

MARIANNA TURKIEWICZ

*Instytut Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej
Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź
e-mail: mtur@p.lodz.pl*

DROBNOUSTROJE PSYCHROFILNE I ICH BIOTECHNOLOGICZNY POTENCJAŁ

WSTĘP

Drobnoustroje są najbardziej wszechubylskimi organizmami, rozwijającymi się nie tylko w środowiskach umiarkowanych, ale kolonizującymi także ekstremalne biotopy, w które nasza planeta obfituje. Są wśród nich środowiska permanentnie zimne (wieczna zmarzlina, lód morski i polarny) i gorące (gejzery z wrzącą wodą, rdzenie skalne), silnie kwaśne (obszary bogate w siarkę i piryty), zasadowe (jeziora sodowe) lub zasolone (solanki), podlegające nieustannemu działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (głębiny oceanów), ekstremalnie suche (gorące i zimne pustynie), o wysokiej zawartości metali ciężkich i innych toksycznych substancji, skażone substancjami radioaktywnymi. Wiele z nich jeszcze kilkadziesiąt lat temu uważano za jałowe, bowiem wydawało się (punkt widzenia typowo antropocentryczny), że żadna forma życia nie jest w stanie w nich przetrwać. Dziś wiemy, że życie rozwija się w nich bujniej niż sądziliśmy, i że zasiedlające te środowiska mikroorganizmy ekstremofilne są często tak dalece zaadaptowane do egzystencji w obecności ekstremalnego czynnika, że środowiska umiarkowane okazują się dla nich zabójcze, jak choćby w przypadku acidofila *Picrophilus torridus*, rosnącego optymalnie w pH 0,7 (takim odczynem charakteryzuje się 1,2 M roztwór kwasu siarkowego), który w środowisku o pH 0 może się jeszcze rozwijać, natomiast w pH powyżej 4 ulega lizie (CIARAMELLA i współaut. 2005).

Przyjmując jako kryterium czynnik fizykochemiczny najlepiej charakteryzujący ekstremum danego biotopu, wśród drobnoustro-

jów ekstremofilnych wyróżnia się obecnie psychrofile, termofile (w tym hipertermofile), halofile, acidofile i alkalofile, piezofile (barofile), radiofile i metalofile, kserofile i w końcu endolity oraz hipolity, które kolonizują pęknięcia i denne części skał (Tabela 1). Ta lista prawdopodobnie nie jest jeszcze kompletna i będzie się poszerzać w miarę eksploracji kolejnych ekstremalnych środowisk. Należy też zaznaczyć, że drobnoustroje zasiedlające takie środowiska są często adaptowane do kilku skrajnych czynników środowiskowych, co uwzględnia się w ich klasyfikacji i nazewnictwie (piezopsychrofile, halopsychrofile, acidotermofile, piezotermofile, itd.).

Mikroorganizmy ekstremofilne mogą przeżyć i rozwijać się w często niezwykle surowych warunkach, ponieważ w trakcie ewolucji wykształciły liczne swoiste adaptacje. Należą do nich specyficzne mechanizmy akumulacji energii oraz utrzymania homeostazy środowiska wewnątrzkomórkowego i metabolizmu, stabilność strukturalnych i funkcjonalnych komponentów komórki w warunkach ekstremalnego biotopu, kinetyka reakcji biochemicznych dostosowana do warunków bytowania, odpowiedni skład lipidów błonowych, a także innych komponentów błon, zapewniający płynność i stabilność membran oraz właściwy transport jonów i biocząsteczek niezbędnych dla rozwoju komórki, produkcja ochronnych substancji – egzopolimerów, biosurfaktantów, ochronnych barwników, kompatybilnych solutów (biozgodne, dobrze rozpuszczalne i wiążące wodę niskocząsteczkowe substancje o funk-

Tabela 1. Klasyfikacja i przykłady drobnoustrojów ekstremofilnych.

Parametr środowiska	Grupa i warunki wzrostu		Występowanie	Mikroorganizm
Temperatura	Hipertermofile	>80°C	Gorące źródła, podwodne wyloty hydrotermalne, obszary wulkaniczne	<i>Pyrolobus fumarii</i> ($T_{max}=113^{\circ}C$) <i>Thermus aquaticus</i>
	Psychrofile	do 15°C	Gleby polarne i wysokogórskie, lód lodowców, zimne wody oceaniczne i lądowe	<i>Polaromonas vacuolata</i> ($T_{opt}=4^{\circ}C$)
pH	Acidofile	pH ≤ 3	Hałdy przy kopalniach węgla, gorące źródła	<i>Picrophilus torridus</i> (pH _{opt} =0,7)
	Alkalofile	pH ≥ 10	Jeziora sodowe, gleby przesycone węglanami	<i>Bacillus firmus</i> (pH _{opt} =10,5)
Zasolenie	Halofile	stężenie soli [2–5 M]	Słone jeziora i stawy, przybrzeżne solanki	<i>Halobacteriaceae</i> (stężenie soli do 5,2M)
Ciśnienie	Piezofile	ciśnienie [≥40 MPa]	Głębiny morskie	<i>Photobacterium</i> sp.
Radiacja	Radiofile	wysoki poziom radiacji	Radioaktywne ścieki, skażona gleba, reaktory nuklearne	<i>Deinococcus radiodurans</i>
Aktywność wody	Xerofile	a _w <0,8	Powierzchnie skał; Zasolone organiczne ciecze, np. oleje	<i>Xeromyces bisporus</i> (a _w <0,75)
Jony metali ciężkich	Metalofile	wysokie stężenia metali ciężkich, np. Cu, Hg, Pb	Miejsca skażone metalami i związkami organicznymi	<i>Rhodococcus</i> sp.
Skały	Endolity i hipolity		Pęknięcia i części denne skał	<i>Methanobacterium subterraneum</i>

cji ochronnej) i wielu innych, często unikatowych związków, interesujących z użytkowego punktu widzenia (FUJIWARA, 2002; JAVAUX, 2006; PAKCHUNG i współaut., 2006). Swojego rodzaju adaptacją jest też zdolność przejścia komórki w stan anabiozy, gdy warunki środowiskowe stają się tak skrajne, że niemożliwy jest nie tylko rozwój, czy utrzymanie podstawowego metabolizmu, ale nawet reperacja makromolekuł uszkodzonych przez działanie ekstremalnego czynnika, ta jednak właściwość jest charakterystyczna dla całego świata drobnoustrojów, nie tylko dla ekstremofili.

Badania ekstremofili mają jeszcze inny, bardziej uniwersalny wymiar, związany z astrobiologią, która stawia sobie za podstawowy cel znalezienie odpowiedzi na pytanie, jakie są graniczne parametry dla istnienia życia i czy w związku z tym jest ono możliwe

w warunkach pozaziemskich. Te graniczne warunki w odniesieniu do temperatury, zasolenia, kwasowości, dostępności wody (wysuszenia), radiacji, ciśnienia i czasu można rozpoznać i zdefiniować przede wszystkim na podstawie badań drobnoustrojów ekstremofilnych oraz pieczołowitej charakterystyki środowisk, w których bytują. Dopiero taka wiedza, wsparta wynikami badań nad przeżywalnością drobnoustrojów ziemskich w przestrzeni kosmicznej, pozwoli formułować hipotezy i przewidywania, dotyczące możliwości powstania i ewolucji życia poza Ziemią.

Przeważająca część ziemskiej biosfery, to psychrosfera o temperaturach poniżej 5°C. Obejmuje ona ponad 90% objętości oceanów i 70% powierzchni lądów (ŚWIECICKA i współaut. 1997, HAGGBLOM 2005). Około 20% powierzchni Ziemi jest stale zamrożoną kriosferą. Są to obszary wiecznej zmarzliny (per-

mafrost, pokrywający 85% powierzchni Alaski, 55% – Rosji i Kanady, 20% Chin i większą część Antarktyki)(GILICHINSKY i współaut. 2003), lądowe pokrywy lodowe (lód lodowców) i śnieżne oraz lód mórz polarnych (DEMING 2002). Środowiska te zamieszkują przede wszystkim drobnoustroje psychrofilne, można zatem uznać, że ta grupa dominuje nie tylko wśród ekstremofili, ale prawdopodobnie wśród całej ziemskiej mikroflo-

ry. Badania tych drobnoustrojów mają duże znaczenie nie tylko *per se*, ale i w kontekście faktu, że Europa (księżyc Jowisza) i Mars, najbliższe Ziemi ciała niebieskie, zawierające prawdopodobnie ciekłą wodę i głównie z tego powodu typowane na ewentualne siedliska prymitywnego życia pozaziemskiego, charakteryzują się niskimi temperaturami (MARION i współaut. 2003, WICKRAMASINGHE 2004).

ROZPOWSZECHNIENIE I OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA DROBNOUSTROJÓW PSYCHROFILNYCH

Pierwszy zimnolubny mikroorganizm – fluoryzującą bakterię, wyizolowaną z przechowywanej w chłodzie ryby i dobrze rosnącą w 0°C, opisał Forster ponad 100 lat temu. Kilka lat później pojawił się w literaturze termin psychrofile (gr. *psychros* – zimny), zaproponowany przez Schmidta-Nielsen dla określenia mikroorganizmów wykazujących zdolność wzrostu w tej właśnie temperaturze. Definicję psychrofili uściślił w 1963 r. Stokes, zaliczając do nich mikroorganizmy, które w 0°C w czasie do dwóch tygodni tworzą na podłożach stałych makroskopowo widoczne kolonie. Obecnie obowiązująca klasyfikacja mikroorganizmów zimnolubnych, zaproponowana przez MORITĘ (1975), wyróżnia wśród nich psychrofile obligatoryjne, których optymalna temperatura wzrostu (T_{opt}) nie przekracza 15°C, a maksymalna 20°C oraz psychrofile fakultatywne, czyli psychrotrofy, których (T_{opt}) mieści się w zakresie 20–25°C. Ostatnio BAKERMANS i NEALSON (2004) oraz CAVICCHIOLI (2006) zaproponowali zastąpienie terminu psychrofile (w odniesieniu do psychrofili obligatoryjnych) – terminem stenopsychrofile, a nazwy psychrotrofy – nazwą eurypsychrofile (przedrostki „steno-” i „eury-” zostały zapożyczone z terminów używanych w ekologii, w opisie węższej lub szerszej tolerancji na określoną determinantę środowiskową), precyzyjniej definiujących wymagania i tolerancję drobnoustrojów zimnolubnych względem zakresu temperatur otoczenia, w których mogą się te organizmy rozwijać. Cytowani autorzy zwrócili uwagę, że końcówka „-trofy” w obecnie stosowanej nazwie psychrofili fakultatywnych jest z definicji związana ze statusem żywieniowym organizmu i w żaden sposób nie łączy się z tolerowanymi przez taki ustrój temperaturami, czyli jest to termin wewnętrznie niespójny. Niezależnie jednak od szczegółowego kryterium przyję-

tego za podstawę klasyfikacji i nazewnictwa drobnoustrojów zimnolubnych, wszystkie one dobrze się rozmnażają w zakresie temperatur 0–10°C, a te, które zasiedlają śnieg, lód i wieczną zmarzlinę, powszechnie wykazują aktywność metaboliczną poniżej 0°C, nawet w –20°C i prawdopodobnie nie jest to jeszcze dolna granica minimalnej temperatury ich wzrostu (JUNGE i współaut. 2004, 2006).

Drobnoustroje psychrofilne występują w rozmaitych ekosystemach i to nie tylko w tych, które są zlokalizowane na obszarach o ustalonym zimnym klimacie, ale i takich, gdzie temperatura obniża się tylko lokalnie lub okresowo. Bytują w zimnych wodach słodkich i morskich, w osadach dennych mórz i oceanów, których grubość może dochodzić do 1 km, w polarnych i wysokogórskich glebach, w lodzie lodowców i w lodzie morskim, w podziemnych jaskiniach. Występują na dnie rowów oceanicznych na głębokości nawet 11 km, a także w troposferze i stratosferze, gdzie temperatury spadają do –40°C. Niedawne (2004 rok) eksperymenty wykazały w próbach pobranych przez specjalnie zaprojektowaną aparaturę, wyniesioną balonem na wysokość 41 km, obecność zdolnych do życia, choć tzw. niehodowlanych (ang. *viable but non-cultureable*) mikroorganizmów (WAINWRIGHT i współaut. 2004). Wypada tutaj podkreślić, że większość drobnoustrojów obecnych we wszystkich środowiskach ziemskich, zarówno wodnych, jak i lądowych, należy właśnie do tej drugiej grupy, głównie ze względu na niemożność odтворzenia w warunkach laboratoryjnych specyficznych parametrów, chemicznego składu i skomplikowanych zależności troficznych, jakie charakteryzują ich naturalne środowiska bytowania. Dotyczy to również, a może nawet przede wszystkim, biotopów ekstremalnych.

Ostatnio udowodniono, że drobnoustroje rozwijają się w chmurach (AMATO i współaut. 2006). Na wysokości ok. 1,5 km ich liczebność dochodzi do 10^3 ml^{-1} , a większość z nich jest zdolna do wzrostu w 5°C i w niższych temperaturach. Stwierdzono, że są wśród nich obecne bakterie Gram-dodatnie (*Bacillus*, *Streptomyces* i *Staphylococcus*) i Gram-ujemne (*Sphingomonas* i *Pseudomonas*) oraz drożdże i grzyby strzępkowe (*Cladospora*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*). W tych samych próbach wody z chmur, z której pochodziły te izolaty, były też obecne produkty ich metabolizmu: mleczan, octan, mrówczan i burtsztynian.

Do szczególnie surowych biotopów należy permafrost, który definiuje się jako zamrożoną przynajmniej w ciągu kilku lat warstwę gleby lub skał pod powierzchnią Ziemi. Przeważająca część permafrostu znajduje się w stanie zamrożenia nieporównywalnie dłużej (setki bądź tysiące lat), a najstarsze jego pokłady są prawdopodobnie zamrożone nawet od 2 do 3 milionów lat, co doskonale tłumaczy nazwę „wieczna zmarzlina”. Środowisko to charakteryzuje się nie tylko niską temperaturą (-10 do -12°C w permafroście północnej Syberii, a -22°C w permafroście antarktycznym), ale także niską aktywnością wody ($a_w = 0,9$), wynikającą z faktu, że 92–97% całkowitej jej ilości występuje w permafroście w postaci lodu, a jedynie 3–8% w stanie ciekłym, zależnie od temperatury i tekstury osadów (gleba, pokruszone skały), stanowiących matrycę wiecznej zmarzliny. Aktywność wody, dawniej nazywana aktywnością wodną, jest definiowana jako stosunek ciśnienia pary wodnej nad roztworem analizowanej substancji do ciśnienia pary wodnej nad czystą wodą w tej samej temperaturze. Aktywność czystej chemicznie wody jest równa jedności i spada poniżej tej wartości wraz ze wzrostem stężenia związków w niej rozpuszczonych. Innymi słowy, aktywność wody określa ilość wody „dostępnej” w danym środowisku dla żywego ustroju.

W permafroście bardzo niskie jest stężenie substancji odżywczych, natomiast wysokie są kumulujące się dawki promieniowania gamma (od 1 do 6 kGy), którego źródłem są minerały glabowe. Te właściwości sprawiły, że Friedmann (za GILICHINSKY i współaut. 2003) określił wieczną zmarzlinę jako „środowisko ekstremalne w stopniu absolutnym” (ang. absolute extreme environment). Badania mikroflory rdzeni i powierzchniowych warstw tundry syberyjskiej, prowadzone od

połowy lat 80. wspólnie przez naukowców rosyjskich i amerykańskich wykazały, że nawet najstarsze jego pokłady o wieku od kilkudziesięciu tysięcy do 2–3 milionów lat, zawierają zdolne do życia bakterie i grzyby, charakteryzujące się niezwykle odpornością na długotrwałe zamarzanie, natomiast w warstwach powierzchniowych, które okresowo mogą doświadczać dużych sezonowych wahań temperatur, z zakresu od -45 do $+25^\circ\text{C}$, występują żywe drobnoustroje w dobrej kondycji fizjologicznej, znacznie częściej należące do psychrotrofów niż do obligatoryjnych psychrofilii (VISHNIVETSKAYA i współaut. 2006). Wykazano też, że drobnoustroje syberyjskiego permafrostu akumulują znaczne ilości metanu w ciągu zimy, gdy tundra jest całkowicie zamarznięta, co dowodzi, że nawet w takich warunkach wykazują aktywność metaboliczną, choć zapewne ich zdolność do proliferacji jest wówczas ograniczona. Większość drobnoustrojów wiecznej zmarzliny żyje w tzw. kriopegach (ang. cryopegs), czyli w występujących w niej soczewkowatych tworach, zawierających niezamarzający wodny roztwór soli o stężeniu od 17 do 30%, którego temperatura *in situ* wynosi około -10°C (GILICHINSKY i współaut. 2005). Jeden z drobnoustrojów wyizolowanych z kriopiegów syberyjskiego permafrostu, *Psychrobacter cryohalolentis*, którego genom został w całości zsekwencjonowany i który należy do halopsychrofilii, jeszcze w -10°C wykazuje zdolność reprodukcji, chociaż czas generacji jest wówczas bardzo długi i wynosi 1500 godzin (BAKERMANS i współaut. 2006). Na marginesie trzeba podkreślić, że prawie przez dwa stulecia mikrobiolodzy skupiali się na badaniach drobnoustrojów mezofilnych, które namnażają się bardzo szybko (czas generacji w ich przypadku liczy się zwykle w minutach), natomiast mikroorganizmy zasiedlające szczególnie surowe biotopy rosną nieporównywalnie wolniej i nie jest wykluczone, że w przypadku niektórych z nich czasy generacji w warunkach *in situ* mogą być rzędu nawet dziesiątków czy setek lat.

Bakterię *Psychromonas ingrahamii* o jeszcze niższej od *Psychrobacter cryohalolentis* minimalnej temperaturze wzrostu, wynoszącej -15°C , wyizolowano z lodu morskiego (BREEZEE i współaut. 2004). Rośnie ona znacznie szybciej od szczepu syberyjskiego – czas generacji w $T_{\min}$ wynosi 240 godzin (TOMASHOW i TEDJE 2005). W lodzie morskim występują również bakterie z rodzaju *Colwellia*, którego przedstawiciele bytują ponadto

w osadach z głębiny morskich, jak np. *Colwellia psychroerythraea* 34H, pochodząca z morskich osadów arktycznych i przejawiająca aktywność metaboliczną w zakresie od +13°C do -20°C, co wykazały wyniki badań nad inkorporacją znakowanej [³H]-leucyny do białek tego drobnoustroju (JUNGE i współaut. 2004, 2006). Psychrofile występują również w lodzie lodowców. Dowody ich istnienia w tym środowisku są nie tylko bezpośrednie (izolacja i hodowla szczepów), ale i pośrednie. I tak na przykład, w rdzeniach lodowych pobranych na głębokościach od 2238 do 3053 m z lodowca grenlandzkiego występuje metan pochodzenia mikrobiologicznego, produkowany prawdopodobnie przez metanogeny należące do *Archea* (TUNG i współaut. 2005, 2006). Gaz ten został ostatnio stwierdzony w atmosferze Marsa (10 ppm), co skłoniło autorów cytowanych badań do rozważań o jego możliwym biotycznym pochodzeniu.

Mało zbadaną grupą drobnoustrojów zimnolubnych są psychrokserofile, do których należą drobnoustroje zimnych i jednocześnie bardzo suchych biotopów, takich jak pustynie i wysuszone skały, żyjące przy aktywności wody (a_w) niższej od wartości 0,8. Są wśród nich przedstawiciele grzybów strzępkowych, porostów, glonów oraz sinic, kolonizujących pęknięcia oraz spodnie części kamieni i skał, i dzięki temu zaliczanych także do hipo- i endolitów. Kserofilne sinice żyjące na kamieniach i skałach polarnych pustyni w Arktyce i Antarktyce mają niezwykle uzdolnienia, bowiem wykazują aktywność fotosyntetyczną przy niedostrzegalnym natężeniu padającego światła i to nawet w temperaturze -30°C, gdy zawartość ciekłej wody w środowisku jest minimalna (THOMAS 2005). Są wśród nich i takie gatunki, które mogą rosnąć na dennych częściach skał o dużej zawartości stosunkowo przezroczystego kwarcu dzięki nadzwyczajnie wydajnym systemom fotosyntetycznym, pozwalającym na efektywne wykorzystanie światła słonecznego, nawet wówczas, gdy dociera do nich w ilości zaledwie od 0,01 do 0,1% światła padającego na odsłoniętą powierzchnię.

Ostatnio postuluje się w literaturze wyodrębnienie kolejnej grupy zimnolubnych ekstremofili, które proponuje się nazwać eutektofilami z tej racji, że wymagają do wzrostu wody w fazie eutektycznej, czyli żyją na granicy przemiany fazowej woda-lód (DEMING 2002). Jak już wspomniano, najzimniejszą formą lodu na Ziemi jest lód morski o temperaturze -20°C. Ciekła woda zwilża w nim

nie tylko każdy kryształ, ale występuje także w matrycy lodowej między kryształami razem z substancjami odżywczymi, zamkniętymi w niej podczas wymrażania się lodu. Wykazano, że ten lód zawiera żyjące w fazie ciekłej bakterie, chociaż jeszcze do niedawna uważano, że eutektyczna powierzchnia międzyfazowa stanowi martwą strefę. Lód ziemski to tzw. lód I, lżejszy od wody, warto jednak zauważyć, że znanych jest 7 dalszych form lodu, które istnieją w wysokich ciśnieniach i które różnią się właściwościami od lodu I. Lód II i III mają większą gęstość od lodu I, a lód VI o temperaturze topnienia ok. 80°C jest nawet cięższy od wody. W naturalnych warunkach ziemskich ten ostatni rodzaj lodu nie występuje, można go jednak uzyskać w warunkach laboratoryjnych. Okazało się, że wprowadzone do takiego układu mikroorganizmy, np. bakteria *Escherichia coli*, lokują się w przestrzeni międzyfazowej i przejawiają niską, ale mierzalną aktywność metaboliczną. Te wyniki są niezwykle cenne dla astrobiologii, bowiem sugerują, że życie mogłoby się utrzymać w lodzie występującym na przykład na księżycu Jowisza, Europie, jak i w lodzie występującym prawdopodobnie w kometach i meteorytach. Należy odnotować, że termin eutektofile, proponowany dla drobnoustrojów wykorzystujących jako środowisko życia powierzchnię międzyfazową woda-lód, przyjmuje za kryterium klasyfikacji kombinację, nie do końca zresztą zdefiniowaną, temperatury, ciśnienia i stężenia solutów, koniecznych do powstania dwufazowego eutektycznego środowiska wodnego, podczas gdy w przypadku klasyfikacji większości grup ekstremofili (psychrofili, halofili, piezofili) podstawą klasyfikacji jest jedna, co najwyżej dwie (temperatura i ciśnienie, temperatura i stężenie soli, itp.) określone cechy fizykochemiczne danego środowiska.

Różnorodność drobnoustrojów zimnolubnych, podobnie jak różnorodność ich siedlisk, jest ogromna. Dotąd opisane Gram-dodatnie i Gram-ujemne psychrofilne bakterie należą do rodzajów: *Alcaligenes*, *Antarctobacter*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Brevibacterium*, *Colwellia*, *Cryobacterium*, *Gelidibacter*, *Glacieola*, *Hymenobacter*, *Kocuria*, *Methylosphaera*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Moritella* (rodzaj obejmujący prawdopodobnie wyłącznie gatunki psychrofilne), *Octandecabacter*, *Oleispira*, *Phormidium*, *Photobacterium*, *Planococcus*, *Polaribacter*, *Polaromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*,

Psychrobacter, *Psychroflexus*, *Psychromonas*, *Psychroserpens*, *Rhodoglobus*, *Sphingomonas*, *Shewanella* i *Vibrio* (SATYANARYANA i współaut. 2005).

Do gatunków zimnolubnych należą również liczne sinice. W morskich obszarach Arktyki powszechnie występują przedstawiciele rodzajów *Calothrix* i *Rivularia*, natomiast w słodkich arktycznych wodach – *Nostoc* (SATYANARYANA i współaut. 2005). W lądowej Antarktyce znaleziono dotąd aż 700 taksonów adaptowanych do zimna sinic.

Drobnoustroje psychrofilne nie ograniczają się do prokariotów, występują także wśród drożdży, grzybów strzępkowych i jednokomórkowych glonów. W polarnym lodzie, śniegu i glebach najczęściej bytują psychrofilne drożdże z rodzajów *Torulopsis*, *Candida*, *Mrakia* i *Leucosporidium*. Do tego ostatniego rodzaju należy m.in. endemiczny dla Antarktyki gatunek *L. antarcticum*. Psychrofilne pleśnie występują najczęściej wśród *Penicillium* i *Cladosporium*, a także wśród patogen-

nych pleśni śniegowych (ŚWIECICKA i współaut. 1997, TURKIEWICZ i GROMEK 2000).

Psychrofilne archeony są poznane znacznie słabiej i skupiają głównie przedstawicieli *Methanogenium*, *Methanococcoides*, *Methanosarcinia* i *Halorubrum*; ten ostatni rodzaj obejmuje psychrohalofile, np. *Halorubrum lacusprofundi*, pochodzący z wysoce zasolonego (3,6–4,8 M) jeziora antarktycznego Deep Lake. Pierwszym opisanym psychrofilnym archeonem był *Crenarchaeum symbiosum*, symbiont gąbki *Axinella mexicana*, wykazujący maksymalny wzrost w 10°C. Nieco później opisano *Methanococcoides burtonii*, wyizolowany z wiecznie zimnych dennych warstw wody (tzw. hypolimnion) jeziora Ace w Antarktyce, którego genom został w całości zsekwencjonowany (CAVICCHIOLI 2006). Obecnie szacuje się, że nawet 30% morskiego pikoplanktonu zimnych wód szelfowych stanowią archeony i że większość z nich należy do *Crenarchaeota*.

ADAPTACJE DROBNOUSTROJÓW PSYCHROFILNYCH DO NISKICH TEMPERATUR

Temperatura jest jednym z nielicznych czynników środowiskowych, których działania drobnoustroje nie są w stanie skompensować, tak jak to czynią organizmy homeotermiczne, dysponujące mechanizmami, pozwalającymi na utrzymanie ciepłoty ustroju różniącej się od temperatury otoczenia. Mikroorganizmy ekstremofilne, chcąc przeżyć i rozwijać się albo w bardzo wysokiej (nawet grubo powyżej 100°C, jak to ma miejsce w przypadku piezohipertermofili, żyjących w głębinach morskich u wylotów kanałów hydrotermalnych), albo w bardzo niskiej (np. w -20°C) temperaturze, musiały wykształcić specjalne adaptacje na każdym poziomie organizacji komórki.

Jedną z najistotniejszych, o ile nie najważniejszą adaptacją jest u psychrofilów taka modyfikacja składu kwasów tłuszczowych w lipidach błonowych, która zapewnia płynność membran komórkowych dzięki obniżeniu temperatury tranzycji (przejścia) dwuwarstwy fosfolipidowej z fazy ciekłokrystalicznej do fazy stałego żelu (NICHOLS i współaut. 1999, KALINOWSKA i współaut. 2005). Tylko pierwszy stan umożliwia normalną metaboliczną aktywność komórki, zależną od prawidłowego przebiegu biernego i czynnego transportu, efektywnego pobierania składników odżywczych i odbierania bodźców z oto-

czenia oraz niezakłóconego transportu elektronów w procesach oddychania. Strategie są tu zróżnicowane. Najczęściej mikroorganizm psychrofilny zwiększa udział nienasyconych (mono- i wielonienasyconych) reszt kwasów tłuszczowych w lipidach błonowych. Tak się dzieje w przypadku bakterii piezopsychrofilnych, bytujących w głębinach morskich i należących na przykład do rodzajów *Shewanella* i *Colwellia*, ale już w lipidach błonowych morskich i glebowych bakterii antarktycznych, bytujących również w permanentnie zimnym środowisku, znacznie bardziej od liczby nienasyconych reszt acylowych wzrasta liczba reszt o rozgałęzionym (głównie izomery *anteizo-*, w mniejszej liczbie izomery *izo-*) i często też o krótszym łańcuchu węglowym. Dzięki ich obecności dwuwarstwa lipidowa jest w membranie luźniej upakowana i bardziej giętka, co w niskiej temperaturze ułatwia procesy transportu. Duże znaczenie w dostosowaniu składu lipidów błonowych do poziomu temperatury otoczenia ma odpowiednia regulacja aktywności enzymów, uczestniczących w biosyntezie nienasyconych (desaturazy) i rozgałęzionych kwasów tłuszczowych (syntetazy kwasów tłuszczowych specyficzne względem ketokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym, analogów izoleucyny, leucyny i waliny).

Większość reakcji metabolicznych, decydujących o przeżyciu i rozwoju każdego ustroju katalizują enzymy, zatem u psychrofili białka te muszą być kinetycznie (niska optymalna temperatura i znaczna aktywność w temperaturach z zakresu doświadczanego w warunkach bytowania), termodynamicznie (niższa swobodna energia i entalpia aktywacji w porównaniu z homologicznymi enzymami drobnoustrojów mezofilnych) i przede wszystkim strukturalnie dostosowane do działania w niskiej temperaturze (GEORLETTE i współaut. 2004). Badania ostatniej dekady wykazały niezbicie, że u podłoża tego dostosowania leży większa niż homologicznych enzymów drobnoustrojów mezofilnych giętkość ich molekuł (TURKIEWICZ 2003, HOYOUNG i współaut. 2004), dzięki której mogą efektywnie działać w lepkiem (lepkość wody np. w 0°C jest siedmiokrotnie wyższa niż w 20°C) i ubogim energetycznie środowisku, w którym ruchy termiczne cząsteczek są ograniczone. Do tej pory rozwiązano metodami krystalograficznymi struktury zaledwie dwunastu enzymów drobnoustrojów psychrofilnych (Tabela 2) i kilku enzymów, pochodzących z ryb żyjących w zimnych akwenach. Tak mała liczba ustalonych struktur wynika przede wszystkim z dużych trudności, na jakie napotyka krystalizacja

tych giętkich białek. Pewnym rozwiązaniem jest przewidywanie konformacji z użyciem metod bioinformatycznych, o ile jest znana sekwencja aminokwasów w danym białku (można ją określić na podstawie sekwencji genu) i o ile znajdzie się w bazach danych (Protein Data Bank, PDB) homologiczny enzym o znanej strukturze przestrzennej. Tym sposobem zmodelowano *in silico* struktury wielu adaptowanych do niskich temperatur enzymów. Z rezultatów analiz rentgenograficznych oraz bioinformatycznych wynika, że u obydwu rodzajów (psychrofilnych i mezofilnych) enzymów ogólna architektura cząsteczki jest bardzo podobna, zbliżona jest konformacja domen i struktur naddrugorzędowych, a także kieszeni katalitycznej (takie same reszty aminokwasów wiążących i katalitycznych), dzięki czemu molekularny mechanizm katalizy z udziałem homologicznych enzymów należących do każdej z grup jest generalnie identyczny, natomiast obserwuje się pewne zmiany w strukturze drugorzędowej, np. w ilości i długości pętli. U enzymów psychrofilnych są często obecne dodatkowe lub dłuższe polarne pętle powierzchniowe, które dzięki oddziaływaniom z rozpuszczalnikiem zwiększają elastyczność molekuly. Podwyższa ją także mniejsza liczba oddziaływań

Tabela 2. Enzymy drobnoustrojów psychrofilnych o znanych strukturach krystalicznych.

Enzym	Drobnoustrój	Literatura
α -amylaza	<i>Alteromonas haloplanktis</i>	AGHAJARI i współaut. 1998
syntaza cytrynianowa	<i>Arthrobacter</i> ps. DS2-3R	PONDER i współaut. 1998
izomeraza triozofosforanowa	<i>Vibrio marinus</i>	ALVAREZ i współaut. 1998
dehydrogenaza jabłczanowa	<i>Aquaspirillum arcticum</i>	KIM i współaut. 1999
metaloproteinaza		
wapniowo-cynkowa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VILLERET i współaut. 1997
subtylizyno-podobna proteinaza	<i>Vibrio</i> sp.	ARNORSDOTTIR i współaut. 2005
proteinaza serynowa		
z rodziny proteinazy K	<i>Serratia</i> sp.	HELLAND i współaut. 2006
fosfataza tyrozynowa	<i>Schewanella</i> sp.	TSURUTA i współaut. 2005
dehydrogenaza alkoholowa	<i>Moraxella</i> ssp. TAE123	PAPANIKOLAN i współaut. 2005
celulaza	<i>Pseudomonas haloplanktis</i>	VIOLOT i współaut. 2005
ksylanaza	<i>Pseudomonas haloplanktis</i>	VAN PETEGEM i współaut. 2003
kinaza fosfoglicerynianowa	<i>Pseudomonas</i> sp. TACII18	MANDELMAN i współaut. 2001

wewnątrz cząsteczkowych (wodorowych, jonowych, hydrofobowych, van der Wälsa), stabilizujących zwinięcie łańcucha polipeptydowego. Ceną za zwiększoną giętkość strukturalną (zwłaszcza w obszarze aktywnego centrum) jest obniżona stabilność termiczna enzymów adaptowanych do zimna, natomiast dzięki elastyczności ich wydajność katalityczna jest w warunkach bytowania dostatecznie wysoka dla harmonijnego przebiegu przemian metabolicznych.

Niektóre najlepiej zaadaptowane do zimna psychrofile wytwarzają unikatowe białka, nieobecne u innych grup mikroorganizmów, tzw. białka nukleacyjne lodu (ang. ice nucleating proteins, INP) (KAWAHARA 2002). Są to małe białka zlokalizowane w zewnętrznej membranie zimnolubnych bakterii, które przy spadku temperatury działają jako zarodki kryształów lodu, wiążąc na swej powierzchni cząsteczki wody. Powstające w ten sposób kryształy, obudowujące rdzeniowe cząsteczki INP, są zbyt duże, aby mogły wnikać do wnętrza komórki i spowodować jej destrukcję.

Tworzeniu się wewnątrzkomórkowego lodu zapobiega także kolejna klasa białek, syntetyzowana w niskich temperaturach, zwana białkami termicznej histerezy (ang. thermal hysteresis proteins, THP) lub białkami przeciwarzamrzeniowymi (ang. anti freeze proteins, AFP) (TURKIEWICZ 1999). Są to białka obniżające punkt krzepnięcia wody, ale nie jej punkt topnienia, czyli powodujące termiczną histerezę. Dzięki szczególnym właściwościom molekularnym (amfipatyczność cząsteczek – jedna strona powierzchni molekuli ma charakter hydrofobowy, druga – hydrofilowy) białka te adsorbują się na zarodkach kryształów lodu, albo powstających w komórce przy spadku temperatury, albo też przenikających do jej wnętrza ze środowiska, nie dopuszczając do dalszego ich wzrostu, co chroni komórkę przed uszkodzeniami. AFP występują powszechnie u ryb zimnych akwariów i u bezkręgowców, natomiast znacznie rzadziej u drobnoustrojów. Zalicza się je do substancji krioprotekcyjnych, podobnie jak kompatybilne soluty, zwane inaczej ekstre-

molitami. Do tych ostatnich należą m.in. monosacharydy (trehaloza), pochodne aminokwasów (ektolina, cholina, trimetylowe pochodne glicyny i proliny, czyli betainy tych aminokwasów), aminy (karnityna). Ekstremolity chronią makrocząsteczki i komórki nie tylko przed zamarznięciem, ale i przed innymi stresami (wysuszenie, szok osmotyczny, denaturacja termiczna, promieniowanie UV).

Kolejną grupą białek, które u mikroorganizmów psychrofilnych, zwłaszcza bytujących w środowiskach o ustalonej niskiej temperaturze, są obecne w sposób ciągły, a u innych, w tym także u mezofili, są wytwarzane w odpowiedzi na stres zimna, są białka szoku zimna Csp (ang. cold shock proteins). Csp są niezbędne do uruchomienia i prawidłowego przebiegu transkrypcji i translacji w warunkach niskiej temperatury (KAUFMAN i TURKIEWICZ 2004). Przede wszystkim umożliwiają tworzenie się funkcjonalnych rybosomów, czyli takich, w których może zachodzić biosynteza łańcucha polipeptydowego, ponadto likwidują nietypowe drugorzędowe struktury w mRNA, powstające podczas szoku zimna. Regulacja biosyntezy Csp to złożony i wieloczynnikowy proces, kontrolowany na poziomie zarówno transkrypcji, jak i translacji. Główna różnica pomiędzy syntezą Csp u psychrofili i mezofili polega na tym, że u tych ostatnich w początkowym etapie po szoku zimna, odwrotnie niż u psychrofili, ekspresja genów Csp jest opóźniona w czasie na skutek inhibicyjnego efektu, wywieranego przez niską temperaturę, natomiast u drobnoustrojów zimnolubnych białka te powstają bardzo szybko, a ich liczba po szoku jest zwykle wyższa niż u mezofili i proporcjonalna do natężenia zimna. W mikroorganizmach bytujących w środowiskach o ustalonej niskiej temperaturze, synteza Csp zachodzi w sposób ciągły. Podobną do Csp grupą białek, umożliwiających drobnoustrojom psychrofilnym niezakłócony rozwój, są białka aklimatyzacji do zimna – Cap (ang. cold-acclimation proteins).

DROBNOUSTROJE PSYCHROFILNE A BIOTECHNOLOGIA

Siłą napędową szybko się rozwijających badań drobnoustrojów zimnolubnych, podobnie jak i innych grup ekstremofili, są nie tylko wyzwania, jakie stawia astrobiologia, ale

przede wszystkim świadomość, że mikroorganizmy te dysponują znacznym, choć trudnym jeszcze do pełnego oszacowania potencjałem biotechnologicznym, którego wykorzystanie

może przyczynić się do rozwoju wielu dziedzin gospodarki, medycyny i ochrony środowiska. Warto tu wspomnieć, że przed niespełna dwoma laty Unia Europejska uznała za jedną z priorytetowych dziedzin biotechnologię przemysłową, która stawia sobie za nadrzędny cel wprowadzenie do przemysłu bioprosesów na miejsce tradycyjnych technologii chemicznych, generujących toksyczne dla środowiska odpady.

Psychrofile, podobnie jak inne grupy drobnoustrojów ekstremofilnych, wykazują liczne unikatowe właściwości i mogą być eksploatowane przez człowieka na dwa sposoby: jako indywidualne kultury lub konsorcja mikrobiologiczne, przydatne w wielu procesach, na przykład w uzdatnianiu skażonych środowisk lub w likwidacji toksycznych odpadów w zimnym i umiarkowanym klimacie, albo też jako producenci różnorodnych użytecznych biomolekuł (METHÉ i współaut. 2004) (Tabela 3).

Do najcenniejszych produktów mikrobiologicznych należą niewątpliwie enzymy,

które można traktować jako swoiste molekularne narzędzia, służące do wytwarzania szerokiego asortymentu rozmaitych cennych substancji. Najogólniej ujmując, psychrofilne enzymy dzięki wrodzonej giętkości strukturalnej nadają się szczególnie do stereoselektywnych biotransformacji (SELLEK i CHAUDHURI 1999) zachodzących w środowisku rozpuszczalników organicznych, w którym mniej elastyczne cząsteczki katalitycznych białek, pochodzących np. z mezofilnych czy termofilnych szczepów, mogą ulec tak znacznemu usztywnieniu, że stają się niezdolne do związania substratu i do jego przemiany w produkt. Z tego względu poszukuje się producentów stereoselektywnych enzymów (lipaz, esteraz, liaz, metylaz, oksydoreduktaz, racemaz, aminotransferaz) przede wszystkim wśród drobnoustrojów bytujących w permanentnie zimnych, a jednocześnie suchych środowiskach, np. w glebie antarktycznej. Są one adaptowane nie tylko do zimna, ale także do działania w warunkach niskiej aktywności wody, czyli są potencjalnie przydatne

Tabela 3. Możliwości wykorzystania drobnoustrojów psychrofilnych, ich enzymów i innych substancji.

Drobnoustrój/enzym/ inna substancja	Wykorzystanie
Psychrofilne kultury:	
Metanogeny	Produkcja metanu
Drobnoustroje utylizujące węglowodory alifatyczne i aromatyczne	Likwidacja skażeń ropą naftową w wodach morskich
Metalofile	Usuwanie skażeń metalami ciężkimi
Psychrofile żyjące w lodzie	Źródło krioprotektantów
Enzymy adaptowane do zimna:	
Alkaliczna fosfataza	Biologia molekularna
Proteinazy, lipazy, celulazy, amylazy	Detergenty
Lipazy i proteinazy	Produkcja serów
Proteinazy	Składniki płynów do higieny soczewek kontaktowych
Proteinazy	Zmięczanie mięsa wołowego
β -galaktozydaza	Usuwanie laktozy z przetworów mlecznych i z serwatki, synteza prebiotycznych oligosacharydów
Różne enzymy	Poprawa smaku żywności
Oksydoreduktazy	Biotransformacje, wspomaganie bioremediacji, biosensory zanieczyszczeń środowiska
Inne substancje:	
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe ω -3	Nutraceutyki, suplementy diety
Białka nukleacyjne lodu	Sztuczny śnieg, produkcja lodów i mrożonej żywności

do biokatalizy niewodnej. Tego rodzaju kataliza umożliwia jednoetapową syntezę wielu cennych z użytkowego punktu widzenia substancji, na przykład tzw. bloków budulcowych, używanych w syntezie leków, których otrzymywanie metodami chemicznymi jest wielostopniowe i o wiele bardziej skomplikowane. I tak na przykład, lipazę psychrofilnego szczepu *Pseudomonas* sp. P38 z powodzeniem wykorzystano do syntezy kaprylanu butylu (związek zapachowy) w n-heptanie, a psychrofilna lipaza drożdży *Candida antarctica*, której produkcja została już skomercjalizowana, służy jako niezwykle efektywny i stereoselektywny katalizator różnorodnych syntez w środowisku rozpuszczalników organicznych. Prowadzi się także badania nad możliwością zastosowania adaptowanych do zimna proteinaz w syntezie peptydów, która podobnie jak synteza lotnych związków zapachowych i modyfikacje antybiotyków, zachodzi z wyższą wydajnością w niskich temperaturach.

Wykorzystanie enzymów adaptowanych do zimna niesie też wiele innych korzyści. Przede wszystkim maleją koszty procesu dzięki obniżeniu zużycia energii (typowym przykładem może być odwłaszanie skór zwierzęcych w garbarstwie przy użyciu psychrofilnej proteinazy w temperaturze wody wodociągowej, zamiast w 37°C), znacznie się może poprawić jakość końcowego produktu, o ile w podwyższonej temperaturze ulega on niekorzystnym modyfikacjom, ponadto termolabilny enzym można łatwo i selektywnie zainaktywować, co jest istotne w przypadku stosowania w danym procesie enzymów o różnych profilach temperaturowych. Warto też odnotować, że aplikacja zimnych enzymów w przetwórstwie żywności w dużym stopniu eliminuje ryzyko zakażeń mezofilną mikroflorą.

Odbiorcą psychrofilnych enzymów jest obecnie przede wszystkim przemysł detergentów, przeznaczonych do prania w 30°C i w niższych temperaturach (GERDAY i współaut. 2000). Jak ważne znaczenie ma dostępność tego rodzaju produktów uświadamiają wyniki szacunkowych wyliczeń oszczędności w zużyciu energii, które można by osiągnąć, gdyby we wszystkich gospodarstwach domowych Europy obniżyć temperaturę prania do 30°C. Oszczędności te byłyby tak duże, że spowodowałyby spadek emisji dwutlenku węgla do atmosfery o 12 mln ton rocznie. W Europie producentem specjalnego preparatu enzymatycznego, przeznaczonego do pra-

nia w obniżonych temperaturach jest firma NovoNordisk. Tego rodzaju enzymy, przede wszystkim proteinazy (plamy białkowe, np. z krwi, najtrudniej usunąć z zabrudzonej odzieży) są również wytwarzane w Stanach Zjednoczonych i w Japonii, która produkuje nawet detergenty, przeznaczone do prania w temperaturze wody wodociągowej (8–10°C). W USA produkuje się adaptowaną do niskich temperatur alkaliczną proteinazę antarktycznego szczepu *Bacillus* sp. TA41, która dodatkowo została ulepszona na drodze tzw. molekularnej ewolucji *in vitro*, dzięki czemu zwiększyła się stabilność termiczna tego białka. Prace te finansowała znana amerykańska firma Procter&Gamble, największy światowy potentat w produkcji detergentów piorących.

Psychrozymy są również przydatne dla przemysłu spożywczego (GOMES i STEINER 2004). Dla przemysłu mleczarskiego cenne byłyby np. psychrofilne β -galaktozydazy, nadające się do usuwania laktozy z mleka w warunkach chłodniczego przechowywania. Mleko bezlaktozowe jest przeznaczone dla osób z nietolerancją tego disacharydu (jedna trzecia światowej populacji osób dorosłych), która powoduje u nich uciążliwe dolegliwości gastryczno-jelitowe (biegunki, wzdęcia). U kilku gatunków bakterii antarktycznych z rodzaju *Pseudoalteromonas* znaleziono już odpowiednie do tego rodzaju zastosowania β -galaktozydazy. Poszukuje się ponadto psychrofilnych pektynaz, przeznaczonych dla przetwórstwa owoców (redukcja lepkości miazgi owocowej przed filtracją, klarowanie soków w niskich temperaturach), a także proteainz, które można by zastosować w tenderyzacji (zmiękczeniu) i poprawie smaku mrożonego mięsa. Przemysł paszowy jest zainteresowany psychrofilnymi celulazami, fitazami oraz proteinazami, których zastosowanie poprawiłoby walory żywieniowe i przyswajalność pasz. Zaawansowane są prace nad wykorzystaniem adaptowanych do zimna oksydoreduktaz w biosensorach przeznaczonych do monitorowania skażeń środowiska w chłodnym i umiarkowanym klimacie.

Do tej pory w przemyśle są stosowane przede wszystkim enzymy drobnoustrojów mezofilnych, produkowane na drodze biosyntezy, czyli hodowli tych mikroorganizmów, technicznie łatwej do przeprowadzenia z racji ich przystosowania do wzrostu w łagodnych warunkach. Także większość dotąd skomercjalizowanych enzymów ekstremofili jest wytwarzana przez transformowane ich gena-

mi drobnoustroje mezofilne, jednak nie w każdym przypadku udaje się uzyskać wydajną ekspresję takich genów, bądź też otrzymać aktywne białko w nowym, mezofilnym gospodarzu. Wynikać to może albo z niezbędności ekstremalnego czynnika (podwyższonego ciśnienia, obniżonej temperatury, itp.) dla prawidłowej i wydajnej ekspresji genu ekstremofilnego białka, albo też z niemożności prawidłowego sfałdowania już zsyntetyzowanego łańcucha polipetydowego w mezofilnym gospodarzu, który może nie zawierać specjalnych, najczęściej niezidentyfikowanych substancji, wspomagających ten proces w naturalnym producencie danego enzymu. Z tego względu bardzo intensywnie pracuje się nad nowymi systemami heterologicznej ekspresji genów, opartymi na drobnoustrojach psychrofilnych. Pierwszy taki system, wykorzystujący bakterię *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (pierwszy drobnoustrój psychrofilny, którego genom został w całości zsekwencjonowany), już opracowano, nie jest on jednak jeszcze dostępny jako komercyjny zestaw (prawdopodobnie trwa procedura patentowania).

Globalny rynek enzymów, którego wartość ocenia się obecnie na ok. 5 mld \$ (war-

tość rynku chemikaliów jest ok. 35-krotnie wyższa, w 2004 r. wynosiła 174 mld \$), należy do najlepiej rozwijających się i rokrocznie wzrasta o ok. 10%. Wydaje się, że duża część tego rynku powinna w niedalekiej przyszłości przypaść enzymom adaptowanym do niskich temperatur.

Psychrofile są nie tylko producentami przydatnych dla gospodarki enzymów, ale, podobnie jak inne ekstremofile, także innych biopolimerów, przede wszystkim egzopolisacharydów (SCHIRALDI i DE ROSA 2002). Substancje te chronią komórki przed wysuszeniem, fagocytozą, gwałtownymi zmianami temperatur i innymi niekorzystnymi czynnikami fizycznymi oraz chemicznymi, mają też właściwości glebotwórcze i uczestniczą w tworzeniu biofilmów. Charakteryzują się wysoką lepkością, często pseudoplastycznością i zwykle są lepszymi emulsyfikatorami niż surfaktanty o niskiej masie. Jak dotąd polisacharydy psychrofilii są słabo zbadane, choć ostatnio wzrasta liczba prac poświęconych tym substancjom, które odgrywają prawdopodobnie istotną rolę w przeżyciu zwłaszcza tych psychrofilii, które bytują w skrajnie nieprzyjaznych środowiskach, takich jak permafrost czy lód morski.

UWAGI KOŃCOWE

Zintensyfikowanie badań ekstremofilii, w tym także drobnoustrojów zamieszkujących najzimniejsze biotopy, sprawiło, że coraz lepiej rozumiemy skomplikowane mechanizmy, dzięki którym te drobnoustroje potrafią przeżyć w surowym środowisku. Co więcej, poznawanie molekularnych podstaw kolejnych adaptacji jest związane z identyfikacją unikatowych niejednokrotnie biocząsteczek, interesujących z użytkowego punktu widzenia, których wykorzystanie w gospodarce, medycynie i w ochronie środowiska może podnieść jakość naszego życia. Jednocześnie rozwój technik molekularnych i bioinformatycznych rokuje, że badania bioróżnorodności i adaptacji drobnoustrojów ekstremofilnych wejdą w nową, przyspieszoną fazę.

Pewien przedsmak rezultatów, jakie możemy osiągnąć, dają wyniki analizy genomu i zidentyfikowanego na jego podstawie potencjalnego proteomu (proteom to zestaw białek występujących w organizmie, tkance, komórce lub przedziale komórkowym, przedmiot badań proteomiki). W przeciwieństwie do genomów proteomy nieustannie zmie-

niają się w odpowiedzi na różne czynniki) wspomnianej już piezopsychrofilnej bakterii *Colwellia psychroerythraea* 34H, której DNA został całkowicie zsekwencjonowany, opublikowane przed rokiem w prestiżowym czasopiśmie amerykańskim Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) (METHÉ i współaut. 2005) Analiza ta umożliwiła nie tylko identyfikację najistotniejszych dla przeżycia genów i białek enzymatycznych, ale dostarczyła także cennych informacji o specyficznych substancjach, produkowanych przez *C. psychroerythraea* i ich roli w adaptacji tej bakterii do niskich temperatur, wysokiego ciśnienia i niskiego stężenia substancji odżywczych w środowisku. Należą do nich między innymi:

- polihydroksyalkanoaty typu poliestrów, gromadzone wewnątrzkomórkowo jako rezerwa węgla i energii na czas głodu;
- egzopolisacharydy, ułatwiające pobieranie przez komórkę produktów degradacji substancji pokarmowych, zachodzącej z udziałem pozakomórkowych enzymów tej bakterii i jednocześnie utrzymujące je w bezpośred-

nim otoczeniu komórki, przez co zmniejszają się wydatki energetyczne na ich produkcję; egzopolisacharydom jest też przypisywana rola krioprotekcyjna;

– poliamidy – białkopodobne polimery, przypominające cyjanoficynę, gromadzone wewnątrzkomórkowo jako rezerwa azotu;

– kompatybilne soluty, takie jak betaina, karbonylina i cholina, chroniące komórkę przed utratą wody w zimnym, a nawet zamarzającym środowisku (bakterie rodzaju *Colwellia* bytują też polarnym lodzie)

– unikatowe, nie opisane dotąd białka szoku zimna, Csp, których szczegółowa funkcja nie jest jeszcze znana.

Przynajmniej dwie ze zidentyfikowanych substancji są interesujące dla przemysłu – polihydroksyestry charakteryzujące się zwykle właściwościami termoplastycznymi i elastomerycznymi, a także poliamidy, jako

ewentualne biodegradowalne substytuty poliakrylanów.

Można przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości, w miarę poznawania kompletnych genomów coraz to nowych drobnoustrojów ekstremofilnych i wzrostu zasobów banków sekwencji i struktur białkowych, a także rozwoju metabolomiki (celem metabolomiki jest identyfikacja funkcji genu na podstawie metabolomu, przez który rozumie się ogół reakcji i szlaków metabolicznych danego ustroju; jeśli taka funkcja jest ustalona, obecność danego genu w DNA oznacza, że dany ustrój może zawierać produkt jego ekspresji), tego rodzaju analizy staną się normą, a nasza wiedza o granicach, w których może rozwijać się życie stanie się bardziej kompletna i bardziej przydatna dla poszukiwań jego śladów w Kosmosie.

PSYCHROPHILIC MICROORGANISMS AND THEIR BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL

Summary

Research concerning extremophilic microorganisms have appreciably extended our knowledge about the life limits. Psychrophiles, which are cold-adapted microorganisms (some thrive even at -20°C) rank the first in abundance to the other groups of extremophiles. They populate the harshest environments on Earth, like permafrost, marine and glaciers ice, the highest parts of mountains, clouds and stratosphere. Psychrophiles have developed numerous molecular adaptations, without which they would not be able to persist in cold biotops. They produce protective exopolymers and low molecular weight cryoprotectants, polyunsaturated and branched fatty acids, which provide the appropriate fluidity of cell

membranes – essential for the communication with the environment, and different sorts of proteins, like ice nucleating proteins, cold shock and cold acclimation proteins and enzymes, characterized by molecular and kinetic adaptations to catalysis of metabolic reactions at low temperatures. All these biomolecules are extremely interesting for biotechnologists because they can either widen the assortment of products applicable to industry and medicine or be valuable molecular tools to be used in biotechnology for the manufacture of these products. The properties of psychrophilic microorganisms imply that development of life is possible also in some extraterrestrial environments.

LITERATURA

- AGHAJARI N., FELLER G., GERDAY CH., HASER R., 1998. *Crystal structures of the psychrophilic α -amylase from Alteromonas haloplanktis in its native form and complexed with an inhibitor*. Protein Sci. 7, 564–572.
- ALVAREZ M., ZELEN J. P., MAINFROID V., RENTIER-DE-LURE F., MARTIAL J. A., WYNS L., WIERANGA R. K., MAES D., 1998. *Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium Vibrio marinus. Kinetic and structural properties*. J. Biol. Chem. 273, 2199–2206.
- AMATO P., PARAZOLS M., SANCELME M., LAJ P., MAILHOT G., DELORT A. M., 2006. *Microbial populations in clouds: implication on cloud chemistry*. Int. Conference on Alpine and Polar Microbiology, Innsbruck- Austria, 27–31 March. Book of abstracts, L15, 23.
- ARNORSDOTTIR J., KRISTJANSSON M. M., FICNER R., 2005. *Crystal structure of a subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic Vibrio species reveal structural aspects of cold adaptation*. FEBS J. 272, 832–845.
- BAKERMANS C., AYALA-DEL-RIO H. L., PONDER M. A., VISHNIVETSKAYA T., GILCHINSKY D., THOMASHOW M. F., TIEDJE J. M., 2006. *Psychrobacter cryohalolentis sp. nov., Psychrobacter arcticus sp. nov., isolated from Siberian permafrost*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 1285–1281.
- BAKERMANS C., NEALSON K. H., 2004. *Relationship of critical temperature to macromolecules synthesis and growth yield in Psychrobacter cryopetella*. J. Bacteriol. 186, 2340–2345.
- BREEZE J., CADDY N., STALEY J. T., 2004. *Subfreezing growth of the sea-ice bacterium Psychromonas irnhamii*. Microb. Ecol. 47, 300–304.
- CAVICCHIOLI R., SIDDQUI K. S., ANDREWS D., SOWERS K. R., 2002. *Low-temperatures extremophiles and their applications*. Curr. Opin. Biotechnol. 13, 253–261.
- CAVICCHIOLI R., 2006. *Cold-adapted archaea*. Nature Microbiol. 4, 331–343.
- CIARAMELLA M., NAPOLI A., ROSSI M., 2005. *Another extreme genome: how to live at pH 0*. Trends Microbiol. 13, 49–51.

- DEMING J. W., 2002. *Psychrophiles and polar regions*. Curr. Opin. Microbiol. 5, 301-309.
- FUJIWARA S., 2002. *Extremophiles: developments of their special function and potential resources*. J. Biosci. Bioeng. 94, 518-525.
- GEORLETTE D., BLAISE V., COLLINS T., D'AMICO S., GRATIA E., HOYOUX A., MARXS J. C., SONAN G., FELLER G., GERDAY CH., 2004. *Some like it cold: biocatalysis at low temperatures*. FEMS Microbiol. Rev. 28, 25-42.
- GERDAY CH., AITTALEB M., BENTAHIR M., CHessa J.-P., CLAVERIE P., COLLINS T., D'AMICO S., DUMONT J., GARSOUX G., GEORLETTE D., HOYOUX A., LONHIENNE T., MEUWIS M.-A., FELLER G., 2000. *Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology*. Trends Biotechnol. 18, 103-107.
- GILICHINSKY D., RIVKINA E., SHCHERBAKOVA V., LAURINAVICHUIS K., TIEDJE J., 2003. *Supercooled water brines within permafrost – an unknown ecological niche for microorganisms: a model for astrobiology*. Astrobiology 3, 331-341.
- GILICHINSKY D., RIVKINA E., BAKERMANS C., SHCHERBAKOVA V., PETROVSKAYA L., OZERSKAYA S., IVANUSHKINA N., KOCHKINA G., LAURINAVICHUIS K., PECHERISTINA S., FATTAKHOVA R., TEDJE J.M., 2005. *Biodiversity of cryopegs in permafrost*. FEMS Microbiol. Ecol. 53, 117-128.
- GOMES J., STEINER W., 2004. *The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes*. Food Technol. Biotechnol. 42, 223-235.
- HAGGBLOM M., 2005. *Microbial life in cold ecosystems*. FEMS Microbiol. Ecol. 53, 1-2.
- HELLAND R., LARSEN A. N., SMALAS A. D., WILLASEN N. D., 2006. *Proteinase K-like proteinase from *Serratia* sp. FEBS J. 273, 61-71.*
- HOYOUX A., BLAISE V., COLLINS T., D'AMICO S., GRATIA E., HUSTON A. L., MARX J.-C., SONAN G., ZENG Y., FELLER G., GERDAY CH., 2004. *Extreme catalyst from low-temperature environments*. J. Biosci. Bioeng. 98, 317-330.
- JAVAUX E. J., 2006. *Extreme life on Earth – past, present and possibly beyond*. Res. Microbiol. 157, 37-48.
- JUNGE K., EICKEN H., DEMING J. W., 2004. *Bacterial activity at -2 to -20°C in Arctic wintertime sea ice*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 550-557.
- JUNGE K., EICKEN H., SWANSON B. D., DEMING J. W., 2006. *Bacterial incorporation of leucine into protein down to -20°C with evidence for potential activity in sub-eutectic saline ice formations*. Cryobiology 52, 417-429.
- KALINOWSKA H., ZIELIŃSKA M., KURAS E., KASIECZKA M., PIOTROWSKA-WASIAK M., MAJDA T., TURKIEWICZ M., 2005. *Zastosowanie enzymów drobnoustrojów antarktycznych w biosyntezie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych*. [W:] *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*. KOŁAKOWSKI E., BEDNARSKI W., BIELECKI S. (red.). Wydawnictwo AR w Szczecinie, 373-382.
- KAUFMAN A., TURKIEWICZ M., 2004. *Białka szoku zimna mikroorganizmów*. Post. Biochem. 50, 32-44.
- KAWAHARA H., 2002. *The structure and function of ice crystal-controlling protein from bacteria*. J. Biosci. Bioeng. 94, 492-496.
- KIM S. Y., HWANG K. Y., KIM S. H., SUNG H. C., HAN Y. S., CHO Y., 1999. *Structural basis for cold adaptation. Sequence, biochemical properties and crystal structure of malate dehydrogenase from psychrophile *Aquaspirillum arcticum**. J. Biol. Chem. 274, 11761-11767.
- MANDELMAN D., BENTAHIR M., FELLER G., GERDAY CH., HASER R., 2001. *Crystallization and preliminary X-ray analysis of a bacterial psychrophilic enzyme, phosphoglycerate kinase*. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 57, 1666-1668.
- MARION G. M., FRITSEN C. H., EICKEN H., PAYNE M. C., 2003. *The search for life on Europa: limiting environmental factors, potential habitats, and Earth analogues*. Astrobiology 3, 785-811.
- METHÉ B., NELSON K. E., FRASER C. M., 2004. *It's a cold world out there (but the prospects are hot)*. Trends Microbiol. 12, 532-534.
- METHÉ B., NELSON K. E., DEMING J. W., MOMEN B., MELAMUD B., ZHANG X., MOULT J., MADUPU R., NELSON W., DODSON R. J., BRINKAC L. M., DAUGHERTY S. C., DURKIN A. S., DEBOY R. T., KOLONAY J. F., SULLIVAN S. W. A., ZHOU L., DAVIDSON T. M., WU M., HUSTON A. L., LEWIS M., WEAVER B., WEIDMAN J. F., KHOURI H., UTTERBACK T. R., FELDBLYUM T. V., FRASER C. M., 2005. *The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 102, 10913-10918.
- MORITA R. Y., 1975. *Psychrophilic bacteria*. Bacteriol. Rev. 39, 144-167.
- NICHOLS D., BOWMAN J., SANDERSON K., NICHOLS K. M., LEWIS T., MCMECKIN T., NICHOLS P. D., 1999. *Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes*. Curr. Opin. Biotechnol. 10, 240-246.
- PAKCHUNG A. A. H., SIMPSON P. J. L., CODD R., 2006. *Life on Earth. Extremophiles continue to move the goal posts*. Environ. Chem. 3, 77-93.
- PAPANIKOLAN Y., TISGOS J., PAPADOVASILAKI M., BORIO-TIS V., PETRATOS K., 2005. *Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of an alcohol dehydrogenase from the Antarctic *Moraxella* sp. TAE123*. Acta Crystal. F 61, 246-248.
- PONDER M. A., GILMOUR S. J., BREGHOLTZ P. W., MINDOCK C. A., HOLLINGSWORTH R., RUSSEL R. M. J., GERIKE U., DANSON M. J., HOUGH D. W., TAYLOR G. L., 1998. *Structural adaptations of the cold active citrate synthase from an Antarctic bacterium*. Structure 6, 351-361.
- SATYANARYANA T., RAGHUKUMAR CH., SHIVAJI S., 2005. *Extremophilic microbes: diversity and perspectives*. Curr. Sci. 89, 78-90.
- SCHIRALDI CH., DE ROSA M., 2002. *The production of biocatalyst and biomolecules from extremophiles*. Trends Biotechnol. 20, 515-521.
- SELLEK G. A., CHAUDHURI J. B., 1999. *Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles*. Enz. Microb. Technol. 25, 471-482.
- ŚWIECICKA J., BUCZEK J., HAUSCHILD T., 1997. *Psychrofile i psychrotrofy*. Post. Microbiol. 36, 53-70.
- THOMAS D. N., 2005. *Photosynthetic microbes in freezing deserts*. Trends Microbiol. 13, 87-88.
- THOMASHOW M. F., TEDJE J. M., 2005. *Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychroactive bacteria*. FEMS Microbiol. Ecol. 53, 103-115.
- TSURUTA H., MIKAMI B., AIZONA Y., 2005. *Crystal structure of cold active protein-tyrosine phosphatase from a psychrophile *Schewanella* sp.* J. Biochem. 137, 69-77.
- TUNG H. C., BRAMALL N. E., PRICE P. B., 2005. *Microbial origin of excess methane in glacial ice and implications for life on Mars*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 102, 18291-18296.
- TUNG H. C., PRICE P. B., BRAMALL N. E., VRDOJAK G., 2006. *Microorganisms metabolizing on clay grains in 3-km-deep Greenland basal ice*. Astrobiology 6, 69-86.
- TURKIEWICZ M., 1999. *Białka termicznej histerezy – struktura, funkcja, znaczenie użytkowe*. Biotechnologia 44, 11-33.
- TURKIEWICZ M., GROMEK E., 2000. *Enzymy drobnoustrojów psychrofilnych i ich biotechnologiczne zastosowanie*. Biotechnologia 48, 171-188.

- TURKIEWICZ M., 2003. *Perspektywy biokatalizy*. Biotechnologia 61, 316-336.
- VAN PETEGEM F., COLLINS T., MEUWIS M. A., GERDAY CH., FELLER G., VAN BEEMEN J., 2003. *The structure of a cold-adapted family 8 xylanase at 1.3 Å resolution. Structural adaptations to cold and investigation of the active site*. J. Biol. Chem. 278, 7531-7539.
- VILLERET J. V., CHESSA J. P., GERDAY CH., VAN BEEUMEN J., 1997. *Preliminary crystal structure determination of the alkaline protease from the Antarctic psychrophile Pseudomonas aeruginosa*. Protein Sci. 6, 2462-2464.
- VIOLOT S., CZYZEK M., GERDAY CH., AGHAJARI N., 2005. *Structure of a full length psychrophilic cellulase from Pseudoalteromonas haloplanktis revealed by X-ray diffraction and small angle X-ray scattering*. J. Mol. Biol. 348, 1211-1224.
- VISHNIVETSKAYA T. A., PETROVA M. A., URBANCE J., MOYER C. L., GILICHINSKY D. A., TEDJE J. M., 2006. *Bacterial community in ancient Siberian permafrost as characterized by culture and culture-independent methods*. Astrobiology 6, 400-414.
- WAINWRIGHT M., WICKRAMASINGHE N. C., NARLIKAR J. V., RAJARATMAN P., PERKINS J., 2004. *Confirmation of the presence of viable but non-cultureable bacteria in the stratosphere*. Int. J. Astrobiol. 3, 13-15.
- WICKRAMASINGHE CH., 2004. *The universe: a cryogenic habitat for microbial life*. Cryobiology 48, 113-125.