

Agnieszka Zabłotni^{1*}, Anna Dziadosz^{**}

¹Zakład Mikrobiologii Ogólnej Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Wpłynęło w marcu 2013 r.

1. Wprowadzenie. 2. Warunki życia i przystosowanie do nich. 2.1. Psychrofile. 2.2. Termofile. 2.3. Acidofile. 2.4. Alkalifile. 2.5. Halofile. 2.6. Piezofile. 3. Z ekstremofilami w przyszłość – biotechnologiczne możliwości wykorzystania. 4. Podsumowanie

Extremophiles – microorganisms with the past and the future

Abstract: Extremophilic microorganisms can live and grow under extreme conditions. They exist in many natural, as well as human made habitats characterized by an elevated or low temperature, extreme pH value, high salt concentration and hydrostatic pressure. They represent Bacteria, Archaea and Eucarya domains. Many of them are polyextremophiles. Extremophilic microorganisms use a variety of strategies for survival under unfavourable conditions. Their structural and physiological features have been studied for many years and a novel application area for extremophilic enzymes and other products have been found. A range of new applications is still in development.

1. Introduction. 2. Living conditions and adaptation to them. 2.1 Psychrophiles. 2.2. Thermophiles. 2.3. Acidophiles. 2.4. Alkaliphiles. 2.5 Halophiles. 2.6. Piezophiles. 3. The future with extremophiles – biotechnological potential for use. 4. Abstract

Słowa kluczowe: ekstremofile, poliekstremofile, środowiska skrajne

Key words: extremophiles, polyextremophiles, extreme environments

1. Wprowadzenie

Według słownika synonimów [7] ekstremalny oznacza: skrajny, krańcowy, radykalny, ale także wyjątkowo trudny, a w odniesieniu do wielkości matematycznej, mierzałnej: minimalny lub maksymalny. W tym kontekście, środowiska skrajne to takie, w których panujące warunki fizyczne lub chemiczne (bądź też jedno i drugie) przyjmują wartości skrajne.

Środowiska cechujące się ekstremalnymi warunkami znane są od dawna. Jako typowe przykłady można wymienić tu chociażby: gorące źródła, rejony ujść hydrotermalnych na dnie oceanów, zimne wody polarne, ale także silnie zasolone jeziora śródlądowe, czy nawet kwaśne odpływy wód kopalnianych. Przez długi czas obszary takie uważane były za pozbawione jakichkolwiek organizmów – właśnie ze względu na panujące w nich radykalne warunki, które z antropocentrycznego punktu widzenia nie pozwalały na egzystencję żywych organizmów. Wartości parametrów fizycznych czy chemicznych we wspomnianych środowiskach, drastycznie odbiegające od tych, które powszechnie uznawano za „normalne” czy „fizjologiczne”, były tylko jedną z przyczyn traktowania ich jako jałowe. Drugą przyczyną stała się jasna wraz z postępującym rozwojem metod izolacji i hodowli drobnoustrojów. Możliwość dobrania odpo-

wiednich podłoż, stworzenia i utrzymania warunków typowych dla środowisk skrajnych i przede wszystkim zastosowanie technik molekularnych, pozwoliły wykazać nie tylko obecność, ale także możliwość rozwoju wielu różnych organizmów w tych środowiskach [13]. Po raz pierwszy terminu „ekstremofile” na określenie organizmów zasiedlających wspomniane środowiska użył w 1974 roku Mac Erl o y i od tego czasu na stałe wszedł on do terminologii biologicznej. Do grupy ekstremofili zaliczani są nieliczni przedstawiciele organizmów eukariotycznych (glonów, grzybów czy pierwotniaków), a najliczniej reprezentują ją organizmy prokariotyczne, zarówno przedstawiciele domeny Archaea jak i Bacteria, chociaż archeony stanowią większość [11–13, 33].

Podział na określone grupy w obrębie ekstremofili wynika z działających na nie w danym środowisku czynników fizycznych lub/i chemicznych o skrajnych wartościach. Do czynników tych należą przede wszystkim: temperatura, pH, zasolenie oraz ciśnienie hydrostatyczne. Restrykcyjne wartości poszczególnych czynników bywają warunkiem koniecznym funkcjonowania ekstremofili, to jest: właściwego przebiegu procesów metabolicznych i ich namnażania. Dlatego kwestią sporną bywa włączanie do ekstremofili organizmów opornych na wysokie stężenia jonów metali ciężkich, promieniowanie UV, a także promieniowanie przenikliwe, czy

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Ogólnej Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16; tel. (042) 635 44 69; fax: (42) 665 58 18; e-mail: agzab@biol.uni.lodz.pl

** Anna Dziadosz (studentka Uniwersytetu Łódzkiego)

niską zawartość wody, ponieważ organizmy zdolne do wzrostu w takich warunkach mogą równie dobrze rozwijać się w środowiskach, w których czynniki te nie działają. Sugeruje się więc traktować ich raczej jako organizmów o dość szerokim spektrum tolerancji, niż organizmów ekstremalnych [33]. W wielu przypadkach ekstremofile żyją w środowiskach, w których wystawione są na działanie więcej niż jednego czynnika ekstremalnego – takie organizmy nazywamy poliekstremofilami [8, 33]. Jako przykład można tu wymienić choćby mikroorganizmy głębin oceanicznych (niska temperatura i bardzo wysokie ciśnienie hydrostatyczne), chemolitotrofy występujące w okolicach podwodnych ujść hydrotermalnych (panuje tutaj zarówno wysokie ciśnienie hydrostatyczne, bardzo wysoka temperatura jak i niskie pH), czy drobnoustroje rozwijające się w gorących, silnie zakwaszonych źródłach [5, 54, 95].

W dalszej części artykułu opisane zostaną mikroorganizmy ekstremofilne i środowiska w których żyją, ich przystosowania do panujących tam warunków oraz możliwości biotechnologicznego wykorzystania tych drobnoustrojów.

2. Ekstremofile – warunki życia i przystosowanie do nich

Ekstremofile zależnie od działających na nie fizycznych i chemicznych czynników środowiskowych podzielono na sześć głównych grup. Są nimi: psychro- i termofile zdolne do wzrostu odpowiednio w niskiej i wysokiej temperaturze, acido- i alkalifile żyjące w niskim i wysokim pH, piezofile występujące w głębinach morskich charakteryzujących się wysokim ciśnieniem hydrostatycznym i halofile – typowe dla środowisk o wysokiej zawartości soli.

2.1. Psychrofile

Termin „psychrofile” został po raz pierwszy zaproponowany już w 1902 roku przez Schmidt-Nielsen a i odnosił się do organizmów zdolnych do wzrostu i namnażania w temperaturze 0°C [42]. Obecnie, zgodnie z propozycją Mority [55], za mikroorganizmy psychrofilne uznaje się takie, które nie rosną w temperaturze powyżej 20°C, a optymalne warunki do ich rozwoju stwarza temperatura poniżej 15°C. Oddzielną grupę stanowią zaś drobnoustroje psychrotolerancyjne, które co prawda są zdolne do wzrostu w temperaturze poniżej 5°C, ale optymalna temperatura ich wzrostu mieści się w zakresie 20–25°C. Nie ma więc wątpliwości, że organizmy psychrofilne to inaczej organizmy środowisk zimnych – a tym samym środowisk, które można uznać za dominujące na Ziemi [13, 69]. Psychrofile izolowane są z takich miejsc jak: lody

Antarktyki czy Arktyki, lodowce, wieczne zmarzliny, stale zimne wody nie tylko regionów polarnych, ale też głębin oceanicznych i morskich czy nawet wodonośne, podziemne warstwy skał. Pozyskuje się je także z próbek pobieranych wysoko w górach i w jaskiniach [4, 13, 18, 30]. Bardzo szczególnymi psychrofilami są mikroorganizmy, dla których w ostatnich latach zaproponowana została nazwa eutektofile. Są nimi bakterie, które żyją w przestrzeni na granicy ciekłej i stałej fazy kryształków lodu [18]. Mnogość środowisk, w których występują sprawia, że psychrofile uznawane są za najliczniejsze z ekstremofili pod względem różnorodności czy rozmieszczenia, a także wytwarzania biomasy [64]. Oprócz wyżej wymienionych naturalnych środowisk, psychrofile rozwijają się także w miejscach powstałych dzięki działalności człowieka. Dobrym przykładem mogą tu być zbiorniki z wodą w układach chłodzenia i zbiorniki przetrzymywania mleka [13]. Warto tu przypomnieć, że w środowiskach zimnych rzadko kiedy temperatura jest jedynym restrykcyjnym czynnikiem – w morzach i oceanach dochodzi jeszcze wysokie ciśnienie hydrostatyczne, w innych miejscach np. wysokie stężenie NaCl. W większości przypadków organizmy psychrofilne zaliczyć można więc do wspomnianych wcześniej poliekstremofili (w podanych przykładach odpowiednio: piezopsychrofilii i halopsychrofilii) [30].

Psychrofile stanowią grupę bardzo zróżnicowaną filogenetycznie. Zalicza się do nich przedstawicieli wszystkich trzech domen – znajdziemy tu zarówno bakterie jak i archeony, a nawet organizmy eukariotyczne [13, 30, 64]. Wśród bakterii dominują Gram-ujemne proteobakterie (α -, β - i γ -) oraz przedstawiciele typu *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodes*. Typowymi przykładami są tu wybrane gatunki z rodzajów: *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Serratia*, *Polaromonas*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Psychromonas*, *Psychrobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Cellulophaga*, *Marinobacter*, *Maribacter* (np. *Psychrobacter pacificensis*, *Psychromonas antarctica*, *Cellulophaga baltica*, *Marinobacter psychrophilus*, *Maribacter antarcticus*). Nieco mniej licznie psychrofile reprezentowane są przez bakterie Gram-dodatnie, należące do *Firmicutes* i *Actinobacteria* (gatunki z rodzajów: *Micrococcus* – *M. antarcticus*, *Bacillus* – *B. marinus*, *Clostridium* – *C. vincentii*, *Arthrobacter* – *A. psychrolactophilus*). Psychrofilne archeony to np. metanogenne drobnoustroje z rodzaju *Methanococoides* – *M. burtonii*, *Methanogenium* – *M. frigidum*, ale także nieliczni przedstawiciele rodzajów: *Halorubrum* czy *Cenarchaeum*. Psychrofilni przedstawiciele trzeciej domeny to wybrane gatunki grzybów takich rodzajów jak: *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, a spośród drożdży: *Candida*, *Torulopsis*, *Mrakiella*, *Rhodotorula*. Znane są także psychrofilne glony *Chlamydomonas nivalis*, izolowane z alpejskich śniegów, nadające im charakterystyczny, intensywny czerwono-różowy kolor [13, 30].

Wszystkie wyżej wymienione organizmy, aby przetrwać w warunkach niskiej temperatury wykształciły określone mechanizmy adaptacji. Przystosowania te obejmują zmiany w różnych składnikach komórkowych takich jak: lipidy, białka enzymatyczne, kwasy nukleinowe, co z kolei ma wpływ na przebieg procesów transportu oraz replikacji [14, 30, 64]. Wiele uwagi w dotychczasowych badaniach poświęcono błonie komórkowej psychrofilii, zwłaszcza jej właściwościom fizycznym, za które w największym stopniu odpowiadają kwasy tłuszczowe. Wzmocniona lepkość błon psychrofilii powiązana jest ze zwiększoną ilością *cis*-nienasyconych oraz rozgałęzionych kwasów tłuszczowych, które dodatkowo często są metylowane i mają skrócony łańcuch główny [71]. Pozwala to regulować płynność błony komórkowej (dwuwarstwa lipidowa pozostaje w niskiej temperaturze luźniej upakowana) i utrzymać transport różnych substancji na odpowiednim poziomie. Pewne charakterystyczne cechy wykazują również białka enzymatyczne psychrofilnych organizmów. Ich wspólną właściwością jest zachowanie aktywności katalitycznej w niskich temperaturach, z jednoczesną niską stabilnością w zmieniającym się zakresie temperatur. Aby enzymy komórkowe mogły być aktywne w niskich temperaturach muszą ulec określonym modyfikacjom polegającym na: zmniejszeniu liczby grup hydrofobowych i wiązań wodorowych, czy zwiększeniu ilości obdarzonych ładunkiem grup powierzchniowych oraz liczby polarnych pętli powierzchniowych. Zauważa się w nich również niską zawartość argininy i proliny. Wszystkie te zmiany prowadzą do zwiększenia elastyczności cząsteczki białka, co pozwala na zachowanie jego aktywności [64]. Kolejnym przystosowaniem psychrofilnych organizmów jest wytwarzanie białek chroniących przed zamrażaniem oraz białek szoku zimna, a także charakterystycznych krioprotektantów – ekstremolitów. Białka chroniące przed zamrażaniem są zdolne do wiązania powstających w komórce kryształków lodu i zapobieganie ich powiększania co mogłoby doprowadzić do zniszczenia komórki. Białka szoku zimna kontrolują prawidłowy przebieg kluczowych procesów w komórce takich jak transkrypcja czy translacja (stabilizują rybosomy, mRNA). Krioprotektanty (ekstremolity) – ektoina, karnityna, trehaloza, a nawet polisacharydy zewnątrzkomórkowe, prawdopodobnie chronią między innymi przed agregacją i denaturacją białek [28, 51, 63].

2.2. Termofile

Termofile to organizmy, których optymalna temperatura wzrostu wynosi ponad 50°C. Grupę tę można podzielić na trzy klasy: termofile ($T_{opt} \geq 50^\circ\text{C}$, $T_{max} \geq 60^\circ\text{C}$), ekstremalne termofile ($T_{min} \geq 35^\circ\text{C}$, $T_{opt} \geq 65^\circ\text{C}$, $T_{max} < 85^\circ\text{C}$) i hipertermofile ($T_{min} \geq 60^\circ\text{C}$, $T_{opt} \geq 80^\circ\text{C}$, $T_{max} \geq 85^\circ\text{C}$). Dodatkowo wyróżnia się organizmy termotolerancyjne,

zdolne do przeżycia w maksymalnej temperaturze 60°C, ale charakteryzujące się optymalną temperaturę wzrostu poniżej 50°C [53]. Obecnie uznaje się, że 122°C jest maksymalną temperaturą przeżycia hipertermofili. W takiej maksymalnej temperaturze wzrasta i rozwija się archeon *Methanopyrus kandlerii* [92].

Termofile zamieszkują środowiska, w których wysokie temperatury są skutkiem aktywności wulkanicznej, uwalniania wód geotermalnych lub nawet ogrzewania słońcem. Przykładem takich naturalnych środowisk mogą być gorące źródła, występujące na niemal wszystkich kontynentach, np. w Parku Narodowym Yellowstone, na Kamczatce, Nowej Zelandii, Islandii. Kolejnym źródłem izolacji termofili są kominy hydrotermalne na dnie oceanicznym, gdzie temperatura wody przy podwyższonym ciśnieniu dochodzi do ponad 100°C. Termofile bytują również w gorących, ale sztucznie stworzonych środowiskach, takich jak: przyzmy kompostowe, hałdy węgla kamiennego oraz rurociągi z gorącą wodą [84, 92].

Do hipertermofili należą przede wszystkim archeony z następujących rodzin: *Archeoglobaceae*, *Desulfurococcaceae*, *Methanocaldococcaceae*, *Methanopyraceae*, *Methanothermaceae*, *Pyrodictiaceae*, *Sulfolobaceae*, *Thermococcaceae*, *Thermofilaceae*, *Thermoproteaceae* oraz kilka gatunków bakterii z rodzin *Thermotogaceae* i *Aquificaceae* [92]. Do najbardziej znanych przykładów należą mikroorganizmy z rodzajów: *Archeoglobus* (*A. fulgidus*), *Thermoproteus* (*T. tenax*), *Pyrococcus* (*P. furiosus*), *Aeropyrum* (*A. pernix*), *Thermococcus* (*T. kodakarensis*), *Desulfurococcus* (*D. kamchatkensis*), *Sulfolobus* (*S. solfataricus*), *Methanothermus* (*M. fervidus*), *Methanopyrus* (*M. kandleri*). Ekstremalnie termofile i umiarkowane termofile wykazują większą bioróżnorodność. Ekstremalnie termofilnymi bakteriami są: beztlenowce *Thermodesulfobacterium commune*, *Ammonifex degensii*, tlenowce: *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermus thermophilus*. Do umiarkowanie termofilnych mikroorganizmów należą np. bakterie (*Bacillus caldolyticus*), archeony (*Thermoplasma acidophilum*), niektóre grzyby (*Rhizomucor miehei*, *Chaetomium thermophile*, *Phanerochaete chrysosporium* i *Acremonium alabamensis*), a także glony (np. *Cyanidium caldarium*) i pierwotniaki (np. *Naegleria fowleri*) [74].

Oddziaływanie wysokiej temperatury spowodowało wykształcenie przez termofile szeregu przystosowań na poziomie komórkowym i molekularnym. Podstawowymi strukturami wymagającymi ochrony przed denaturacją pod wpływem wysokiej temperatury są białka i kwasy nukleinowe. Stabilizacja białek zapewniona jest przez wytworzenie w cząsteczkach między innymi dodatkowych wiązań i oddziaływań w postaci mostków di-siarczkowych i wiązań wodorowych. W białkach termofili obserwuje się również zmniejszoną liczbę aminokwasów termolabilnych oraz wrażliwych na deaminację i oksydację (takich jak: Met, Gly, Asn, Ser i Thr).

Łańcuchy polipeptydowe termofili zawierają zaś więcej: Ile, Arg, Pro, Lys, Tyr i Glu. Białka termofili są bardziej zwarte i sztywne dzięki zmniejszeniu liczby i wielkości pętli peptydowych na powierzchni cząsteczki, większemu upakowaniu i ograniczeniu wolnych przestrzeni, obniżeniu hydrofilowości, zwiększeniu hydrofobowości rdzenia oraz podwyższeniu punktu izoelektrycznego cząsteczki białka. Taka struktura zapewnia zachowanie aktywności białek i enzymów w wyższej temperaturze. Kolejnym przystosowaniem termofili jest wytwarzanie i gromadzenie w komórce substancji zwiększających termostabilność, takich jak różnego rodzaju związki organiczne, sole i białka stabilizujące. Do najważniejszych białek stabilizujących termofili należą białka szoku termicznego (HSPs – heat shock proteins) [84, 87, 97]. Termofile wykształciły również szereg przystosowań chroniących kwasy nukleinowe. Zaobserwowano zwiększenie ilości stabilizujących wiązań wodorowych. W przypadku rRNA i tRNA termofili wykazano zależność polegającą na zwiększeniu liczby par zasad G-C, wraz ze wzrostem optymalnej temperatury wzrostu. Innymi przystosowaniami są: występowanie określonych kombinacji dinukleotydów w DNA oraz ekspresja charakterystycznych enzymów, np. termofilnej odwrotnej gyrazy [97]. Wysoka temperatura ma również wpływ na wzrost płynności błon komórkowych. Aby zachować integralność, u termofili zawierają one więcej nasyconych i prostych kwasów tłuszczowych [68]. Dodatkowo lipidy w błonach komórkowych tych drobnoustrojów są połączone wiązaniem eterowym ze ścianą komórkową. U archeonów termofilnych może występować miejscami jednowarstwowa błona komórkowa, zamiast dwuwarstwowej. Taka budowa znacznie podnosi termooporność komórki i wpływa na ochronę białkowego wnętrza w porównaniu z komórkami, w których błonach znajdują się kwasy tłuszczowe typowe dla mezofili [30]. Dodatkowo niektóre archeony np. *Methanococcus jannaschii* posiadają parakrystaliczną warstwę powierzchniową (S-layer) białkową lub glikoproteinową [74].

2.3. Acidofile

Za organizmy acidofilne uznaje się takie, które optymalny wzrost wykazują w pH pomiędzy 2 i 4 [3, 13]. Podobnie jak inne grupy ekstremofili nie jest to grupa jednorodna jeśli chodzi o zakres pH, w którym żyją. Stąd w literaturze wyróżniane są ekstremalne acidofile (wykazujące optymalny wzrost w pH 3 lub niższym) i organizmy acidotolerancyjne (tolerują niskie pH, ale nie wykazują w nim wzrostu optymalnego).

Acidofile zamieszkują środowiska o drastycznie niskim pH i są to zarówno środowiska naturalne, jak i powstałe na skutek określonej działalności człowieka. Izolowano je z rejonów morskich kominów hydrotermalnych, gorących źródeł, gejzerów, fumaroli a także

solfatar, czyli ze środowisk, w których niskiemu pH towarzyszy jednocześnie wysoka temperatura. Niskie pH wspomnianych środowisk wynika z różnorodnych procesów naturalnych. Zaliczyć do nich można aktywność wulkaniczną (obecność magmy blisko pod powierzchnią – co ma miejsce np. w gejzerach, solfatarach), ale także aktywność metaboliczną wielu organizmów prokariotycznych (produkcja kwasów organicznych, zdolność utleniania siarki elementarnej). Jednak powstawanie środowisk silnie zakwaszonych ma także czasem nierozwalny związek z aktywnością człowieka. Do środowisk tych zaliczyć można np. kwaśne wody odpływowe kopalni różnych minerałów, czy wody spływające z hałd węgla kamiennego. Niestety, wody takie mogą być źródłem zanieczyszczenia rzek, jezior oraz otaczających gleb. Niskie pH wspomnianych środowisk sprzyja rozwojowi acidofili, które często na skutek aktywności metabolicznej powodują dalsze zakwaszanie takich miejsc. Wiąże się to z występowaniem w omawianych rejonach różnego rodzaju metali, które bardzo często występują w postaci nierozpuszczalnych siarczków. Zdolność utleniania siarczków przez drobnoustroje powoduje przeprowadzenie jonów metali w formę, z której łatwo te metale odzyskać (biolugowanie), ale jednocześnie doprowadza do powstawania utlenionej formy siarki (SO_4^{2-}), co w obecności wody powoduje powstawanie kwasu siarkowego. Zanieczyszczenie wód powierzchniowych (jezior, rzek) kwaśnymi odpływami zawierającymi jony metali niesie ze sobą dwie poważne konsekwencje dla tych ekosystemów: po pierwsze zmianę pH środowiska na tak niskie, że jest ono szkodliwe dla większości żyjących tam organizmów i po drugie: występowanie metali (w tym metali ciężkich) w stężeniach osiagających wartości toksyczne [3, 13, 77].

Acidofile są grupą różnorodną, zarówno pod względem filogenetycznym (archeony, bakterie, eukariota), jak i reprezentowanego przez nie typu troficznego. Tam gdzie dostępne są organiczne związki węgla rozwijają się heterotrofy. Acidofile korzystają z różnorodnych akceptorów elektronów, a także energii zarówno chemicznej jak i słonecznej. Przykładem acidofilnych organizmów eukariotycznych są glony: *Dunaliella acidophila*, *Cyanidium caldarium*, *Chlamydomonas acidophila*, *Galdieria sulphuraria*. Należą tu także heterotroficzne grzyby i drożdże (*Trichosporon cerebriae*, *Acontium cylatium*, niektóre gatunki z rodzajów *Rhodotorula* i *Candida*), a nawet pierwotniaki (z rodzajów *Cinetochilium*, *Vahlkampfia*) [13, 58]. Prokariotyczne acidofile reprezentują obie domeny mikroorganizmów. Dobrze poznaną grupę stanowią archeony, w tym takie rodzaje drobnoustrojów jak: *Acidianus* (*A. brierleyi*, *A. infernus*), *Metallosphaera* (*M. sedula*, *M. prunae*), *Sulfurococcus* (*S. yellowstonii*, *S. mirabilis*), *Sulfolobus* (*S. shibatae*, *S. metallicus*, *S. yangmingensis*). Wszystkie wymienione organizmy są jednocześnie chemolitoautotrofami, pozyskują one

energię z utleniania związków żelaza lub siarki. W grupie tej występują oczywiście także heterotrofy: *Picrophilus* (*P. oshimae*, *P. torridus*), *Thermoplasma* (*T. acidophilum*, *T. volcanium*). Niektóre z acidofilnych archeonów (np. *Ferroplasma acidiphilum*) są organizmami mikсотroficznymi [13, 76, 77]. Omawianą grupę ekstremofili reprezentują także bakterie. Podobnie jak archeony wykazują one zróżnicowane możliwości metaboliczne. Typowymi przedstawicielami chemolitoautotroficznych bakterii środowisk kwaśnych są: *Acidithiobacillus* (*A. albertensis*, *A. caldus*, *A. ferrooxidans*), *Thiobacillus* (*T. prosperus*), *Leptospirillum* (*L. ferrooxidans*, *L. thermoferrooxidans*). Do heterotrofów należą: *Ferrimicrobium acidiphilum*, *Acidiphilium* (*A. cryptum*, *A. angustum*, *A. facilis*, *A. rubrum*), *Alicyclobacillus* (*A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*) [32, 40, 93, 94]. Mikсотroficzny typ metabolizmu stwierdzono między innymi u przedstawicieli gatunku *Thiobacillus acidophilus*, *Sulfobacillus acidophilus*, *Acidimicrobium ferrooxidans* [16, 57, 66].

Niskie pH, w którym egzystują acidofile powoduje konieczność wykształcenia odpowiednich przystosowań, zapobiegających destrukcyjnemu działaniu silnie kwaśnego środowiska na składniki komórkowe (białka czy kwasy nukleinowe). Wykazano, że mimo wysokiego stężenia jonów H^+ na zewnątrz komórki, wewnątrz komórkami acidofile utrzymują prawie zawsze pH na poziomie zbliżonym do neutrofilii (pH 5–7). Wyjątkiem są gatunki z rodzaju *Picrophilus*, u których pH wnętrza komórki wynosi około 4,6 [3]. Stwierdzono, że ciągłemu napływowi jonów H^+ do komórek acidofili zapobiega wysoce nieprzepuszczalna błona komórkowa, czy też zmiana ładunku wewnątrz komórki na silnie dodatni, ale także wzmożona synteza czynników odpowiedzialnych za aktywny transport protonów na zewnątrz. Obniżenie przepuszczalności błony komórkowej przypisuje się zmianom struktury pewnych jej elementów np. w błonie komórkowej acidofilnych archeonów stwierdza się obecność grubej warstwy izoprenoidowej, czy też wiązań tetraeterowych, a nie estrowych w lipidach. Wiązania takie są bardziej stabilne w obecności kwasów w porównaniu z wiązaniami estrowymi [52]. Napływ jonów H^+ jest hamowany także poprzez gromadzenie dodatnio naładowanych jonów wewnątrz komórki. Jak wykazano, są to głównie jony K^+ [83]. Acidofile wykazują także wzmożoną ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę transporterów protonów. Usuwają one protony, które napłynęły do komórki z powrotem na zewnątrz. Gradient pH między wnętrzem komórki a środowiskiem stanowi podstawową siłę napędową komórki, ponieważ dzięki systemowi pomp protonowych powodują wydajne działanie ATPaz i produkcję dużej ilości energii.

Zaobserwowano również zwiększoną liczbę genów związanych z naprawą uszkodzeń DNA i białek. Przypuszcza się, że ważną rolę w przystosowaniu do życia

w niskim pH może odgrywać obecność żelaza związanego z białkami komórkowymi. Wykazano, że np. *F. acidiphilum* wytwarza zwiększoną ilość białek wiążących właśnie żelazo, a usunięcie jonów tego metalu z cząsteczki proteiny skutkuje utratą odpowiedniej struktury i funkcji białka [3].

2.4. Alkalifile

Czynnikiem środowiskowym, który decyduje o przynależności drobnoustrojów do alkalifili jest wysokie pH. Termin „alkalifile” określa organizmy, wykazujące optymalny (lub przynajmniej bardzo dobry) wzrost w pH powyżej 9 i jednocześnie nierosnące lub słabo rosnące w pH obojętnym. Duża część organizmów alkalifilnych to haloalkalifile – wymagają do wzrostu zarówno alkalicznego pH jak i wysokiego stężenia soli (halofile zostaną omówione szerzej w kolejnym rozdziale). W literaturze opisywane są także organizmy uznawane za alkalitolerancyjne, czyli takie które mają zdolność wzrostu w pH około 9, ale optymalne dla nich warunki to jednak te typowe dla neutrofilii [13, 35, 56].

Oprócz środowisk o podwyższonym pH alkalifile izolowane były także z próbek gleby, w których pH zbliżone jest do obojętnego, a nawet z gleb kwaśnych. Tłumaczyć to można tworzeniem się w takich miejscach pewnych nisz, w których dochodzi do podwyższenia pH (np. na skutek mikrobiologicznej amonifikacji), co umożliwia rozwój alkalifili. Mikroflora alkalifilna znajdowana jest także w próbkach kału pochodzących od niektórych owadów np. termitów czy ćmy brudnicy nieparki [9]. Środowiska typowo alkaliczne naturalnego pochodzenia mogą mieć dwojaki charakter. Albo cechują się wysoką zawartością jonów Ca^{2+} albo niewielkim ich stężeniem lub nawet brakiem. Jeziora, których wody są bogate w Ca^{2+} i osiągają pH nawet powyżej 11 znajdują się między innymi w Turcji, w Kalifornii, w krajach byłej Jugosławii. Alkaliczny odczyn wód tych jezior wynika z powstającego w nich $Ca(OH)_2$. Z kolei jeziora i pustynie sodowe zawierają bardzo niewielkie ilości jonów wapnia i magnezu, za to wysokie stężenia związków zawierających Na^+ (chlorki, dwuwęglany i węglany, a także siarczany). Są to środowiska powstające w rejonach suchych i gorących, gdzie gwałtowne odparowywanie wody powoduje koncentrację określonych związków [73, 79]. Oczywiście wielkie znaczenie mają tu także uwarunkowania geochemiczne. Otaczające gleby, skały zawierają duże ilości związków sodu, które wymywane są przez wody, stąd sodowy charakter jezior. Do tego typu jezior zaliczyć można między innymi: Wadi Natrun w Egipcie, Mono w Kalifornii, Magadi czy Logipi w Kenii. Dużo mniejsze i płytsze, ale także o charakterze sodowym są też jeziora na Syberii, np. na stepie w okolicach Kułundy. W każdym z wymienionych środowisk pH waha się w granicach

Główne grupy ekstremofilii i środowiska ich występowania

Kryteria podziału	Przykłady	Środowiska
Psychrofile $T_{opt} < 15^{\circ}\text{C}$ $T_{max} < 25^{\circ}\text{C}$ Psychrotolerancyjne $T_{min} < 5^{\circ}\text{C}$ $T_{opt} = 20\text{--}25^{\circ}\text{C}$	Gram-ujemne: <i>Psychrobacter pacificensis</i> , <i>Psychromonas antarctica</i> , <i>Cellulophaga baltica</i> , <i>Marinobacter psychrophilus</i> , <i>Maribacter antarcticus</i> Gram-dodatnie: <i>Micrococcus antarcticus</i> , <i>Bacillus marinus</i> , <i>Clostridium vincentii</i> , <i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> Archeony: <i>Methanococoides burtonii</i> , <i>Methanogenium frigidum</i> , Grzyby: <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Aspergillus</i> Drożdże: <i>Candida</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Rhodotorula</i> Glony: <i>Chlamydomonas nivalis</i>	Lody Antarktyki i Arktyki, lodowce, wieczne zmarzliny, stałe zimne wody regionów polarnych, głębiny oceanicznych i morskich, wodonośne warstwy skał, regiony wysokogórskie, jaskinie, zbiorniki z systemami chłodzenia.
Termofile $T_{opt} \geq 50^{\circ}\text{C}$ $T_{max} \geq 60^{\circ}\text{C}$ Ekstremalne termofile $T_{min} \geq 35^{\circ}\text{C}$ $T_{opt} \geq 65^{\circ}\text{C}$ $T_{max} < 85^{\circ}\text{C}$ Hipertermofile $T_{min} \geq 60^{\circ}\text{C}$ $T_{opt} \geq 80^{\circ}\text{C}$ $T_{max} \geq 85^{\circ}\text{C}$	Termofile: Bakterie: <i>Bacillus caldolyticus</i> Archeony: <i>Thermoplasma acidophilum</i> Niektóre grzyby: <i>Rhizomucor miehei</i> Glony: <i>Cyanidium caldarium</i> Pierwotniaki: <i>Naegleria fowleri</i> Ekstremalne termofile: <i>Thermodesulfobacterium commune</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Thermus thermophilus</i> . Hipertermofile: <i>Archeoglobus fulgidus</i> , <i>Pyrococcus furiosus</i> , <i>Thermococcus kodakarensis</i> , <i>Desulfurococcus kamchatkensis</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i> , <i>Methanopyrus kandleri</i>	Wody podgrzewane hydrotermalnie, gorące źródła, kominy hydrotermalne na dnie oceanicznym, przyzmy kompostowe, hałdy węgla kamiennego, rurociągi z gorącą wodą.
Acidofile: $\text{pH}_{opt} = 2\text{--}4$ Ekstremalne acidofile $\text{pH} \leq 3$ Acidotolerancyjne $\text{pH}_{min} < 3$, $\text{pH}_{opt} > 4$	Glony: <i>Dunaliella acidophila</i> , Grzyby i drożdże: <i>Trichosporon cerebriae</i> , <i>Candida</i> sp. Pierwotniaki z rodzaju <i>Cinetochilium</i> , <i>Vahlkampfia</i> , Archeony: <i>Sulfolobus shibatae</i> , <i>Picrophilus oshimae</i> , <i>Thermoplasma acidophilum</i> , Bakterie: <i>Acidithiobacillus albertensis</i> , <i>Leptospirillum ferroxidans</i>	Kominy hydrotermalne, gorące źródła, gejzery, fumarole solfatary, kwaśne wody odpływowe kopalni różnych minerałów, wody spływające z hałd węgla kamiennego.
Alkalifile obligatoryjne $\text{pH}_{opt} > 9$ $\text{pH}_{min} > 7$ Alkalitolerancyjne $\text{pH}_{max} < 9$ $\text{pH}_{opt} \sim 7$	Cyjanobakterie: <i>Nostoc calcicola</i> , Bakterie: <i>Anaerobranca horikoshii</i> , <i>Amphibacillus xylanum</i> , Promieniowce: <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> Archeony: <i>Haloerubrum vacuolatum</i> , <i>Natrialba magadii</i> , <i>Natronobacterium</i> , <i>Natronococcus</i> , <i>Natronorubrum</i> , <i>Methanohalophilus</i> , <i>Methanosalsus</i>	Gleba, jelita owadów, np. brudnicy nieparki, jeziora bogate w Ca^{2+} , jeziora i pustynie sodowe, wody, zakładów produkujących papier, detergenty, odpady z garbarni.
Halotolerancyjne tolerują podwyższone stężenie soli Halofile umiarkowane 0,5–2,5 M soli Ekstremalne halofile 2,5 M – 5,2 M soli	Glony: <i>Dunaliella salina</i> Grzyby: <i>Trimmatostroma salinum</i> , Pierwotniaki: <i>Pleurostomum flabellatum</i> , Krewetki: <i>Artemia salina</i> , Archeony: <i>Halobacterium salinarum</i> , <i>Haloferax mediterranei</i> , <i>Haloarcula marismortui</i> , <i>Natronococcus occultus</i> , <i>Methanohalobium evestigatum</i> , <i>Methanocalculus halotolerans</i> Bakterie: <i>Thermohalobacter berrensii</i> , <i>Halocella cellulositytica</i> , <i>Desulfobacter halotolerans</i>	Saliny (np. na pustyni Atakama w Chile), Morze Martwe, saliny w Huelva u wybrzeży Hiszpanii, jezioro Assal w Dżibuti w Afryce, antarktyczne jeziora w pobliżu Wzgórz Vestfold, lody polarne, żywność konserwowana solą, pustynne rośliny i zwierzęta.
Piezofile obligatoryjne $p_h = 10\text{--}50$ MPa Piezofile ekstremalne $p_h > 50$ MPa Piezotolerancyjne optimum $p_h = 0,1$ MPa maksymalne $p_h = 10\text{--}50$ MPa	Psychropiezofile: <i>Colwellia hadaliensis</i> , <i>Moritella yayanosii</i> , <i>Shewanella violacea</i> Termopiezofilne: <i>Marinitoga piezophila</i> , <i>Desulfovibrio hydrothermalis</i> , <i>Piezobacter thermophilus</i> Promieniowce: <i>Demacoccus abyssii</i> , Archeony: <i>Thermococcus barophilus</i> , <i>Pyrococcus abyssii</i> , <i>Methanopyrus kandleri</i>	Wody oceaniczne i morskie na znacznych głębokościach, np. Rów Mariański, syberyjskie jezioro Bajkał antarktyczne podlodowe jezioro Wostok.

9.5–11, czasem osiągając wartość nawet 12. Oprócz tych naturalnych środowisk alkalifile znajdują odpowiednie warunki do rozwoju w miejscach, które powstają wskutek procesów prowadzonych przez człowieka: w wodach odpływających z zakładów produkujących papier, detergenty, z garbarni [13, 80].

Alkalifile to w zdecydowanej większości organizmy prokariotyczne. Ich metaboliczna różnorodność jest imponująca. Bardzo wiele z nich to chemolitotrofy, odgrywające ogromne znaczenie w obiegu pierwiastków w przyrodzie. Znajdziemy tu zarówno autotrofy jak i heterotrofy. Są to i tlenowce i beztlenowce, niektóre to

Tabela II

Przykłady praktycznego wykorzystania ekstremofili

	Zastosowania	Piśmien- nictwo
Psychrofile	Enzymy: produkcja detergentów (lipazy, proteazy, amylazy, celulazy), przemysł garbarski – usuwanie włosów i sierści (keratynazy, proteazy), przemysł spożywczy – ekstrakcja i klarowanie soków, poprawa walorów smakowych, uzyskiwanie produktów piekarniczych, (pektynazy, proteazy, glikozydazy), czyszczenie szkieł kontaktowych (proteazy), do produkcji karmy dla zwierząt, w browarnictwie i winiarstwie, bioremediacja środowisk skażonych olejami, węglowodorami i innymi zanieczyszczeniami	[14, 17, 30, 42, 56]
Termofile	Termostabilne enzymy – PCR Proteazy: przemysł farmaceutyczny, spożywczy, tekstylny, garbarstwo, produkcja detergentów Ksylanazy: wybielanie papieru Chitynazy: modyfikacja chityny Lipazy i esterazy: produkcja detergentów i reakcje stereo-specyficzne Keratynazy: usuwanie odpadów z przemysłu mięsnego i drobiarskiego Usuwanie toksycznych zanieczyszczeń Biorafinacja: produkcja biowodoru i biopaliw oraz rozkład biomasy o dużej zawartości celulozy i hemiceluloz	[25, 48, 84, 90]
Acidofile	Biologowanie rud zawierających siarczki wielu metali Bioremediacja kwaśnych wód kopalnianych Oczyszczanie gazu z lotnych związków siarki Enzymy zewnątrzkomórkowe: amylazy, glukoamylazy, α -glukozydazy, celulazy, ksylanazy, enzymy proteolityczne	[12, 13, 45, 77]
Alkalifile	Enzymy zewnątrzkomórkowe: Lipazy, proteazy, amylazy, celulazy: dodatek do detergentów; proteazy: dodatek do roztworów czyszczących szkła kontaktowe, produkcja serów i mięs; celulazy: produkcja tkanin; pektynazy: produkcja papieru, obróbka włókien roślinnych dla przemysłu tekstylnego; ksylanazy: wybielanie w produkcji papieru, wybielający dodatek do detergentów Cyjanobakterie: suplement diety Neutralizacja silnie alkalicznych ścieków pochodzących z różnych gałęzi przemysłu (np. z produkcji barwników czy przemysłu tekstylnego używającego tych barwników), rozkład fenolu, pirenu Neutralizacja ścieków silnie zasadowych zawierających duże ilości chloru Polepszanie wytrzymałości zaprawy murarskiej	[30, 34, 62, 67, 73]
Halofile	Osmolity: przemysł farmaceutyczny, spożywczy, kosmetyczny (np. w kremach nawilżających – chroni przed efektami promieniowania UV-A, przez co przeciwdziała starzeniu się skóry) Uzyskiwanie naturalnego β -karotenu, jako suplementu diety, czynnika koloryzującego i antyoksydanta w produktach kosmetycznych, spożywczych i farmaceutycznych Nukleaza H: produkcja kwasu 5'-guanilowego, używanego jako składnik nadający zapach	[36, 61, 65, 72, 75]
Piezofile	Wykorzystywane jest działanie wysokiego ciśnienia na drobnoustroje, np. do dezynfekcji wysokim ciśnieniem	[23]

metanogeny, inne należą do bakterii biorących udział w obiegu siarki. Do grupy autotrofów alkalifilnych należą niektóre cyjanobakterie, np. z rodzajów: *Anabaenopsis*, *Cyanospira*, *Spirulina*, *Synechocystis*, *Nostoc* (*N. calcicola*). Bakterie heterotroficzne reprezentowane są np. przez: tlenowce z rodzaju *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, a także promieniowce (*Streptomyces*, *Nocardia*), beztlenowce: *Clostridium* (*C. paradoxum*), *Anaerobranca* (*A. horikoshii*), *Amphibacillus* (*A. xylanus*), *Tindallia* (*T. magadii*). Niektóre beztlenowe bakterie alkalifilne to jednocześnie termofile np. *Thermobrachium celere*. W pewnych ekosystemach szczególne znaczenie odgrywają alkalifilne bakterie utleniające związki siarki jak np.: *Thioalkalimicrobium* sp., *Thioalkalivibrio* sp., *Thioalkalispira* sp. oraz bakterie redukujące siarkę w siarczanach: *Desulfonatronovibrio* sp.,

Desulfonatronum sp.. Alkalifilne archeony obejmują przedstawicieli np. rodzajów: *Halorubrum* (*H. vacuolatum*), *Natrialba* (*N. magadii*), *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronorubrum* czy też *Methanohalophilus* lub *Methanosalsus*. Trzeba pamiętać, że wiele z wymienionych wcześniej organizmów to jednocześnie halofile, dlatego często obie grupy: alkali- i halofile omawiane są łącznie, a przedstawiciele poszczególnych grup wymieniani są jako przykłady i jednej i drugiej [13, 15, 20, 27, 35, 79].

Podobnie jak acidofile, organizmy alkalifilne utrzymują pH wnętrza komórki na poziomie zbliżonym do neutralnego. Jest to możliwe dzięki aktywności odpowiedniego systemu transportu jonów. Gradient pH jest utrzymywany wskutek aktywnego antyportu Na^+/H^+ , polegającego na stałym usuwaniu jonu Na^+ w zamian

za pobierany proton. Obecność jonów sodu w środowisku wzrostu alkalifili jest konieczna do sprawnego funkcjonowania takiej wymiany. Oprócz wspomnianych mechanizmów, na regulację wewnątrzkomórkowego pH może mieć wpływ struktura ściany komórkowej alkalifili. Wykazano bowiem, że niektóre z nich posiadają w ścianie komórkowej dodatkowo, ujemnie naładowane polimery. Są to np. reszty kwasów: tejchuronowego, czy asparaginowego oraz tejchuronoptydy. Dzięki ich obecności możliwe jest wiązanie dodatnio naładowanych jonów, zwłaszcza Na^+ [46, 47].

2.5. Halofile

Halofile to organizmy środowisk słonych. Reprezentowane są zarówno przez prokariota jak i przez organizmy eukariotyczne, o zróżnicowanych wymaganiach co do stężenia soli (przeważnie NaCl) w środowisku ich wzrostu. Klasyfikacja tej grupy bywa niejednoznaczna, najczęściej uznawany jest podział podawany przez Kushnera [49]. Wyróżniane są w nim: organizmy halotolerancyjne (nie wymagają wysokiego stężenia soli do wzrostu, jednak w środowisku o podwyższonym ich stężeniu rosną dobrze), halofile umiarkowane (rosnące w zakresie od 0,5 do 2,5 M NaCl) i ekstremalne halofile (2,5–5,2 M). Kushner wyodrębnia jeszcze tzw. graniczne („borderline”) halofile czyli takie, które rosną w przedziale stężeń: 1,5–4 M NaCl [1, 44, 49, 91]. Nieco inny, spotykany również w literaturze podział omawianej grupy, opiera się na definicji Larsena. I tak, wśród obligatoryjnych halofili wyróżnia się drobnoustroje: w małym stopniu halofilne („slight”) – rosną w przedziale 0,34–0,85 M NaCl , umiarkowanie halofilne (0,85–3,4 M) i ekstremalnie halofilne (3,4–5,1 M) [6, 13]. Jednoznaczny podział organizmów halofilnych w obrębie grupy często utrudnia dodatkowo fakt, iż zakres tolerancji na dane stężenie soli jest bezpośrednio związany z innymi parametrami wpływającymi na wzrost takimi jak: rodzaj podłoża, pH czy temperatura.

Wspólną cechą środowisk życia halofili jest zwiększona zawartość soli. Jednak rodzaj tych soli, pH, temperatura, zawartość składników odżywczych oraz inne czynniki różnią się często od siebie drastycznie w poszczególnych środowiskach, co pozwala na zasiedlanie ich przez bardzo zróżnicowane społeczności halofili. Zawartość i rodzaj soli zależy przede wszystkim od rodzaju wód zasilających dany obszar (morskich albo śródlądowych). Słone środowiska śródlądowe zasilane podziemnymi solankami odznaczają się najczęściej wyższą zawartością jonów Mg^{+2} i Ca^{+2} . Ich przykładem mogą być nasłonecznione saliny (sól koncentruje się tu na skutek parowania wody) np. salina na pustyni Atakama w Chile czy salina La Mala w Hiszpanii. Do tego typu środowisk zaliczane są także wody Morza Mar-

twego. Środowiska słone o składzie wody podobnym do wody morskiej to: saliny, z których odzyskuje się sól np. Alicante, Huelva u wybrzeży Hiszpanii, jezioro Assal w Dżibuti w Afryce, a także antarktyczne jeziora w pobliżu Wzgórz Vestfold, lody polarne. Niektóre ze słonych jezior mają pH obojętne jak np. Wielkie Jezioro Słone oraz Morze Martwe. Jednak jak wspomniano w poprzednim rozdziale, wiele zasolonych jezior to jeziora typowo alkaliczne – rozwijające się tam mikroorganizmy to typowe poliekstremofile (haloalkalifile). Organizmy halofilne i halotolerancyjne izolowano także z żywności konserwowanej solą (np. solonych mięs, ryb), a także pustynnych roślin i zwierząt (np. z jam nosowych iguan). Istnieją także doniesienia o izolacji umiarkowanych halofili z wód wokół pól naftowych na Morzu Północnym i w Oklahomie [13, 19, 91].

Halofile są bardzo heterogenną grupą. Organizmy prokariotyczne reprezentują i bakterie i archeony, tlenowe i beztlenowe, termo- mezo- i psychrofilne. Niektóre są fototrofami i stanowią o produktywności określonych ekosystemów. W omówionych wcześniej środowiskach rozwijają się także, czasami bardzo licznie powodując nawet zakwity, eukariotyczne glony. Wśród tych ostatnich do najlepiej poznanych należą: *Dunaliella* (*D. salina*), *Asteromonas* (*A. gracilis*). Nie są to jedyne halofilne eukarionty. Właściwościami takimi cechują się także niektóre grzyby np. *Trimmatostroma salinom* i *ortaea werneckii* [31, 96]. W salinach i stawach solnych żyją także pierwotniaki (*Pleurostomum flabellatum*), a nawet krewetki (*Artemia salina*) [60].

Środowiska o najwyższym stopniu zasolenia zdominowane są głównie przez halofilne archeony, mocno zróżnicowane pod względem metabolicznym. Heterotroficznie odżywiają się one zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Tlenowce to przedstawiciele klasy *Halobacteria*, rodziny *Halobacteriaceae* (*Euryarchaeota*), przeważnie neutrofile chociaż niektóre gatunki są także alkalofilne lub organizmami umiarkowanie acidofilnymi [1]. Większość gatunków z tej rodziny uznawana jest za halofile ekstremalne [60]. Cechą charakterystyczną przedstawicieli tej grupy jest wytwarzanie czerwonych barwników karotenoidowych, które powodują np. intensywne czerwone zabarwienie wód, w których się rozwijają. Do chwili obecnej opisano już ponad 130 gatunków w prawie 40 rodzajach rodziny *Halobacteriaceae*. Jako przykłady należy wymienić przedstawicieli rodzajów: *Halobacterium* (*H. salinarum*), *Haloferax* (*H. mediterranei*), *Haloarcula* (*H. marismortui*), *Halosimplex* (*H. carlsbadense*), *Haloquadratum* (*H. walsbyi*), *Natronococcus* (*N. occultus*), *Haladaptatus* (*H. paucihalophilus*), *Halococcus* (*H. saccharolyticus*), *Halorhabdus* (*H. utahensis*), *Haloterrigena* (*H. turkmenica*), *Halorubrum* (*H. salsolis*), *Natronorubrum* (*N. tibetense*), *Natrialba* (*N. magadi*). Jako źródło węgla drobnoustroje te wykorzystują głównie aminokwasy

i węglowodany, ale niektóre z nich mają także zdolność rozkładu alifatycznych i aromatycznych węglowodórów [1, 8]. Bardzo ciekawą cechą wymienionego wcześniej gatunku *H. salinarum* jest zdolność wykorzystywania energii świetlnej i przetwarzania jej w energię w postaci ATP mimo prowadzenia heterotroficznego trybu życia. Jest to możliwe dzięki wytwarzaniu specjalnego białka – bakteriorodopsyny, zawierającej retinal, dzięki któremu wychwytywana jest część promieniowania i poprzez błonę przenoszone są protony. Dzięki powstającej różnicy potencjału dochodzi następnie do syntezy ATP [10].

Niektóre z wymienionych wyżej archeonów przy braku tlenu, ale w obecności innych akceptorów elektronów, mogą prowadzić metabolizm beztlenowy. Z kolei ściśle beztlenowe halofilne archeony są metanogenami. Należą one do rodziny *Methanosarcinaceae* i jako substrat w procesie metanogenezy wykorzystują trimetyloaminę. Znanych jest obecnie około 30 gatunków halofilnych metanogenów (np. *Methanohalobium evestigatum*, *Methanohalophilus portucalensis*, *Methanosalsum zhilinae*, *Methanocalculus halotolerans*) [1].

Halofilne lub halotolerancyjne beztlenowe bakterie odżywiają się zarówno heterotroficznie jak i autotroficznie. Dużą grupę beztlenowych halofili stanowią bakterie fermentujące. W zdecydowanej większości należą one do rzędu *Halanaerobiales* (*Firmicutes*). Tylko nieliczne wyjątki na podstawie analizy filogenetycznego pokrewieństwa zostały umieszczone w rzędzie *Clostridiales* (*Thermohalobacter berrensensis*) i *Natranaerobiales* (*Natranaerobius thermophilus* – ekstremalny halofil). Przedstawicielami rzędu *Halanaerobiales* są np.: *Halotermotrix* (*H. orenii*), *Halanaerobium* (*H. lacurosei*), *Halocella* (*H. cellulosilytica*), *Halarsenatibacter* (*H. silvermanii*), a także *Halanaerobaculum* (*H. tunisiense*), *Halobacteroides* (*H. halobius*), *Halonatronum* (*H. saccharophilum*), *Acetohalobium* (*A. arabaticum*), *Orenia* (*O. marismortui*), *Selenihalobacter* (*S. shrifitii*). Większość wymienionych bakterii to gramujemne, urzęsione pałeczki, umiarkowanie halofilne, za ekstremalne halofile uznawane są: *H. tunisiense*, *A. arabaticum* oraz *H. lacurosei*. [13, 44]. Część halofilnych bakterii beztlenowych ma zdolność redukcji siarczanów i są to przeważnie „słabe” lub umiarkowane halofile. Należą do nich między innymi bakterie z rodzajów: *Desulfobacter* (*D. halotolerans*), *Desulfobacterium* (*D. autotrophicum*), *Desulfocella* (*D. halophila*), *Desulfococcus* (*D. multivorans*), *Desulfohalobium* (*D. retbaense*), *Desulfonema* (*D. magnum*) czy *Desulfovibrio* (*D. halophilus*) [13, 24]. Intensywnie prowadzone badania nad tą grupą, zwłaszcza w ostatnich kilku latach, pozwoliły na wyizolowanie i scharakteryzowanie wielu nowych gatunków. Na szczególną uwagę zasługują bakterie izolowane ze słonych jezior sodowych takie jak: *Desulfonatronovibrio* (*D. halophilus*), *Desulfonatronum* (*D. lacustre*), *Desulfonatronobacter*

(*D. acidivorans*), *Desulfobulbus* (*D. alkaliphilus*) [81, 82]. W beztlenowych, ale jeszcze naświetlonych warstwach słonych wód występują także fotoautotroficzne bakterie – purpurowe i zielone. W zdecydowanej większości są to mikroorganizmy słabo albo umiarkowanie halofilne. Przykładami są takie drobnoustroje jak: *Chromatium* (*C. salexigens*), *Chlorobium* (*C. chlorovibrioides*), *Rhodospirillum* (*R. salinarum*), *Ectothiorhodospira* (*E. vacuolata*), *Thiocapsa* (*T. halophila*). Typowymi zaś ekstremofilami w tej grupie są bakterie należące do rodziny *Ectothiorhodospiraceae* np. *E. halophila* i *E. halochloris*. Izolowane są z solanek niemorskiego pochodzenia, zwłaszcza o alkalicznym pH [59].

Halofile są reprezentowane także przez bakterie tlenowe. Są to głównie przedstawiciele Gram-ujemnych proteobakterii, rodziny *Halomonadaceae*. Oprócz rodzaju *Halomonas* (*H. elongata*) do wspomnianej rodziny zalicza się także między innymi rodzaje: *Halotelea* (*H. alkalilenta*), *Chromohalobacter* (*C. salexigens*), *Salinicola* (*S. halophilus*), i *Modicisalibacter* (*M. tunisiensis*) [2]. Znane są także halofilne bakterie utleniające związki siarki np. *Thiohalospira* (*T. halophila*) czy *Thiohalobacter* (*T. thiocyanaticus*) [88]. Halofilne bakterie gramodatnie to np.: *Halobacillus* (*H. halophilus*), *Salinicoccus* (*S. albus*), *Marinococcus* (*M. halophilus*), *Bacillus* (*B. halodurans*), *Salimicrobium* (*S. halophilum*) oraz promieniowce: *Salinactinospora* (*S. gingdaonensis*), *Nocardioopsis* (*N. litoralis*), *Actinopolyspora* (*A. xinjiangensis*), *Haloglycoyces* (*H. albus*) [13]. Halofilami są także niektóre cyjanobakterie: *Aphanothece* (*A. halophytica*), *Nodularia* (*N. spumigena*) czy *Oscillatoria* (*O. salina*) [70].

Aby uniknąć lizy, powodowanej różnicą ciśnienia osmotycznego w komórce względem zewnętrznego otoczenia, halofile muszą utrzymywać równie wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie soli. Jednym ze sposobów wyrównywania stężeń jest utrzymywanie wysokiego poziomu K^+ i Cl^- wewnątrz komórki. Mechanizm taki (określany często mianem „sól-wewnątrz”) zidentyfikowano u ekstremalnie halofilnych archeonów z rodziny *Halobacteriaceae* oraz halofilnych bakterii fermentujących. Stwierdzono także, że aby zachować aktywność w takich warunkach, wewnątrzkomórkowe enzymy i białka strukturalne są ujemnie naładowane i mają kwaśny charakter (wiązanie odpowiednich jonów do białka stabilizuje je). Kiedy stężenie soli ulega obniżeniu poniżej odpowiedniego poziomu ww. enzymy tych bakterii ulegają denaturacji i tracą swe właściwości. Drugim sposobem regulacji stężenia soli jest synteza lub pobieranie różnego rodzaju związków organicznych o charakterze cząsteczek osmoregulacyjnych (osmolitów). Ich obecność stwierdza się w komórkach halofilnych glonów (prolina, glicerol, sacharoza), bakterii tlenowych (ektoina, hydroksyektoina, glukozylglicerol, N-acetyloornityna, prolina), a także metanogennych archeonów (glicyna, betaina, β -aminokwasy,

β -glutamina, kwas glutaminowy, acetylo-lizyna). Stabilizują one enzymy, nie ingerując w procesy metabolizmu komórkowego [44, 60].

2.6. Piezofile

Termin „organizmy piezofilne” oznacza organizmy żyjące w środowiskach o wysokich wartościach ciśnienia hydrostatycznego. Początki badań nad piezofilami sięgają lat 50-tych XX wieku. Początkowo organizmy te określano mianem „barofile”, jednak znaczenie etymologiczne słowa „barofile” („baro” – waga) nakazało zmianę nomenklatury na „piezofile” („piezo” – ciśnienie). Podobnie jak we wcześniej omówionych grupach, tak i w tej zaznacza się zróżnicowanie co do zakresu preferowanej wartości ciśnienia. Typowe piezofile (obligatoryjne) żyją najczęściej w zakresie 10–50 MPa, ale niektóre organizmy uznawane są za piezofile ekstremalne, czyli takie, które rosną dobrze dopiero gdy ciśnienie hydrostatyczne osiąga wartość powyżej 50 MPa. Piezotolerancyjnymi nazywa się zaś te organizmy, których optimum wzrostu znajduje się przy wartości ciśnienia 0,1 MPa, ale mogą także rosnąć w warunkach 10–50 MPa [22, 43].

Najbardziej typowym środowiskiem, w którym powstają warunki umożliwiające rozwój piezofili są wody oceaniczne i morskie na znacznych głębokościach (wraz ze wzrostem głębokości o 10 metrów ciśnienie rośnie o 0,1 MPa). Za najbardziej głębokie miejsce na Ziemi uznaje się obecnie Rów Mariański – rów oceaniczny w zachodniej części Oceanu Spokojnego. Według pomiarów wykonanych przy pomocy specjalnie skonstruowanych robotów, głębokość w tym miejscu sięga około 10900 metrów, co oznacza że woda wywiera tam ciśnienie około 110 MPa. W takich warunkach rozwijać się mogą jedynie piezofile ekstremalne. Należy pamiętać, że w zdecydowanej większości wody morskie mają bardzo niską temperaturę, tak więc przeważnie piezofile są jednocześnie psychrofitami. Przeważnie – bo w przedziwnym świecie morskich głębin są miejsca wyjątkowo gorące – to rejony ujść hydrotermalnych. Piezofile tam występujące przystosowane są do trwania w temp. nawet 120°C – są więc piezotermofilami. Biorąc pod uwagę działanie jeszcze innych czynników skrajnych (brak światła, oligotroficzny charakter wód, często wysokie stężenie metanu) piezofile z pewnością można potraktować jako poliekstremofile. Wspomniane wody oceaniczne nie są jedynym „wysokociśnieniowym” środowiskiem. Znaczne głębokości, a co za tym idzie znaczne wartości ciśnienia notowane są także np. w syberyjskim jeziorze Bajkał (nawet 1600 m), albo antarktycznym podlodowym jeziorze Wostok (ponad 3700 m pod lodem). Mimo, że niewiele wiadomo jeszcze o społeczności organizmów tam żyjących, można przypuszczać, że muszą także należeć do piezofili [21, 41].

Większość z hodowlanych piezofili należy do domeny Bacteria, (γ – proteobakterie) i są to przedstawiciele rodzajów: *Colwellia* (*C. hadaliensis*), *Moritella* (*M. yayanosii*), *Photobacterium* (*P. profundum*), *Psychromonas* (*P. hadalis*) i *Shewanella* (*S. violacea*). Wymienione drobnoustroje są jednocześnie psychrofilami. Znane są także termopiezofilne bakterie np. *Marinitoga piezophila* czy *Desulfovibrio hydrothermalis* (oba gatunki redukują siarczany), a także wyizolowane w ostatnim czasie: *Thioprofundum lithotrophica* i *Piezobacter thermophilus* (chemolitoautotrofy utleniające siarkę). Izolowano także piezofilne promieniowce: *Demacoccus abyssi*. Piezofilne archeony należą do *Euryarchaeota* i *Crenarchaeota* – w zdecydowanej większości są to hypertermopiezofile, a nawet hypertermohyperpiezofile. Przykładami piezofilnych archeonów są: *Thermococcus barophilus*, *Pyrococcus abyssi*, *Methanopyrus kandleri* [22, 86].

Mimo intensywnie prowadzonych badań, wciąż nie do końca udało się poznać i wyjaśnić mechanizmy przystosowania piezofili do ekstremalnych warunków życia. Najbardziej charakterystyczną cechą tych organizmów, mającą za zadanie utrzymanie aktywności komórki, wydaje się być obecność w błonach specyficznych kwasów tłuszczowych: nienasyconych, często rozgałęzionych, a także hydroksylowanych (stanowią one nawet 70% wszystkich kwasów tłuszczowych w komórce). Kwasy takie mają za zadanie utrzymać odpowiednią płynność błon a przez to ich funkcjonalność. W procesie adaptacji wskazuje się także na znaczenie zmian w ekspresji genów łańcucha oddechowego piezofili czy białek błonowych (ekspresja pewnych genów tylko w wysokich wartościach ciśnienia) [78].

3. Z ekstremofilami w przyszłość – biotechnologiczne możliwości wykorzystania

Znalezienie mikroorganizmów w środowiskach skrajnych zapoczątkowało szeroko zakrojony rozwój badań nad tą grupą drobnoustrojów. Zwłaszcza ostatnie 40 lat prac wzbogaciło naszą wiedzę o ekstremofilach, nie tylko w aspekcie poznawczym, ale także – a może nawet przede wszystkim – w aspekcie aplikacyjnym. W ciągu tych ostatnich kilku dekad zidentyfikowano i opisano wiele nowych gatunków ekstremofili [26, 32, 38, 50, 85]. Znajomość ich morfologii, fizjologii wzrostu oraz genetyki zapoczątkowała następnie nowy, trwający do dziś kierunek badań nad możliwością biotechnologicznego zastosowania produktów pochodzących z tych mikroorganizmów. Niektóre enzymy znalazły już w tej chwili szerokie zastosowanie, a wiele nowych preparatów poddawanych jest wciąż analizom z myślą zastosowania ich w najbliższej przyszłości [33, 37]. Nie można w tym miejscu nie wspomnieć o jeszcze jednej dziedzinie

zainteresowań ekstremofilami, mianowicie astrobiologii. Prowadzone przez astrobiologów prace mogą przynieść odpowiedź na pytania nie tylko dotyczące pochodzenia i ewolucji życia na Ziemi, ale też mogą pomóc w poszukiwaniach i przewidywaniu życia na innych planetach. Ekstremofile – uważane za najstarsze żyjące na świecie organizmy i warunki środowisk w jakich egzystują są tu niewątpliwie doskonałym modelem badań [29, 39, 68, 89].

W kręgu zainteresowań biotechnologów nieustannie znajdują się psychrofile. Działające w niskich temperaturach enzymy przede wszystkim mogą stać się dobrym narzędziem w redukcji zużycia energii, ale także co równie ważne, mogą ograniczyć zużycie toksycznych związków chemicznych. Możliwości ich zastosowania są różnorodne: produkcja detergentów (lipazy, proteazy, amylazy, celulazy), przemysł garbarski – usuwanie włosów i sierści (keratynazy, proteazy), przemysł spożywczy – ekstrakcja i klarowanie soków, poprawa walorów smakowych, uzyskiwanie produktów piekarniczych, (pektynazy, proteazy, glikozydazy). Proteazy mogą również znaleźć zastosowanie do czyszczenia szkieł kontaktowych, do produkcji karmy dla zwierząt, w browarnictwie i winiarstwie [14, 17, 30, 42]. Istnieją także doniesienia o możliwym użyciu samych psychrofilii lub też wyizolowanych z nich enzymów do bioremediacji skażonych olejami, węglowodorami i innymi zanieczyszczeniami zimnych środowisk skrajnych [56].

Główne zainteresowanie termofilami skierowane jest na izolację enzymów produkowanych przez te drobnoustroje, mających obecnie szerokie zastosowanie w przemyśle, biologii molekularnej i innych dziedzinach. Enzymy termofili są interesujące, ze względu na oporność na wiele czynników, takich jak temperatura, pH, rozpuszczalniki, czynniki denaturujące, co pozwala na zastosowanie ich w wielu procesach przemysłowych, w których wymagane jest zastosowanie ekstremalnych warunków [84]. Początkiem stosowania enzymów termofili było użycie termostabilnej polimerazy *Taq* (z komórek bakterii z rodzaju *Thermus*), do reakcji łańcuchowej polimeryzacji (PCR). Pozwoliło to na opracowanie i udoskonalenie tej powszechnie dziś stosowanej metody [84, 90]. Obecnie stosowanymi enzymami termofili są także m.in. proteazy, hydrolazy, chitynazy, ksylanazy, lipazy i esterazy [48]. Proteazy znalazły zastosowanie w takich gałęziach przemysłu jak: farmaceutyczny, spożywczy, tekstylny, garbarstwo, produkcja detergentów. W przemyśle spożywczym służą do polepszania walorów organoleptycznych produktów oraz usuwania produktów ubocznych. Służą również do produkcji płynów do mycia naczyń i innych detergentów, w których zachowują aktywność podczas zmywania w wyższej temperaturze [84]. Ksylanazy służą do wybielania papieru, chitynazy do modyfikacji chityny, lipazy i esterazy do produkcji deter-

gentów i reakcji stereo-specyficznych, np. biosyntezy organicznej, itp. [48].

Rozważane są również inne sposoby zastosowania drobnoustrojów termofilnych i ich enzymów, np. zastosowanie keratynaz w rozkładzie i usuwaniu różnego rodzaju odpadów (z przemysłu mięsnego, piór z przemysłu drobiarskiego). Trwają również badania nad zastosowaniem termofilnych proteaz w dekontaminacji materiału zwierzęcego, skażonego prionami powodującymi encefalopatię gąbczastą krów (BSE) i chorobę Creutzfelda-Jacoba. Priony wykazują wysoką oporność na działanie proteaz w temperaturze pokojowej. Zastosowanie wyższej temperatury powoduje zwiększenie wrażliwości prionów, a metoda ta wymaga użycia termoopornych proteaz [84]. Termofile i ich enzymy mogą być zastosowane również do: usuwania toksycznych zanieczyszczeń jak np. fenol oraz w biorafinacji, czyli otrzymywaniu produktów, paliw i substancji chemicznych w procesie rozkładu biomasy organicznej. Często do procesów tego rodzaju wymagane jest użycie podwyższonej temperatury dla osiągnięcia lepszej wydajności lub ułatwienia procesu. Przykładami biorafinacji jest produkcja biowodoru i biopaliw oraz rozkład biomasy o dużej zawartości celulozy i hemiceluloz [25, 90]. Obiecującym źródłem enzymów do takich procesów są bakterie z rodzaju *Caldicellulosiruptor* [25].

Na uwagę zasługuje także biotechnologiczne znaczenie mikroorganizmów acidofilnych. Szczególnie istotna jest możliwość ich wykorzystania w bioługowaniu rud zawierających siarczki wielu metali. Jednocześnie prowadzone są także badania nad możliwością zastosowania drobnoustrojów zdolnych do redukcji utlenionych związków siarki (SO_4^{2-}) w bioremediacji kwaśnych wód kopalnianych i zbierających się w wyrobiskach pokopalnianych [13]. Ostatnie doniesienia mówią także o wysokiej wydajności procesu oczyszczania gazu z lotnych związków siarki przy udziale ekstremalnie acidofilnych mikroorganizmów [45].

Drobnoustroje acidofilne są także intensywnie badane w kontekście możliwości wykorzystania produkowanych przez nie enzymów. Zainteresowanie badaczy skupia się głównie na enzymach zewnątrzkomórkowych, które wykazują aktywność w niskim pH. Acidofilne enzymy wewnątrzkomórkowe nie wykazują przystosowań do takich warunków, co wynika z faktu, że aktywne są w pH zbliżonym do neutralnego [12, 30]. Enzymy uzyskiwane z hodowli acidofili mogą znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach przemysłu. Przykładem mogą być amylazy, glukoamylazy czy α -glukozydazy (izolowane odpowiednio z: *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Picrophilus torridus*, *Sulfolobus solfataricus*) stabilne i aktywne nie tylko w niskim pH, ale często także w podwyższonej temperaturze. Enzymy takie mogą być wykorzystywane w produkcji alkoholu, w przemyśle piekarniczym czy w produkcji syropów

zawierających fruktozę. Oprócz wymienionych enzymów biorących udział w rozkładzie skrobi, praktyczne zastosowanie mogą znaleźć także inne: celulazy (*Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*), ksylanazy (*Acidobacterium capsulatum*), a także enzymy proteolityczne (*Alicyclobacillus sendaiensis*). Kwasooporne celulazy i ksylanazy są enzymami poszukiwanymi w celu zastosowania ich w produkcji biopaliw (do degradacji biomasy) zaś proteazy znajdują zastosowanie np. w produkcji serów [12, 77].

Zewnątrzkomórkowe enzymy alkalifili dzięki stabilności w wysokim pH także stały się tematem intensywnych badań biotechnologów. Okazują się, że ich różnorodność i wysoka aktywność w takich warunkach może pozwolić na ich wielorakie zastosowanie – szczególnie enzymów pochodzących z hodowli termoalkalifili. W praktyce zastosowanie znalazły np. jako dodatek do detergentów: lipazy, proteazy, amylazy czy celulazy, dzięki którym polepszany jest proces usuwania różnorodnych zanieczyszczeń podczas prania i zmywania w wysokich temperaturach. Proteazy stanowią także dodatek do roztworów czyszczących szkła kontaktowe, ale też w procesach związanych z produkcją serów i mięs. Niedawno wykazano ponadto, że alkaliczne proteazy mają zdolność rozkładu białek prionowych, co w przyszłości może pozwolić na zastosowanie proteaz pochodzących z alkalifili w terapii choroby prionowej. Celulazy stosowane są ponadto w końcowych etapach produkcji tkanin do usuwania różnego rodzaju grudek, które powodują wzrost niepożądaną szorstkość materiału. Wykazano także, że celulazy mogłyby również być wykorzystane w recyklingu papieru do usuwania tuszu czy atramentu. Pektynazy stosowane są w procesach związanych z produkcją papieru oraz obróbką włókien roślinnych dla przemysłu tekstylnego. Ich aktywność pozwala uzyskać np. papier o lepszych właściwościach. Podobne zastosowanie znalazły ksylanazy, które oprócz procesów wybielania w produkcji papieru stosuje się także jako wybielający dodatek do detergentów. Większość ze stosowanych enzymów pochodzi z hodowli różnych alkalifilnych szczepów rodzaju *Bacillus* [30, 34, 73]. Nie można także zapomnieć o komercyjnej hodowli alkalifilnych cyjanobakterii. Stosowane są one jako suplement diety dostarczający wielu cennych składników odżywczych. Najszersze zastosowanie znalazły tu drobnoustroje *Spirulina platensis* [73]. Alkalifile mogą stać się także przydatne z ekologicznego punktu widzenia. Liczne badania dowodzą, że z powodzeniem mogą być stosowane w biologicznych procesach neutralizacji silnie alkalicznych ścieków pochodzących z różnych gałęzi przemysłu (np. z produkcji barwników czy przemysłu tekstylnego używającego tych barwników), a także do rozkładu fenolu czy pirenu. Ostatnie doniesienia wskazują także na możliwość stosowania hodowli alkalifili do neutralizacji ścieków silnie zasadowych zawierających

duże ilości chloru [67]. Wykazano również, że niektóre alkalifilne bakterie, rosnące w postaci biofilmu, mogą być używane do polepszania jakości zaprawy murarskiej. Biofilm tych bakterii pokrywający mineralne cząsteczki zaprawy cementowej może pełnić rolę spoiwa, znacznie zwiększającego trwałość i wytrzymałość zaprawy murarskiej [62].

Szerokie zastosowanie znalazły wytwarzane między innymi przez halofile osmolity, zwłaszcza ektoina. Dzięki zdolności do stabilizacji białek i kwasów nukleinowych znana jest ona ze swego protekcyjnego działania. Wykorzystuje się ją w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, a także kosmetycznym (np. w kremach nawilżających – chroni przed efektami promieniowania UV-A, przez co przeciwdziała starzeniu się skóry) [61]. Glony z gatunku *Dunaliella salina* stosowane są do uzyskiwania naturalnego β -karotenu, a ten służy do uzyskiwania różnego rodzaju suplementów diety, jako czynnik koloryzujący i antyoksydant w produktach kosmetycznych, spożywczych i farmaceutycznych [36]. Jednym z niewielu enzymów stosowanych komercyjnie, uzyskiwanym z halofili jest nukleaza H. Stosuje się ją do produkcji kwasu 5'-guanylowego, używanego jako składnik nadający zapach [61]. Niektóre z produktów halofili są wciąż intensywnie badane i najprawdopodobniej znajdą komercyjne zastosowanie w najbliższym czasie. Przykładem może być halorodopsyna. Jej fotochemiczna i termodynamiczna stabilność może pozwolić na wykorzystanie w dziedzinach takich jak: holografia, produkcja sztucznej siatkówki, uzyskiwanie przestrzennych modulatorów światła. Projektowane są także urządzenia, których działanie opiera się na wykorzystaniu halorodopsyny do uzyskiwania energii [72, 75]. Ponownie glony *Dunaliella salina* z wysoką wydajnością usuwają ze ścieków N i P, a także jony metali ciężkich, dzięki czemu mogłyby być stosowane w oczyszczaniu ścieków [36]. Lipidy pochodzące halofilnych archeonów są świetnym narzędziem do produkcji archeosomów (liposomów) – są wysoce stabilne i mają odpowiedni profil dystrybucji w tkankach. Liposomy takie uzyskano np. z komórek *Halobacterium cutirubrum* są odporne na działanie fosfolipaz i mogą być przechowywane nawet do 60 dni. Wskazuje się na możliwość użycia ich jako nośników niektórych leków, czy czynników obrazowania komórek nowotworowych, a nawet genów [75]. Przewiduje się także możliwość stosowania halofili w produkcji poli- β -hydroksyalkanów, wykorzystywanych do syntezy biodegradowalnego plastiku, w produkcji egzopolisachrydów, które mogłyby znaleźć zastosowanie jako immunomodulatory czy surfaktanty, a nawet jako źródło do produkcji biopaliwa [61, 65].

Mało liczne są przykłady praktycznego zastosowania piezofili. Wynika to przede wszystkim z trudności w hodowli tych mikroorganizmów. Trudno jest w praktyce odtworzyć warunki jakie panują w ich naturalnych

środowiskach życia. Nie chodzi tylko o zapewnienie odpowiednio wysokiego ciśnienia, ale często także o zastosowanie np. właściwej mieszanki gazów i przede wszystkim odpowiednio dobranych składników podłoża. Zaobserwowano, że podłoża stosowane do izolacji piezofili nie powinny być zbyt bogate, a wręcz powinny mieć oligotroficzny charakter, bo taki najczęściej mają wody morskie. Dodatkowo, uzyskiwanie enzymów czy innych produktów z komórek piezofili jest możliwe najczęściej po dekompresji co utrudnia ocenę ich właściwości w naturalnych procesach. W praktyce bardziej niż same piezofile wykorzystywana jest znajomość działania wysokiego ciśnienia na drobnoustroje. Najbardziej typowym tego przykładem jest usuwanie drobnoustrojów z produktów żywnościowych właśnie za pomocą wysokiego ciśnienia zamiast wysokiej temperatury (konserwowanych jest już tak ponad 250 produktów). Zaletą takiego procesu oprócz eliminacji patogenów jest zachowanie np. właściwości smakowych i zapachowych oraz niezmiennych właściwości witamin. Zaawansowane są także badania nad możliwością dezynfekcji wysokim ciśnieniem różnych biomateriałów (ściągien, chrząstek, kości) – biomateriały tak traktowane nie zmieniają swych biomechanicznych własności. Ogromne nadzieje niesie także możliwość zastosowania tak dezynfekowanych fragmentów kości do autoprzeszczepów, w miejsca gdzie kość została zmieniona przez komórki nowotworowe. Dodatkową korzyścią jest tu fakt, że w wysokim ciśnieniu zniszczeniu ulegają także komórki nowotworowe co zapobiega ich ewentualnemu przeniesieniu wraz z przeszczepem [23].

4. Podsumowanie

Scharakteryzowane powyżej grupy organizmów ekstremofilnych należą do najlepiej poznanych w tej kategorii, ale należy pamiętać, że nie są jedynymi. Badania prowadzone od kilku dziesięcioleci pozwoliły zrozumieć nam wiele mechanizmów rządzących światem środowisk ekstremalnych i ich mieszkańcami. Doprowadziły do opisanie i wykorzystania bardzo wielu drobnoustrojów, których istnienia nawet nie podejrzewaliśmy. Musimy pamiętać, że nadal nie wszystkie ekstremofile „pozwołyły” nam się poznać. Najlepiej świadczy o tym porównanie wyników badań z zakresu metagenomiki i tradycyjnych metod hodowlanych. Metagenomika dostarcza niezbitych dowodów, że w naturalnych środowiskach – także ekstremalnych – sąsiadują z nami być może tysiące organizmów, które pozostają dla nas anonimowe – bo jeszcze nie umiemy ich wyhodować. Czy taką umiejętność posiadziemy? Na pewno mamy na to szansę. Badania nad ekstremofilami prowadzone są przez uczonych z ośrodków na całym świecie i w wielu przypadkach są początkiem drogi do nowych, być może

zaskakujących odkryć, niosących możliwości wykorzystania przez człowieka w praktyce tego co w naturalny sposób trwa od wieków w środowiskach skrajnych.

Piśmiennictwo

1. Andrei A.S., Banciu H.L., Oren A.: Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol. Lett.* **330**, 1–9 (2012)
2. Argandoña M., Vargas C., Reina-Bueno M., Rodríguez-Moya J., Salvador M., Nieto J.J.: An extended suite of genetic tools for use in bacteria of the *Halomonadaceae*: an overview. *Methods Mol. Biol.* **824**, 167–201 (2012)
3. Baker-Austin C., Dopson M.: Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* **15**, 165–171 (2007)
4. Bakermans C., Ayala-del-Riò H.L., Ponder M.A., Vishnivetskaya T., Gilichinsky D., Thomashow M.F., Tiedje J.M.: *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1285–1291 (2006)
5. Bathe S., Norris P.R.: Ferrous iron- and sulfur-induced genes in *Sulfolobus metallicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2491–2497 (2007)
6. Błaszczak M.K.: Środowiska skrajne. W: *Mikrobiologia środowisk*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2010, s. 280–285, 301–311
7. Bońko M.: *Wielki słownik wyrazów obcych* PWN. Wyd. Naukowe PWN. Warszawa 2005
8. Bowers K.J., Wiegel J.: Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. *Extremophiles*, **15**, 119–128 (2011)
9. Broderick N.A., Raffa K.A., Goodman R.M., Handelsman J.: Census of the Bacterial Community of the Gypsy Moth Larval Midgut by Using Culturing and Culture-Independent Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 293–300 (2004)
10. Bryl K.: Visual and archaeal rhodopsins: similarities, differences and controversy. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **8**, 285–296 (2003)
11. Buchalo A.S., Nevo E., Wasser S.P., Oren A., Molitoris H.P.: Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records. *Proc. Royal. Soc. London-Biol. Sci.* **265**, 1461–1465 (1998)
12. van den Burg B.: Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 213–218 (2003)
13. Canganella F., Wiegel J.: Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*, **98**, 253–279 (2011)
14. Cavicchioli R., Siddiqui K.S., Andrews D., Sowers K.: Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 253–261 (2002)
15. Ciranna A., Santala V., Karp M.: Biohydrogen production in alkalithermophilic conditions: *Thermobrachium celere* as a case study. *Bioresour. Technol.* **102**, 8714–8722 (2011)
16. Clum A., Lapidus A. i wsp.: Complete genome sequence of *Acidimicrobium ferrooxidans* type strain (ICP^T). *Stand. Genomic Sci.* **1**, 38–45 (2009)
17. Cristobal H.A., Lopez M.A., Kothe E., Abate C.M.: Diversity of protease-producing marine bacteria from sub-antarctic environments. *J. Basic Microbiol.* **51**, 590–600 (2011)
18. Deming J.W.: Psychrophiles and polar regions. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 301–309 (2002)
19. Deuch C.E.: Characterization of a novel salt-tolerant *Bacillus* sp. from the nasal cavities of desert iguanas. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**, 55–60 (1994)

20. Engle M., Li Y., Woese C., Wiegel J.: Isolation and characterization of a novel alkalitolerant thermophile, *Anaerobranca horikoshii* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 454–61 (1995)
21. Fang J., Barcelona M.J., Abrajano T., Nogi Y., Kato C.: Isotopic composition of fatty acids of extremely piezophilic bacteria from the Mariana Trench at 11,000 m. *Mar. Chem.* **80**, 1–9 (2002)
22. Fang J., Zhang L., Bazylnski D.A.: Deep-sea piezosphere and piezophiles: geomicrobiology and biogeochemistry. *Trends Microbiol.* **18**, 413–422 (2010)
23. Follonier S., Panke S., Zinn M.: Pressure to kill or pressure to boost: a review on the various effects and applications of hydrostatic pressure in bacterial biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 1805–1815 (2012)
24. Foti M., Sorokin D.Y., Lomans B., Mussman M., Zacharova E.E., Pimenov N.V., Kuenen J.G., Muyzer G.: Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Extremophiles*, **12**, 133–145 (2008)
25. Frock A.D., Kelly R.M.: Extreme thermophiles: moving beyond single-enzyme biocatalysis. *COCHE* **1**, 1–10 (2012)
26. Fuchs T., Huber H., Teiner K., Burggraf S., Stetter K.O.: *Metallosphaera prunae*, sp. nov., a novel metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeum, isolated from a uranium mine in Germany. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 560–566 (1996)
27. Gerasimenko L.M., Dubinin A.V., Zavarzin G.A.: Alkaliphilic cyanobacteria from soda lakes of Tuva and their ecophysiology. *Microbiology*, **65**, 736–740 (1996)
28. Gilbert J.A., Hill P.J., Dodd C.E., Laybourn-Parry J.: Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology*, **150**, 171–180 (2004)
29. Gilichinsky D., Rivkina E., Shcherbakova V., Laurinavichuis K., Tiedje J.: Supercooled water brines within permafrost – an unknown ecological niche for microorganisms: a model for astrobiology. *Astrobiology*, **3**, 331–341 (2003)
30. Gomes J., Steiner W.: The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* **42**, 223–235 (2004)
31. Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitas A.: Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**, 235–240 (2000)
32. Harrison A.P.: *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**, 327–332 (1981)
33. Hendry P.: Extremophiles: There's More to Life. *Environ. Chem.* **3**, 75–76 (2006)
34. Hirata Y., Ito H., Furuta T., Ikuta K., Sakudo A.: Degradation and destabilization of abnormal prion protein using alkaline detergents and proteases. *Int. J. Mol. Med.* **25**, 267–270 (2010)
35. Horikoshi K.: Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 735–750 (1999)
36. Hosseini Tafreshi A., Shariati M.: Dunaliella biotechnology: methods and applications. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 14–35 (2009)
37. Innis M.S., Myambo K.B., Gelfand D.H., Brown M.A.: DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. 1988. *Biotechnology*, **24**, 6–10 (1992)
38. Itoh T., Yoshikawa N., Takashina T.: *Thermogymnomonas acidicola* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in the order Thermoplasmatales, isolated from a solfataric soil in Hakone, Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2557–2561 (2007)
39. Javaux E.J.: Extreme life on Earth-past, present and possibly beyond. *Res. Microbiol.* **157**, 37–48 (2006)
40. Johnson D.B., Bacelar-Nicolau P., Okibe N., Thomas A., Hallberg K.B.: *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferrithrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1082–1089 (2009)
41. Jones N.: Russians celebrate Vostok victory. *Nature*, **482**. doi: 10.1038/482287a. (2012)
42. Kasana R.C., Gulati A.: Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. *J. Basic Microbiol.* **51**, 572–579 (2011)
43. Kato C., Qureshi M.H.: Pressure response in deep-sea piezophilic bacteria. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 87–92 (1999)
44. Kivistö A.T., Karp M.T.: Halophilic anaerobic fermentative bacteria. *J. Biotechnol.* **152**, 114–124 (2011)
45. Kraakman N.J., Pol A., Smeulders M.J., Jetten M.S., Op Den Camp H.J.: Extremely acidophilic sulfur-oxidizing bacteria applied in biotechnological processes for gas purification. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* **47**, 964–969 (2012)
46. Krulwich T.A., Masahiro I., Gilmour R., Guffanti A.A.: Mechanisms of cytoplasmic pH regulation in alkaliphilic strains of *Bacillus*. *Extremophiles*, **1**, 163–169 (1997)
47. Krulwich T.A., Masahiro I., Guffanti A.A.: The Na⁺-dependence of alkaliphily in *Bacillus*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1505**, 158–168 (2001)
48. Kumar L., Awasthi G., Singh B.: Extremophiles: A novel Source of Industrially Important Enzymes. *Biotechnology*, doi:10.3923/biotech.2011. (2011)
49. Kushner D.J.: Life in high salt and solute concentrations. W: *Microbial Life in Extreme Environments*. Red. Kushner D.J. Academic Press, London 1978, s. 317–368.
50. Kurosawa N., Itoh Y.H., Iwai T., Sugai A., Uda I., Kimura N., Horiuchi T., Itoh T.: *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic acidophile of the order *Sulfolobales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 451–456 (1998)
51. Lentzen G., Schwarz T.: Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 623–634 (2006)
52. Macalady J.L., Vestling M.M., Baumler D., Boekelheide N., Kaspar C.W., Banfield J.F.: Tetraether-linked membrane monolayers in *Ferroplasma* spp: a key to survival in acid. *Extremophiles*, **8**, 411–419 (2004)
53. Mesbah N.M., Wiegel J.: The Anaerobic Halophilic Alkalithermophiles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1125**: 44 – 57 (2008)
54. Minic Z., Thongbam P.D.: The biological deep sea hydrothermal vent as a model to study carbon dioxide capturing enzymes. *Mar. Drugs*, **9**, 719–738 (2011)
55. Morita R.: Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **39**, 144–167 (1975)
56. Morozkina E.V., Slutskaya E.S., Fedorova T.V., Tugay T.I., Golubeva L.I., Koroleva O.V.: Extremophilic Microorganisms: Biochemical Adaptation and Biotechnological Application (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **46**, 1–14 (2010)
57. Norris P.R., Clark D.A., Owen J.P., Waterhouse S.: Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulfide-oxidizing bacteria. *Microbiology*, **142**, 775–783 (1996)
58. Oesterhelt C., Schmälzlin E., Schmitt J.M., Lokstein H.: Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant J.* **51**, 500–511 (2007)
59. Ollivier B., Caumette P., Garcia J.L., Mah R.A.: Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol. Rev.* **58**, 27–38 (1994)
60. Oren A.: Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst.* **4**, doi: 10.1186/1746-1448-4-2 (2008)

61. Oren A.: Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.* **31**, 825–834 (2010)
62. Park S.J., Chun W.Y., Kim W.J., Ghim S.Y.: Application of alkaliphilic biofilm-forming bacteria to improve compressive strength of cement-sand mortar. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 385–389 (2012)
63. Phadtare S.: Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr. Issues Mol. Biol.* **6**, 125–136 (2004)
64. Piette F., Struvay C., Feller G.: The protein folding challenge in psychrophiles: facts and current issues. *Environ. Microbiol.* **13**, 1924–1933 (2011)
65. Poli A., Di Donato P., Abbamondi G.R., Nicolaus B.: Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea*, doi: 10.1155/2011, 693253
66. Pronk J.T., Meulenbergh R., van den Berg D.J.C., Batenburg-van der Vegte W., Bos P., Kuenen J.G.: Mixotrophic and Autotrophic Growth of *Thiobacillus acidophilus* on Glucose and Thiosulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3395–3401 (1990)
67. Rakeshkumar M.J., Kalpana H.M., Jitendra K., Bhavanath J.: Biological neutralization of chlor-alkali industry wastewater. *Mar. Pollut. Bull.* **62**, 2377–2383 (2011)
68. Rampelotto P.H.: Resistance of Microorganisms to Extreme Environmental Conditions and Its Contribution to Astrobiology. *Sustainability*, **2**, 1602–1623 (2010)
69. Rodrigues D.F., Tiedje J.M.: Coping with our cold planet. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1677–1686 (2008)
70. Roney H.C., Booth G.M., Cox P.A.: Competitive exclusion of Cyanobacterial species in the Great Salt Lake. *Extremophiles*, **13**, 355–361 (2009)
71. Russell N.J.: Psychrophilic bacteria – molecular adaptations of membrane lipids. *Comp. Biochem. Physiol. Physiol.* **118**, 489–493 (1997)
72. Saedi P., Mohammadian M.J., Sebtahmadi S.S., Mehrabadi J.F., Behmanesh M., Mekhilef S.: Potential applications of bacteriorhodopsin mutants. *Bioengineered*, **3**, 1–3 (2012)
73. Sarethy I.P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S.K., Gupta V., Gupta S.: Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 769–790 (2011)
74. Satyanarayana T., Chandralata R., Shivaji S.: Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, **89**, 78–90 (2005)
75. Schiraldi C., Giuliano M., De Rosa M.: Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea*, **1**, 75–86 (2002)
76. Schleper C., Puehler G., Holz I., Gambacorta A., Janekovic D., Santarius U., Klenk H.P., Zillig W.: *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising Archaea capable of growth around pH 0. *J. Bacteriol.* **177**, 7050–7059 (1995)
77. Sharma A., Kawarabayasi Y., Satyanarayana T.: Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles*, **16**, 1–19 (2012)
78. Simonato F., Campanaro S., Lauro F.M., Vezzi A., D'Angelo M., Vitulo N., Valle G., Bartlett D.: Piezophilic adaptation: a genomic point of view. *J. Biotechnol.* **126**, 11–25 (2006)
79. Sorokin D.Y., Kuenen J.G.: Chemolithotrophic haloalkaliphiles from soda lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**, 287–295 (2005)
80. Sorokin D.Y., Kuenen J.G., Muyzer G.: The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes. *Front. Microbiol.* **2**, doi: 10.3389/fmicb.2011.00044
81. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Abbas B., Suhacheva M.V., Muyzer G.: *Desulfonatronovibrio halophilus* sp. nov., a novel moderately halophilic sulfate-reducing bacterium from hypersaline chloride-sulfate lakes in Central Asia. *Extremophiles*, **16**, 411–417 (2012 a)
82. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Panteleeva A.N., Muyzer G.: *Desulfonatronobacter acidivorans* gen. nov., sp. nov. and *Desulfobulbus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic heterotrophic sulfate-reducing bacteria from soda lakes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 2107–2113 (2012b)
83. Suzuki I., Lee D., Mackay B., Harahuc L., Oh J.K.: Effect of various ions, pH, and osmotic pressure on oxidation of elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5163–5168 (1999)
84. Synowiecki J.: Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. *Afr. J. Biotechnol.* **42**, 7020–7025 (2010)
85. Takai K., Moser D.P., Onstott T.C., Spoelstra N., Pfliffer S.M., Dohnalkova A., Fredrickson J.K.: *Alkaliphilus transvaalensis* gen. nov., sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1245–1256 (2010)
86. Takai K., Miyazaki M., Hirayama H., Nakagawa S., Querellou J., Godfroy A.: Isolation and physiological characterization of two novel, piezophilic, thermophilic chemolithoautotrophs from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Environ. Microbiol.* **11**, 1983–1997 (2009)
87. Taylor T.J., Vaisman I.I.: Discrimination of thermophilic and mesophilic proteins. *BMC Structural Biology*, **10** (Suppl 1): S5, 1–10 (2010)
88. Tourova T.P., Kovaleva O.L., Sorokin D.Y., Muyzer G.: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes as a functional marker for chemolithoautotrophic halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. *Microbiology*, **156**, 2016–2025 (2010)
89. Trent J.D.: Extremophiles in Astrobiology: *Per Ardua ad Astra*. *ASGSB Bulletin*, **13**, 5–11 (2000)
90. Turner P., Mamo G., Nordberg Karlsson E.: Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*, **6**: 9, 1–23 (2007)
91. Ventosa A., Nieto J.J., Oren A.: Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 504–544 (1998)
92. Wagner I.D., Wiegel J.: Diversity of Thermophilic Anaerobes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1125**: 1–43 (2008)
93. Wichlacz P.Z., Unz R.F., Langworthy T.A.: *Acidiphilium angustum* sp. nov., *Acidiphilium facilis* sp. nov., *Acidiphilium rubrum* sp. nov. Acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic coal mine drainage. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 197–201 (1986)
94. Wisotzkey J.D., Jurtshuk P., Fox G.E., Deinhard G., Poralla K.: Comparative sequence analyses on the 16S ribosomal-RNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 263–269 (1992)
95. Yayanos A.A.: Microbiology to 10,500 meters in the deep sea. *Ann. Rev. Microbiol.* **49**, 777–805 (1995)
96. Zalar P., de Hoog S., Gunde-Cimerman N.: *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. *Stud. Mycol.* **43**, 57–62 (1999)
97. Zheng H., Wu H.: Gene-centric association analysis for the correlation between the guanine-cytosine content levels and temperature range conditions of prokaryotic species. *BMC Bioinformatics* **11** (suppl 11), S7, 1–10 (2010)