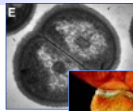


Extremofilové ...

... aneb někdo to rád horké
(případně i studené, kyselé atp.)

Vladimír Kopecký Jr.

Fyzikální ústav Univerzity Karlovy v Praze
Oddělení fyziky biomolekul
<http://biomolecules.mff.cuni.cz>
kopeccky@karlov.mff.cuni.cz



Evoluce jak ji známe

Extremofilní organismy



Extremofilové

Extremofilní organismy – definice

- **Extremofilní organismus** je ten, který prospívá v extrémních podmínkách
- **Polyextremofilní organismus** prospívá nejlépe v podmínkách dvou a více extrémů
- **Extrémem** se rozumí fyzikální (např. teplota, tlak, radiace) či chemické podmínky (např. salinita, vysychání, pH, redox potenciál, oxidační prostředí)
- Mezi extrémy by se mohly též zařadit biologické faktory (např. nutriční extrémy, populační hustota, parazitace, atp.)

Extremofilové

Kdo je extremofil?

■ Jaké podmínky jsou skutečně extrémní?

- Naše definice jsou antropocentrické
- Z pohledu mikrobů je člověk extremofil libující si v oxidačním prostředí

■ Musí extremofil opravdu milovat (-fil) své extrémní prostředí?

- Mnoho organismů spíše toleruje extrémní podmínky než aby je aktivně vyhledávalo

■ Musí být organismus extremofilem po celý život a ve všech fázích svého vývoje?

- *Deinococcus radiodurans* vlivem extrémního zatížení ztrácí odolnost vůči radiaci
- Zvířata tolerují během zimního spánku překvapivě nízké teploty
- Želvušky krátkodobě snášejí teploty od $-253\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $151\text{ }^{\circ}\text{C}$, X-ray, vakuum, tlaky 600 MPa

Extremofilové

Rozdělení vs. chování

Parametr	Typ chování	Definice	Příklad. org.
Teplota	Hypertermofil	růst $> 80\text{ }^{\circ}\text{C}$	<i>Pyrolobus fumarii</i>
	Termofil	růst $60\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$	<i>Synechococcus lividis</i>
	Psychofil	$< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$	psychrobakterie
Radiace	Atomofil	$> 6\text{ krad/h}$	<i>D. radiodurans</i>
Tlak	Piezofil	$> \text{GPa}$	<i>E. coli</i>
Vysychání	Xerofil	anhydrobiot	<i>Artemia salina</i>
Salinita	Halofil	$2\text{--}5\text{ Mol NaCl}$	halobakterie
pH	Alkalofil	$\text{pH} > 9$	natronobakterie
	Acidofil	$\text{pH} \sim 1$	<i>Cyanidium caldarium</i>
Kyslík	Anaerob	O_2 netolerující	<i>Mathanococcus jannaschii</i>
	Mikroaerofil	tolerují $> \text{O}_2$	<i>Clostridium</i>
Chem. extr.	Plyn	čisté CO_2	<i>Cyanidium caldarium</i>
	Kovy	konc. kovů	<i>Ferroplasma acidar.</i>

Evoluce jak ji známe

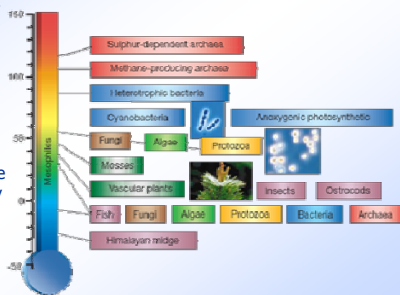
Limity života

- **Nejtepleji:** $113\text{ }^{\circ}\text{C}$, *Pyrococcus furiosus* (Islandské a Italské sopky)

- **Nejstudeněji:** $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, *Cryptotendolithophila* (Antarktida)

- **Nejhlouběji:** 2 míle pod zemí, bakterie v hlubokových vrtech

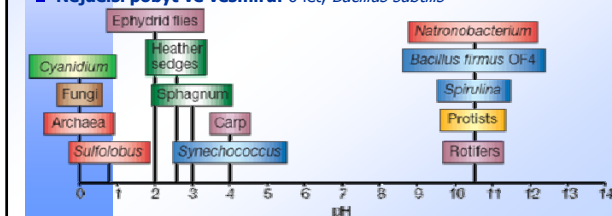
- **Nejvyšší radiace:** 15 Mrads, *Deinococcus radiodurans* (všudypřítomný)



Evoluce jak ji známe

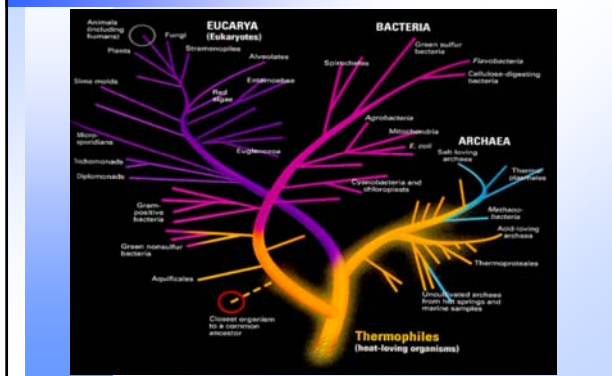
Limity života

- **Nejkyselější:** pH=0,0, *Picrophylus oshimae*
- **Nejzásaditější:** pH=11, alkalofilní bakterie
- **Nejslanější:** 30 %, halofilní bakterie
- **Nejvyšší tlak:** 1200 atm., společenství na dně Mariálského příkopu
- **Nejdelší latence:** 20–40 milionů let (jantar), *Bacillus*
- **Nejvzdálenější pobyt ve vesmíru:** Surveyor III (3 roky) *Streptococcus*
- **Nejdelší pobyt ve vesmíru:** 6 let, *Bacillus subtilis*



Evoluce jak ji známe

Hledání nejvzdálenějšího předka



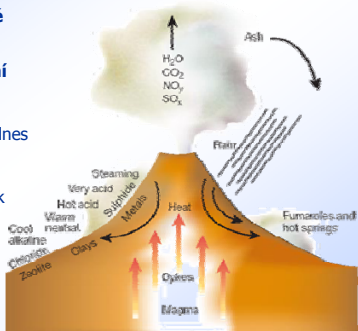
Evoluce jak ji známe

Podmínky na pradávné Zemi

- **Podmínky na pradávné Zemi v mnohem připomínají podmínky v nichž žijí extremofilní organismy**

- V těchto podmínkách se dnes vyskytují zástupci archae

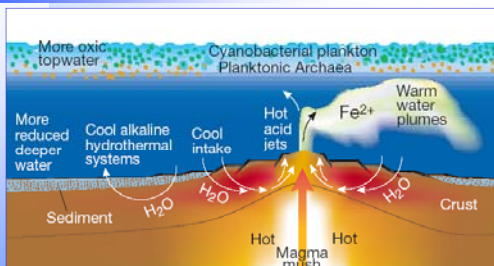
- Oblasti pozemských sopek hostí prostředí s velkým rozsahem pH, s vysokou koncentrací SO_4 a CO_2 , magnesia a niklu



■ E. G. Nisbet & N. H. Sleep, Nature 409 (2001) 1083–1091.

Evoluce jak ji známe

Podmínky na pradávné Zemi



Oblasti podmořských sopek jsou dodnes oázami archaického života nezávislého na fotosyntéze. Prostor je silně kyselý, teplota až 400 °C, vysoký tlak (ca. 3 km pod hladinou) dostatek Fe a sloučenin síry

■ E. G. Nisbet & N. H. Sleep, Nature 409 (2001) 1083–1091.

Evoluce jak ji známe

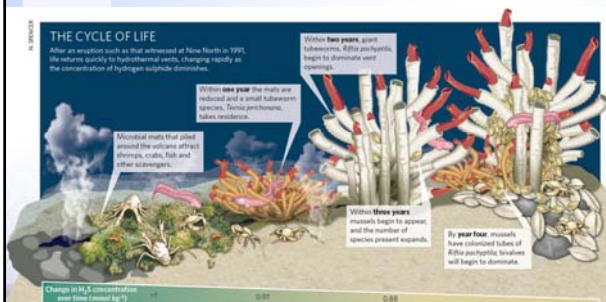
Pozoruhodný svět v temnotách...

- Svět „černých kuřáků“ objeven ponorkou Alvin v roce 1977
- Jde o horká termální zřídla (ca. 350 °C) ve velkých hloubkách (>3000 m) bohatá na sloučeniny síry
- Doposud objeveno okolo 30 zón termálních podmořských zřídél
- Ekosystém je založen na sírných bakteriích
- Červy rodu *Riftia pachytila* nepřijímá potravu a žije pouze ze symbiózy s bakteriemi



Evoluce jak ji známe

Pozoruhodný svět v temnotách



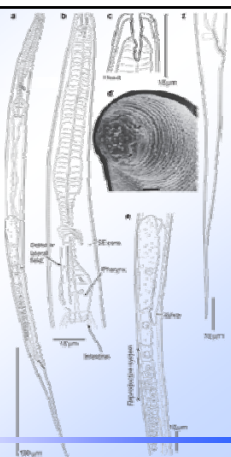
■ J. Qiu, Nature 465 (2010) 284–286.

Evoluce jak ji známe

Hluboká horká biosféra

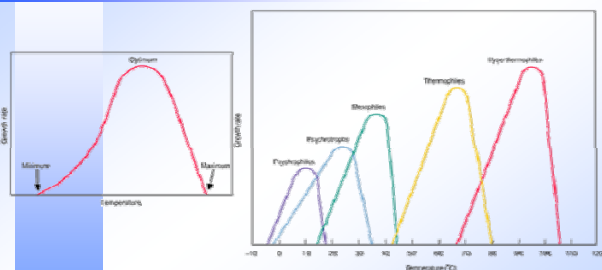
- Původně zahrnovala jednobuněčné organismy v hloubkách kolem 3 km
- Zahrnuje zřejmě významnou složku biosféry
- Omezena teplotou, dostupností energie, prostorem a anoxickým prostředím
- Nález hlístice *Helicephalobus mephisto* v Jižní Africe v hloubkách 0,9–3,6 km
- Reprodukuje se asexuálně, živí se termofilními bakteriemi
- Toleruje vyšší teploty, uhlíková data značí, že voda ve které žije je 3–12 tisíc let stará
- Existují další hypoxičtí vícebuněční?

■ G. Borongan et al., Nature 474 (2011) 79–82.



Extrémní teplota

Rozdělení organismů dle optimální teploty růstu



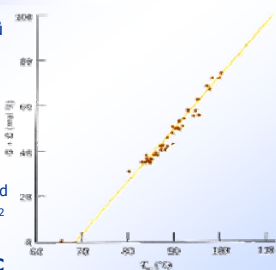
Mikroorganismy lze rozdělit do skupin dle optimální teploty pro růstu. Teplotní rozsah možného růstu je relativně široký. Ve formě spor mohou mikroby přestát mnohem nepříznivější okolnosti.

■ L. M. Prescott et al.: Microbiology, McGraw-Hill (1999).

Extrémně vysoká teplota

Kdo pak to rád horké?

- Většina hypertermofilních organismů jsou zástupci archae
- **Chlorofyl degraduje při 75 °C** → fotosyntéza je vyloučena
- Zdrojem energie je nitrifikace či příbuzné reakce
- **Průměrná DNA denaturuje při ca. 70 °C**
 - DNA termofilů je stabilizována (před hydrolyzou a depurinací) KCl a $MgCl_2$
 - G+C nejsou častější v DNA pouze v ribozomální RNA a tRNA
- **Proteiny denaturují při ca. 60 °C**
 - Proteiny termofilů nemají jiné teplotní optimum
 - Jsou rigidnější a teplotní křivka je plošší



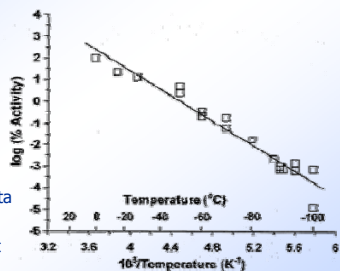
Teplota tání nukleové kyseliny v závislosti na obsahu G+C párů (guanin + cytosin)

■ L. J. Rothschild & R. L. Mancinelli, Nature 409 (2001) 1092–1101.

Extrémně nízká teplota

Aktivita enzymů při teplotě $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$

- Funkčnost enzymů vyžaduje kapalné rozpouštědlo
- Některé enzymy ztrácejí při nízkých teplotách funkčnost díky dynamickému přechodu do jiné konformace
- Při nižších teplotách je aktivita enzymů ovlivněna fluiditou roztoku pro substrát/produkt
- Nebyl nalezen žádný limit v oblasti nízkých teplot pro fungování enzymů



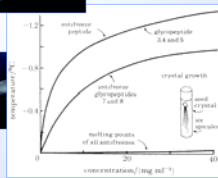
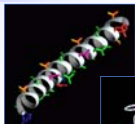
Arrhenius graf pro aktivitu alkalín fosfatázy v roztoku methanol/ethylenglykol/voda (70/10/20 %)

■ J. M. Braguer et al., Biochim. Biophys. Acta 1480 (2000) 278–282.

Extrémně nízká teplota

Nemrznoucí proteiny

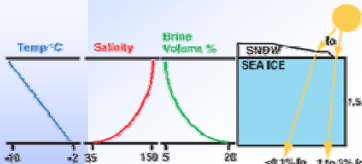
- Existují proteiny, které umožňují život vyšším živočichům za nízkých teplot (především rybám)
- Existují antifreeze proteiny a glykoproteiny IV typů
- Molekulová váha 2,6–33 kDa
- V sekvenci převažuje Ala ca. 60 % (někdy Cys), ve struktuře helix
- Mechanismus účinku není přesně znám, snad vazba na specifické konformace ledu



■ F. Sicheri & D. S. C. Yang, Nature 375 (1995) 427–431.

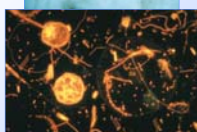
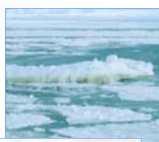
Extrémně nízká teplota

Život v ledu



- Gradienty teploty (mořská voda mrzne při $-1,8\text{ }^{\circ}\text{C}$), salinity a objemu solného roztoku napříč vodním ledem
- Sněhová pokrývka silně omezuje množství dopadajícího záření
- Psychrofilní mikroorganismy mohou nerušeně žít zamrzlé v ledu, sic!

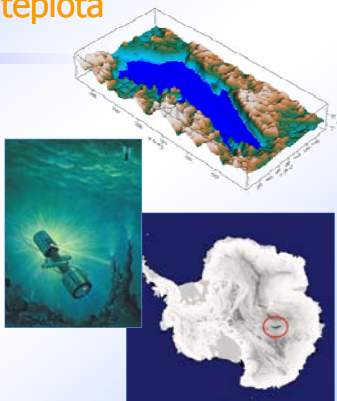
■ D. N. Thomas & G. S. Dieckmann, Science 295 (2002) 641–644.



Extrémně nízká teplota

Jezero Vostok...

- Roku 1974 se podařilo u antarktické stanice Vostok nalézt jezero ukryté pod vrstvou ~4 km ledu
- Jde o rozlehlé (10 000 km²) – tj. ca. jezero Ontario) sladkovodní jezero 250×50 km
- Průměrná hloubka 125 m
- Odhaduje se, že vodní svět jezera je izolován již miliony let (> 10 Myr)**

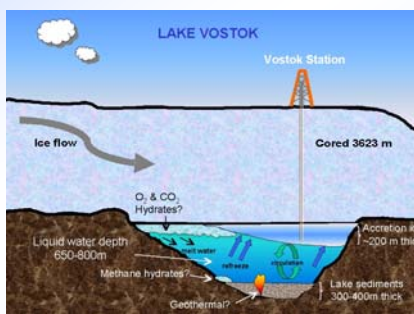


■ A. P. Kapitsa et al., Nature 381 (1996) 684–686.

Extrémně nízká teplota

Jezero Vostok...

- Ruský vrt odebere vzorky z jezera
- Velké obavy o kontaminaci jezera vrtnou kapalinou**
- Možnost experimentálně navrtat jedno z 145 jezer ukrytých v Antarktidě pod ledem
- Předběžné výsledky napovídají o výskytu hypertermofilů?**
- Nutriční strádání?**



■ J. C. Priscu et al., Science 286 (1999) 2141–2144.

Extrémně nízká teplota

Jezero Vostok

- 7. února 2012 10.25 místního času došlo k navrtání jezera Vostok**
- Navrtání teplotní sondou a silikonem po 12 letech (vrt sloužil pro výzkum klimatu)
- Vzdutí vody 30–40 m do vrtu – odběr prováděn odsud pro zamezení kontaminace
- V letech 2013–14 plánovány odběry vzorků, kamerový průzkum, sondy a spektrometrická měření
- Snaha GB a USA navrtat pomocí horké vody do 3 dnů jiná jezera v hloubkách kolem 3 km
- Předběžné výsledky z 16. října 2012 na 12th European Workshop on Astrobiology ukazují že **voda jezera je zcela bez života**, sic!

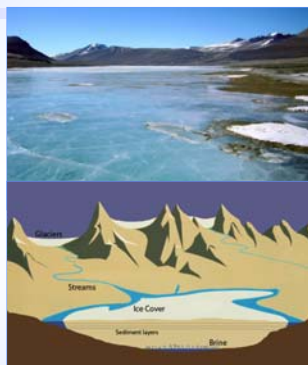


■ N. Jones, Nature 482 (2012) 287.

Extrémně nízká teplota

Jezero Vida...

- **Hypersalinní jezero v pouštní oblasti McMurdo v Antarktidě** (jedno z největších v oblasti)
- Plocha 6,8 km² s ledovým příkrovem ca. 27 m
- Jezero izolováno po ~2 800 let
- 6× slanější než mořská voda
- Solný roztok kapalný i při -13 °C (nejchladnější jezero)

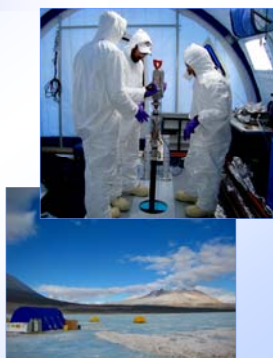


■ A. Murray et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109 (2012) 20626–20631.

Extrémně nízká teplota

Jezero Vida

- Úspěšně oživeny mikroorganismy z ledového příkrovu i po tisíciletích (halofilní bakterie a sinice)
- Nalezeny „běžné“ mikroorganismy u dna v množství 1/10 ve sladké vodě
- 32 různých typů mikrobů, včetně proteobakterií, firmikutů, spirochét či aktinobakterií)
- Zdrojem energie pro život jsou kovy, amoniak, NO_x, SO_x a především H₂



■ A. Murray et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109 (2012) 20626–20631.

Extrémně nízká teplota

Závody o jezera

- **Existuje 380 jezer ukrytých pod ledem v Antarktidě**
- Většina z nich prozkoumána radarově, gravitačně a seismicky
- **Jezera jsou izolována po miliony let**
- Druhé navrtané jezero má být Ellsworth
- Třetí Whillans na okraji Rossova ledového šelfu
- UK tým použije vysokotlakou vodu o 90 °C a navrtá 3 km během 3 dní, na odběr vzorků zůstává 24 hodin, pak vrt zamrzne



■ Q. Schirmer, Nature 491 (2012) 506–507.

Extrémní radiace

Nepřirozené podmínky

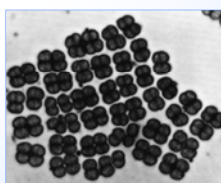
- Radiaci se rozumí **vysoké dávky částicového záření** (neutrony, elektrony, alfa částice, těžké ionty) nebo **elektromagnetického záření** (prakticky celé spektrum od gama, přes X-ray, až po radiové vlny)
- Jde o podmínky, které se **na Zemi přirozeně nevyskytují**
- Studium probíhá vzhledem k důležitosti pro medicínu, válečnictví a kosmický výzkum
- Radiace **inhibuje fotosyntézu** a přímo **poškozuje nukleové kyseliny**
- Mezi rekordmany snášející vysoké dávky záření patří mikroby **Deinococcus radiodurans**, **Rubrobacter** a zelená řasa **Dunaliella bardawil**

■ L. J. Rothschild & R. L. Mancinelli, Nature 409 (2001) 1092–1101.

Extrémní radiace

Velký rekordman

- **Deinococcus radiodurans** (půdní bakterie, všeobecně rozšířená) je zřejmě největším extremofilem vůbec
- **Snáší vysoké dávky ozáření – 20 kGy** gama záření – UV ozáření více než **1000 J/m² – 3–5 milionů rad (100 rad, tj. 1 J záření / 1 kg buněk, je pro člověka letální dávka resp. 5 krad/h; pozadí je 0,5 rad/rok)**
- Přežívá i extrémně vysoké tlaky a zrychlení
- Jde zřejmě o vedlejší efekt rezistence vůči vysychání
- Bakterie obsahuje **velké množství antioxidantů a detoxifikačních enzymů**
- Má **unikátní mechanismus pro opravu DNA, který umožňuje její správné poskládání z fragmentů**

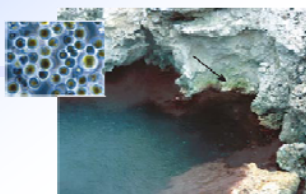


Mikrokolonie *Deinococcus radiodurans* organizovaného do tetrad či ve formě diplokoxy.

■ L. J. Rothschild & R. L. Mancinelli, Nature 409 (2001) 1092–1101.

Extrémní pH

Jak žít a přežít...



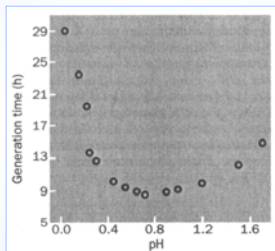
- **Acidofilní organismy** vyžadují jako optimální pH pro růst **<2** (ryby a cyanobakterie nesnáší pH<4, rostliny a hmyz <3, jen někteří eukaryoti tolerují pH<1)
- **Alkalofilní organismy** tolerují pH>11 (zástupci všech říší)
- Schopnost přežití je závislá na změněné fyziologii (více protonových pump, pasivní mechanismy nábojů na membránách) a schopnosti přizpůsobit pH okolí neutrálnímu

■ L. J. Rothschild & R. L. Mancinelli, Nature 409 (2001) 1092–1101.

Extrémní pH

Mikrobiální život při pH=0

- Je známo zhruba 5 druhů bakterií žijících při pH=0
- Hyperacidofilní bakterie vyžadují k růstu většinou i teplotu >50 °C
- Obsah G+C párů je ca. 40 %
- Není zřejmé jak bakterie přežívají nízká pH, buď užívají silné protonové pumpy, nebo nízkou protonovou permeabilitu membrán



Graf růstu *Picrophylus oshimae* (při teplotě 60 °C)

■ C. Schleper et al., Nature 375 (1995) 741–742.

Extrémní koncentrace solí

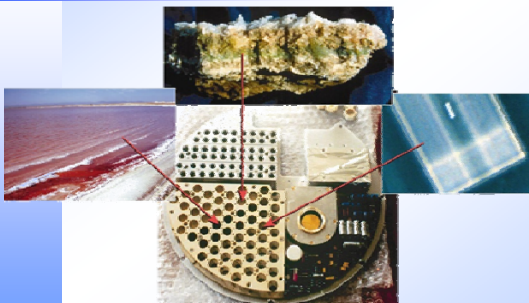
Jak žít a přežít

- **Halofilní organismy** vyžadují prostředí s vysokou koncentrací solí, někdy i nasycených roztoků solí
- Mezi halofilními organismy lze nalézt zástupce **erchae**, **cyanobakterie**, ale i zelenou řasu **Dunaliella salina**
- **Ochranné mechanismy jsou podobné jako ochrana před suchem (dehydratací) – podobné podmínky s kosmickým prostorem, sic!**
- Organismy užívají zvýšení osmolarity v cytosolu (ochrana před dehydratací), některé zvyšují obsah K⁺, či prokaryoté užívají jako osmotikum glycin betain
- K zadržení vody se užívá snížení permeability membrán, zvýšení obsahu cukrů, glutamátu, glutaminu, prolinu etc.

■ L. J. Rothschild & R. L. Mancinelli, Nature 409 (2001) 1092–1101.

Extrémní koncentrace solí

Experimenty v kosmu



Experiment BioPan vystavil halofilní organismy na dobu dvou týdnů kosmickému prostředí. Vlevo erchae *Dunaliella*, uprostřed *Synechococcus* (z pacifické solné zóny), vpravo mikrofotografie *Haloarcula* uzavřené v krystalu NaCl.

Extrémní tlak

Jak přežít tlaky

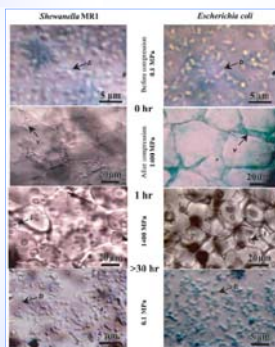
- Zvýšený tlak **posunuje hranici kapalnosti vody** (na dně moře ca. 10 km voda vře při 400 °C) a tak i možnost optimálního růstu mikrobů – využíváno velmi zřídka
- Vysoký tlak **snižuje fluiditu buněčných membrán** (reakcí je zvýšení obsahu mastných kyselin v membránách)
- Vysoký tlak **může pomoci stabilizovat konformace proteinů**, některé však destabilizuje a navíc může ohrozit i stabilitu DNA
- Mezi „tlaky“ by měl být zařazen i vliv gravitace, sic!

■ L. J. Rothschild & R. L. Mancinelli, Nature 409 (2001) 1092–1101.

Extrémní tlak

Mikrobiální život za tlaku GPa

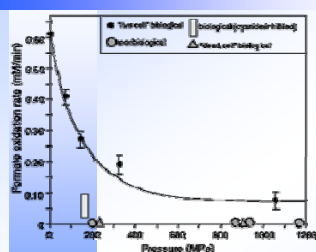
- Bakterie žijí při tlacích do **1060 MPa**
- Aktivita byla sledována pomocí oxidace mravenčanu
- Bakterie zamrzlé ve VI-ledu **přežívají tlak až do 1600 MPa**
- Z 10^6 bakterií přežilo 30 h expozici GPa tlaku 10^4
- Stres způsobený vysokým tlakem zároveň selektuje jedince odolné k vyšším teplotám
- Použitý tlak 1200–1600 MPa odpovídá hloubce **~50 km pod povrchem Země** nebo **~160 km pod hladinou moře**



■ A. Sharma et al., Science 295 (2002) 1514–1516.

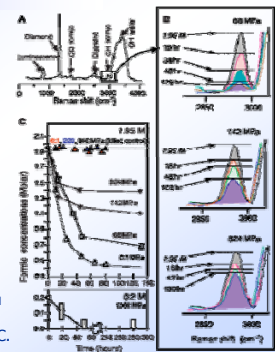
Extrémní tlak

Mikrobiální život za tlaku GPa



Aktivita bakterií byla sledována pomocí Ramanovy spektroskopie oxidace mravenčanu (inhibován kyanidem). Experimenty byly prováděny v diamantové cele při teplotě 25 °C.

■ A. Sharma et al., Science 295 (2002) 1514–1516.



Extremofilové

Implikace pro život ve sluneční soustavě

■ Mars

- Život je myslitelný pod povrchem
- Fotosyntéza je nepravděpodobná
- Sporující mikroorganismy mohou přežít i na povrchu

■ Europa

- Radiace na povrchu Mrad/h zahubí vše živé
- Fotosyntéza by mohla být možná ve vodním ledu
- Tlak v oceánu nepředstavuje problém

■ Meziplanetární transport a kontaminace

- Mikroby přežívají zrychlení $>10\,000\text{ g}$
- Přežití v meziplanetární prostoru po delší dobu je možné a závisí na místě v „transportéru“
- Kontaminace Marsu či Europy je velmi reálná

Organismy žijí v extréměch...

... ne všechny je však přežijí

