila predovšetkým na planéty a telesá našej slnečnej sústavy. Možnosti, ktoré sú dnešnému človeku k dispozícii, nám umožňujú prieskum Marsu a to priamo na jeho povrchu. Záujem je venovaný aj iným telesám ako Jupiterov mesiac Európa, alebo Saturnov mesiac Titán. Dáta, ktoré nám vesmírne sondy o charaktere Marsu poskytli, sú dôležité pre porovnanie extrémnych podmienok na Marse a na Zemi.

Súčasná technológia nám umožnila bližšie poznanie povrchu Marsu aj jeho atmosféry, zloženie hornín a preukázali prítomnosť vody. Toto zistenie bolo veľkým impulzom pre intenzívnejšie bádanie, ktoré by mohlo identifikovať určité stopy po živote, alebo preukázať

jeho prítomnosť. Takéto stopy nazývame biomarkery. Jedná sa teda o stopy súčasnej alebo minulej prítomnosti organizmov, ktoré môžu dokázať možnosť života na danom mieste.

Jednou z týchto technológií, ktoré by mohli napomôcť exobiologickému výskumu na iných vesmírnych telesách, je Ramanova spektroskopia. Jedná sa o nedeštruktívnu metódu, ktorá na základe analýzy rozptylu späťne odrazeného laserového žiarenia dokáže určiť, o akú látku sa jedná. Aplikácia je možná na pevné, plynné a aj kvapalné skupenstvá, a to aj vo veľmi malých množstvách. Takisto je schopná charakterizovať biomarkery, konkrétne určité pigmenty, a preukázať prítomnosť vody. Namerané dáta je potom možné porovnať s databázami spektier a hneď určiť, o akú látku alebo pigment sa jedná. Vytváranie takýchto databáz spektier je výhodou a uľahčuje vedeckú činnosť. Preto by sa malo aj v budúcnosti pracovať na vytváraní ďalších takýchto databáz. Ramanove spektrometre majú v súčasnosti široké využitie a to hlavne kvôli ich prenosnej verzii, vhodnej do terénu. Laboratórne mikrospektrometre a takisto aj prenosné ukazujú, že vhodným postupom a využitím, je možné získať spoľahlivé dáta z oboch prístrojov.

Zoznam použitej literatúry

Aguilar A (1996) Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiol* 85:89-92

Aguilar A, Ingemansson T, Magniea E (1998) Extremophile microorganisms as cell factories: support from the European Union. *Extremophiles* 2:367-373

Antranikian G, Vorgias CE, Bertoldo C (2005) Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 96:219-262

Antunes A, Rainey FA, Wanner G, Taborda M, Patzold J, Nobre MF, Da Costa MS, Huber R (2008) A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea. *J Bacteriol* 190:3580-3587

Arahal DR, Gutierrez MC, Volcani BE, Ventosa A (2000) Taxonomic analysis of extremely halophilic archaea isolated from 56-years-old Dead Sea brine samples. *Syst Appl Microbiol* 23:376-385

Baker-Austin C, Dopson M (2007) Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol* 15:165-171

Battista JR (1997) Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu Rev Microbiol* 51:203-224

Baumer S, Ide T, Jacobi C, Johann A, Gottschalk G, Deppenmeier U (2000) The $F_{420}H_2$ dehydrogenase from *Methanosarcina mazei* is a redox-driven proton pump closely related to NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 275:17968-17973

Bond PL, Smriga SP, Banfield JF (2000) Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl Environ Microbiol* 66:3842-3849

Booth IR (1985) The regulation of intracellular pH in bacteria. *Novartis Found Symp* 221:19-28

Bowman JP, McCammom SA, Brown JL, McMeekin TA (1998) *Glacielcola punicea* gen. nov., sp. nov. and *Glacielcola pallidula* gen. nov., sp. nov.: psychrophilic bacteria from Antarctic sea-ice habitats. *Int J Syst Bacteriol* 48:1213-1222

Canganella F, Wiegel J (2011) Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften* 98:253-279

- Canovas D, Vargas C, Csonka LN, Ventosa A, Nieto JJ (1996) Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *J Bacteriol* 178:7221-7226
- Cavicchioli R, Siddiqui SK, Andrews D, Sowers K (2002) Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotech* 13:253-261
- Cavicchioli R, Thomas T (2000) Encyclopedia of microbiology vol 2, 2. vyd., Academic: London 317-337
- Deegenaaars ML, Watson K (1998) Heat shock response in psychrophilic and psychrotrophic yeast from Antarctica. *Extremophiles* 2:41-49
- DeLong EF, Franks DG, Yayanos AA (1997) Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:2105-2108
- Deppenmeier U, Mülle V, Gottschalk G (1996) Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch Microbiol* 165:149-163
- Deppenmeier U, Lienard T, Gottschalk G (1999) Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Lett* 457:291-297
- Deutch CE (1994) Characterization of a novel salt-tolerant *Bacillus* sp. from the nasal cavities of desert iguanas. *FEMS Microbiol Lett* 121:55-60
- Dropson M, Baker-Austin C, Hind A, Bowman JP, Bond PL (2004) Characterization of *Ferroplasma* Isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol* 70:2079-2088
- Dress KP, Neilson JW, Betancourt JL, Quade J, Henderson DA, Pryor BM, Maier RM (2006) Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama Desert, Chile. *Appl Environ Microbiol* 72:7902-7908
- Duckworth AW, Grant WD, Jones BE, Van Steenberg R (1996) Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles. *FEMS Microbiol Ecol* 19:181-191
- Eddy ML, Jablonski PE (2000) Purification and characterization of a membrane-associated ATPase from *Natronococcus occultus*, a haloalkaliphilic archaeon. *FEMS Microbiol Lett* 189:211-214
- Eisenberg H (1995) Life in unusual environments: progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria. *Arch Biochem Biophys* 318:1-5

- Empadinhas N, Da Costa MS (2008) Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Internat Microbiology* 11:151-161
- Fang J, Barcelona MJ, Nogi Y, Kato C (2000) Biochemical implications and geochemical significance of novel phospholipids of the extremely barophilic bacteria from the Marianas Trench at 11,000 m. *Deep Sea Res I Oceanogr Res Pap* 47:1173-1182
- Fields PA (2001) Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp Biochem Physiol* 129:417-431
- Galinski EA, Trüper HG (1994) Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 15:95-108
- Gemmell RT, Knowles CJ (2000) Utilisation of aliphatic compounds by acidophilic heterotrophic bacteria. The potential for bioremediation of acidic wastewaters contaminated with toxic organic compounds and heavy metals. *FEMS Microbiol Lett* 192:85-190
- Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP, Claverie P, Collins T, D'Amico S, Dumont J, Garsoux G, Georgette D, Hoyoux A, Lonhienne T, Meeuwis MA, Feller G (2000) Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol* 18:103-107
- Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP, Claverie P, Collins T, D'Amico S, Dumont J, Garsoux G, Georgette D, Hoyoux A, Lonhienne T, Meeuwis MA, Feller G (2000) Cold adapted enzymes: from Fundamentals to biotechnology. *Tibtech* 18:103-107
- Grant WD (1988) Bacteria from alkaline, saline environments and their potential in biotechnology. *J Chem Technol Biotech* 42:291-294
- Hendry P (2006) Extremophiles: There's more to life. *Environ Chem* 3:75-76
- Hirayama H, Takami H, Inoue A, Horikoshi K (1998) Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from *Pseudomonas putida* IH-2000. *FEMS Microbiol Lett* 169:219-225
- Horikoshi K (1996) Alkaliphiles from an industrial point of view. *FEMS Microbiol Rev* 18:259-270
- Horikoshi K (1998) Barophiles: deep-sea microorganisms adapted to an extreme environment. *Current Opinion in Microbiology* 1:291-295
- Horikoshi K (1971) Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms I. Alkaline protease produced by *Bacillus* no. 221. *Agric Biol Chem* 35:1407-1414
- Cheng CC (1998) Evolution of diverse antifreeze proteins. *Curr Opin Genet Dev* 8:715-720

- Christner BC, Mosley-Thompson E, Thompson LG, Zagorodnov V, Sandman K, Reeve JN (2000) Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. *Icarus* 144:479-485
- Imanaka T (2008) Adaptation strategy of thermophiles toward hyperthermophily and their molecular bases. *Bull Chem Soc Jpn* 81:171-182
- Imhoff JF, Trüper HG (1977) *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b. *Arch Microbiol* 114:115-121
- Inoue A, Horikoshi K (1989) A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* 338:264-266
- Jehlička J, Edwards HGM, Oren A (2013) Bacterioruberin and salinixanthin carotenoids of extremely halophilic Archea and Bacteria: A Raman spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 106:99-103
- Jehlička J, Oren A, Vitek P (2012) Use of Raman spectroscopy for identification of compatible solutes in halophilic bacteria. *Extremophiles* 16:507-514
- Johnson DB (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 27:307-317
- Johnson DB, Rang L (1993) Effects of acidophilic protozoa on populations of metal-mobilising bacteria during the leaching of pyritic coal. *J Gen Microbiol* 139:1417-1423
- Joux F, Jeffrey WH, Lebaron P, Mitchell DL (1999) Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation. *App Env Microbiol* 65:3820-3827
- Kato C, Inoue A, Horikoshi K (1996a) Isolating and characterizing deep-sea marine microorganisms. *Trends Biotech* 14:6-12
- Kato C, Li L, Nogi Y, Nakamura Y, Tamaoka J, Horikoshi K (1998) Extremely barophilic bacteria isolated from the Marianas Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Appl Environ Microbiol* 64:1510-1513
- Kato C, Masui N, Horikoshi K (1996b) Properties of obligately barophilic bacteria isolated from a sample of deep-sea sediment from the Izu-Bonin trench. *J Mar Biotechnol* 4:96-99
- Kobayashi T, Kimura G, Fujii T (2000) *Haloanaerobium fermentas* sp. nov., a strictly anaerobic, fermentative halophile isolated from fermented puffer fish ovaries. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1621-1627

- Larsen H (1962) The bacteria vol 4., Academic: New York 297-342
- Larson AD, Kallio RE (1954) Purification and properties of a bacterial urease. *J Bacteriol* 68:67-73
- Lawson PA, Deutch CE, Collins MD (1996) Phylogenetic characterization of a novel salt-tolerant *Bacillus* species: description of *Bacillus dipsosauri* sp. nov. *J Appl Bacteriol* 81:109-112
- Leduc LG, Ferroni GD (1994) The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus Ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Rev* 14:103-120
- Ma LJ, Rogers SO, Catrains CM, Starmer WT (1999) Detection and characterization of ancient fungi entrapped in glacial ice. *Mycologia* 92:286-295
- Ma LJ, Rogers SO, Catrains CM, Starmer WT (1999) Revival and characterization of fungi from ancient polar ice. *Mycologist* 13:70-73
- MacElroy RD (1974) Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems* 6:74-75
- Maryuama A, Honda D, Yamamoto H, Kitamura K, Higashihara T (2000) Phylogenetic analysis of psychrophili bacteria isolated from the Japan trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis*, sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:835-846
- Mesbah NM, Wiegel J (2008) Life at extreme limits. The anaerobic halophilic alkalithermophiles. *Ann NY Acad Sci* 1125:44-57
- Mesbah N, Cook G, Wiegel J (2009) The halophilic alkalithermophile *Natranaerobius thermophilus* adapts to multiple environmental extremes using a large repertoire of Na⁺ (K⁺)/H⁺ antiporters. *Mol Microbiol* 74:270-281
- Mindock CA, Petrova MA, Hollingsworth RI (2001) Re-evaluation of osmotic effects as a general adaptive strategy for bacteria in sub-freezing conditions. *Biophys Chem* 89:13-24
- Nagasaka S, Yoshimura E (2008) External iron regulates polyphosphate content in the acidophilic, thermophilic alga *Cyanidium caldarium*. *Biol Trace Elem Res* 125:286-289
- Ollivier B, Caumette P, Garcia J-L, Mah RA (1994) Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol Rev* 58:27-38
- Ollivier B, Fardeau ML, Cayol JL, Magot M, Patel BKC, Frensier G, Garcia J-L (1998) *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol* 48:821-828

- Oshima T, Moriya T (2008) A preliminary analysis of microbial and biochemical properties of high-temperature compost. *Ann NY Acad Sci* 1125:338-344
- Owusu Apenten RK (1999) *Biotechnological Applications of Cold-Adapted Organisms.*, Springer-Verlag: Heidelberg 35-48
- Pledger RJ, Crump BC, Baross JA (1994) A barophilic response by two hyperthermophilic, hydrothermal vent archaea: an upward shift in the optimal temperature and acceleration of growth rate at supra-optimal temperatures by elevated pressure. *FEMS Microbiol Ecol* 14:233-242
- Price PB, Sowers P (2004) Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance and survival. *PNAS* 101(13):4631-4636
- Prieur D, Erauso G, Jeanthon C (1995) Hyperthermophilic life at deep-sea hydrothermal vents. *Planet Space Sci* 43:115-122
- Rainey FA, Donnison AM, Janssen PH, Saul D, Rodrigo A, Bergquist PL, Daniel RM, Stackebrandt E, Morgan HW (1994) Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. *FEMS Microbiol Lett* 120:263-266
- Rivkina EN, Friedmann EI, McKay CP, Gilichinsky DA (2000) Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point. *Appl Environ Microbiol* 66:3230-3233
- Roberts MF (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 4(1):5
- Ruger HJ, Fritze D, Sproer C (2000) New psychrophilic and psychrotolerant *Bacillus marinus* strains from tropical and polar deep-sea sediments and emended description of the species. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1305-1313
- Russell NJ (1990) Cold adaptation of microorganisms. *Phil Trans R Soc Lond B* 326:595-611
- Russell NJ (1998) Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 61:1-21
- Sato T, Fukui T, Atomi H, Imanaka T (2003) Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Bacteriol* 185:210-220
- Sellek GA, Chaudhuri JB (1999) Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme Microb Technol* 25:471-482

- Setlow P (1994) Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *J Appl Bacteriol Symp Suppl* 76:49S-60S
- Staley JT, Gosink JJ (1999) Poles Apart: Biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annu Rev Microbiol* 53:189-215
- Stetter KO (1996) Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 18:149-158
- Summit M, Scott B, Nielson K, Mathur E, Baross J (1998) Pressure enhances thermal stability of DNA polymerase from three thermophilic organisms. *Extremophiles* 2:339-345
- Takai K, Nakamura K, Toki T, Tsunogai U, Miyazaki M, Hirayama H, Nakagawa S, Nunoura T, Horikoshi K (2008) Cell proliferation at 122 °C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *PNAS* 105:10949-10954
- Unemoto T (2000) Bioenergetics of marine bacteria-respiration-coupled Na⁺ pump. *Yakugaku Zasshi* 120:16-27
- Vítek P, Jehlička J, Edwards HGM, Hutchinson I, Ascaso C, Wierzchos J (2012) The miniaturized Raman system and detection of traces of life in halite from the Atacama desert: some considerations for the search for life signatures on Mars. *Astrobiology* 12:1095-1099
- Wagner ID, Wiegel J (2008) Diversity of thermophilic anaerobes. *Ann NY Acad Sci* 1125:1-43
- Wettergreen D, Cabrol N, Baskaran V, Calderón F, Heys S, Jonak D, Lüders A, Pane D, Smith T, Teza J, Tompkins P, Villa D, Williams C, Wagner M (2005) Second experiments in the robotic investigation of life in the Atacama desert of Chile. *Appl Environ Microbiol* 72:7902-7908
- Wiegel J (1990) Temperature spans for growth: a hypothesis and discussion. *FEMS Microbiol Rev* 75:155-170
- Wiegel J (1992) *Thermophilic bacteria.*, CRC: Boca Raton 105-184
- Wiegel J (1998) Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles. *Extremophiles* 2:257-267
- Wiegel J, Adams MWW (1998) *Thermophiles-the keys to molecular evolution and the origin of life?*, Taylor and Francis: London
- Wilson EZ, Brimble AM (2008) Molecules derived from the extremes of life. *Nat Prod Rep* 26:44-71

Yano Y, Nakayama A, Ishihara K, Saito H (1998) Adaptive changes in membrane lipids of barophilic bacteria in response to changes in growth pressure. *Appl Environ Microbiol* 64:479-485

Yayanos AA, Dietz AS, Van Boxtel R (1979) Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science* 205:808-810

Zhilina TN, Zavarzin GA, Detkova EN, Rainey FA (1996) *Natroniella acetigena* gen. nov. sp. nov., an extremely haloalkaliphilic, homoacetic bacterium: a new member of Haloanaerobiales. *Curr Microbiol* 32:320-326

ZoBell CE, Morita RY (1957) Barophilic bacteria in some deep-sea sediments. *J Bacteriol* 73:563-568

Internetové zdroje

URL 1 http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Microbes/Serratia.html

URL 2 http://envs.colorado.edu/gallery/image_full/346/

URL 3 http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Photobacterium_profundum_flagella.JPG

URL 4

http://www.flexe.psu.edu/forum_archive/ECOLOGY_UNIT/Forum3/DR_ERIK_CORDES_RESPONSES_WIN.cfm

URL 5 http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Pyrococcus_3.jpg

URL 6 <http://forcetoknow.com/science/scientists-discovered-life-dead-hydrothermal-vents.html>

URL 7 <http://genome.jgi-psf.org/dsr5/dsr5.home.html>

URL 8 <http://myweb.dal.ca/asimpso2/projects.htm>

URL 9 <http://botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/88>

URL 10 http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Soda_Lake_close-up.jpg

URL 11 <http://myhome.coloradomesa.edu/~kghoward/photos.html>

