

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»
Кафедра зоологии и ботаники

БИОЛОГИЯ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методические рекомендации

*Витебск
ВГУ имени П.М. Машерова
2021*

УДК 579.2(075.8)
ББК 28.4я73
Б63

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 1 от 27.10.2021.

Составитель: доцент кафедры зоологии и ботаники ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук **Е.А. Держинский**

Р е ц е н з е н т :
декан факультета химико-биологических и географических наук
ВГУ имени П.М. Машерова,
кандидат биологических наук, доцент *Т.А. Толкачева*

Б63 **Биология экстремофильных микроорганизмов : методические рекомендации / сост. Е.А. Держинский. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2021. – 48 с.**

Издание содержит теоретический материал для подготовки к практическим и семинарским занятиям в соответствии с учебной программой по дисциплине «Биология экстремофильных микроорганизмов». Рассматриваются вопросы классификации экстремофильных микроорганизмов в зависимости от среды обитания, их применения в исследованиях происхождения жизни на Земле и ее поиска за пределами нашей планеты, промышленного использования экстремофилов; разнообразия, экологии, особенностей физиологии и биохимии термофилов, психрофилов, галофилов, ацидофилов, алкалифилов и пьезофилов. Предназначено для магистрантов биологического факультета, обучающихся по специальности «Биология. Функциональная биология».

УДК 579.2(075.8)
ББК 28.4я73

© ВГУ имени П.М. Машерова, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| Введение | 4 |
| Тема 1 Общее понятие об экстремофилах | 6 |
| 1.1 Определение экстремофилов и экстремотрофов | 6 |
| 1.2 Среды обитания экстремофильных микроорганизмов | 7 |
| 1.3 Классификация экстремофильных микроорганизмов | 9 |
| 1.4 Экстремофилы и происхождение жизни на Земле | 10 |
| 1.5 Применение экстремофилов | 13 |
| Тема 2 Термофилы | 14 |
| 2.1 Биоразнообразие в условиях высоких температур | 14 |
| 2.2 Функциональная геномика термофильных микроорганизмов | 15 |
| 2.3 Адаптации нуклеиновых кислот к высокой температуре среды | 16 |
| 2.4 Проблема термоллабильности метаболитов и пути ее решения микроорганизмами | 17 |
| 2.5 Молекулярные адаптации белков к экстремальным температурам | 20 |
| 2.6 Осмотически активные вещества термофилов | 23 |
| 2.7 Адаптации мембран к высоким температурам | 25 |
| Тема 3 Психрофилы | 26 |
| 3.1 Экология и разнообразие психрофильных микроорганизмов | 26 |
| 3.2 Жизнь в ледяных образованиях | 27 |
| 3.3 Исследование подледных озер Антарктиды и перспективы поиска внеземной жизни | 29 |
| 3.4 Адаптации мембран микроорганизмов к низкой температуре | 32 |
| 3.5 Холодоустойчивость ферментов | 33 |
| 3.6 Реакция на холодовой шок | 34 |
| 3.7 Восприятие низкой температуры и механизм ответной реакции | 34 |
| 3.8 Изучение геномов психрофильных прокариот | 35 |
| Тема 4 Галофилы | 36 |
| 4.1 Биоразнообразие в условиях высоких концентраций солей | 36 |
| 4.2 Молекулярные адаптации к высокой солености | 37 |
| Тема 5 Ацидофилы | 38 |
| 5.1 Физиология и экология ацидофильных микроорганизмов | 38 |
| 5.2 Механизмы противодействия токсичности металлов и кислот | 39 |
| 5.3 Эволюция термоацидофилов и концепция «генов образа жизни» | 39 |
| Тема 6 Алкалифилы | 41 |
| 6.1 Экологическое и таксономическое разнообразие грамположительных алкалифилов | 41 |
| 6.2 Биоэнергетические адаптации к щелочной среде | 41 |
| Тема 7 Пьезофилы | 42 |
| Тема 8 Экстремофилы и проблемы астробиологии | 43 |
| Литература | 47 |

ВВЕДЕНИЕ

Экстремофилами принято называть организмы, которые приспособлены к жизни в экстремальных с точки зрения человека условиях. Разнообразие таких условий на нашей планете достаточно велико – от горячих источников на суше, где действие высоких температур часто сочетается с высокой кислотностью, соленых и щелочных озер, холодных высокогорных пустынь Южной Америки и ледников Антарктиды, до гидротермальных источников срединно-океанических хребтов, в которых вода с температурой до 400 °С под давлением в сотни атмосфер поднимается из трещин в коре, создавая «оазисы жизни» на дне океанов. И во всех этих местах обнаружена жизнь. В наши дни уже деятельность человека создает новые среды обитания, в которых обнаружены микроорганизмы, устойчивые к повышенному содержанию тяжелых металлов, органических растворителей, радиоактивному загрязнению.

Несмотря на то, что примеры адаптаций к экстремальным условиям среды у многоклеточных Эукариот известны достаточно давно, чаще под экстремофилами подразумевают все же одноклеточные организмы, главным образом, Прокариоты. Иногда этот термин также используется как синоним Архей, с чем нельзя согласиться. Представленные методические рекомендации содержат материалы по экстремофилам в узком смысле, представителям двух доменов – Бактерии и Археи.

Еще в середине XX века такие организмы считали скорее «биологическими курьезами», а их изучению уделялось сравнительно мало внимания, однако за последующие десятилетия интерес к экстремофилам значительно возрос и изменился по существу. В настоящее время они широко используются в фундаментальных исследованиях разнообразных аспектов клеточной и молекулярной биологии, расширяют наши представления о многообразии используемых живыми организмами физиологических и биохимических механизмов. Результаты этих работ могут быть в числе прочего применены для реконструкции процесса возникновения жизни на Земле и в ее поисках на других планетах. Помимо большой теоретической важности изучение экстремофилов имеет и серьезное практическое значение. Дальнейшее развитие биотехнологии во многом связывают с получением разнообразных веществ, прежде всего ферментов, сохраняющих свои свойства в крайне неблагоприятных условиях высоких температур, солености, кислой и щелочной среде, в присутствии тяжелых металлов, органических растворителей и под действием радиоактивного излучения.

Несмотря на очевидную важность изучения экстремофильных микроорганизмов, современная обобщающая литература по ним на русском языке отсутствует. В курсе микробиологии для студентов первой ступени

высшего образования экстремофилам уделяется лишь незначительное внимание. Представленные методические рекомендации составлены на основе фундаментальных зарубежных руководств по таксономическому разнообразию, физиологии и биохимии экстремофильных микроорганизмов, опубликованным в последнее десятилетие. Ссылки на эти работы приведены в списке литературы.

Издание содержит теоретический материал для подготовки к практическим и семинарским занятиям в соответствии с учебной программой по дисциплине «Биология экстремофильных микроорганизмов». Рассматриваются вопросы классификации экстремофильных микроорганизмов в зависимости от среды обитания, их применения в исследованиях происхождения жизни на Земле и ее поиска за пределами нашей планеты, промышленного использования экстремофилов; разнообразия, экологии, особенностей физиологии и биохимии термофилов, психрофилов, галофилов, ацидофилов, алкалифилов и пьезофилов.

Методические рекомендации предназначены для магистрантов биологического факультета, обучающихся по специальности «Биология. Функциональная биология». Также они могут быть полезны учащимся других специальностей для углубленного изучения биологии и подготовки к олимпиадам.

Тема 1

ОБЩЕЕ ПОНЯТИЕ ОБ ЭКСТРЕМОФИЛАХ

1.1 Определение экстремофилов и экстремотрофов

Экстремофилы – это организмы, которые приспособлены к оптимальному росту в экстремальных условиях среды или вблизи них. Большинство экстремофилов – это микроорганизмы, которые процветают в условиях, которые с человеческой точки зрения явно враждебны. Термин «экстремофил» впервые был введен Макэлроем в статье под названием «Некоторые комментарии об эволюции экстремофилов». Но определения экстремальных условий и экстремофилов являются, конечно, антропоцентрическими. С точки зрения организма как такового, его среда обитания – это то, к чему он приспособлен и, следовательно, совершенно нормален.

Известно большое число организмов, которые могут выживать и даже расти в экстремальных условиях, которые, однако, не являются для них оптимальными. Такие организмы относят к экстремотрофам. Это различие между экстремофилией и экстремотрофией не просто семантическое. Оно выдвигает на первый план ряд фундаментальных вопросов относительно экспериментальных исследований, таких как: 1) использование для выделения предполагаемых экстремофилов несоответствующих методов; 2) утверждения об экстремофилии, не подкрепленные тщательной проверкой; 3) предположение об экстремофилии, которое может быть опровергнуто при последующем серийном культивировании в лабораторных условиях; 4) недостаточные попытки определить, способны ли организмы адаптироваться только к небольшим различиям в переменных условиях среды. Следует также заметить, что многие виды могут выживать в экстремальных условиях в состоянии покоя, но не способны к неопределенно долгому росту или размножению в этих условиях.

Экстремофилами называют организмы, которые процветают в экстремальных условиях. Чаще всего этот термин применяется по отношению к одноклеточным и прокариотическим организмам. Поскольку многие экстремофилы относятся к домену Археи, а большинство известных архей экстремофильны, иногда термины используются взаимозаменяемо. Однако это очень обманчивая концепция, поскольку многие организмы, принадлежащие к бактериям и эукариотам, имеют экстремофильные или экстремотрофные жизненные циклы. Кроме того, не все экстремофилы являются одноклеточными. Большинство экстремофилов – это микроорганизмы. Например, известная в настоящее время верхняя оптимальная температура роста составляет 113°C для архей (максимальная известная температура для штамма черного курильщика составляет 121°C), 95°C для бактерий и 62°C для одноклеточных эукариот. В то же время многоклеточные эукариоты,

редко демонстрируют рост выше 50°C. Представители архей уникальны своей гипертермофильностью. Оптимальная для их роста температура составляет 80°C и выше. Но организмы, проявляющие гиперэкстремофилию по отношению к другим факторам среды, эволюционировали в каждом из доменов.

Изучению экстремофильных и экстремотрофных эукариотических организмов уделяется значительно меньше внимания по сравнению с их прокариотическими аналогами. Тем не менее, экстремофилия все чаще обнаруживается среди водорослей и грибов. Пример галофильных зеленых водорослей из рода *Dunaliella* был известен в течение нескольких десятилетий. Среди относительно недавно обнаруженных примеров одноклеточных эукариотических экстремофилов / экстремотрофов можно назвать водоросли *Cyanidiales*, которые проявляют облигатную ацидофильность и умеренную термофилию. Подобные приспособления к экстремальным условиям известны у одноклеточных и мицелиальных грибов. Среди представителей рода черных дрожжей *Hortaea* есть экстремальные галофилы и экстремальные ацидотрофы, которые на сегодняшний день являются наиболее устойчивыми к соленой и кислотой среде эукариотическими организмами на Земле. Кроме того, высокая устойчивость к ионизирующему излучению известна для многих таксономических групп дрожжеподобных и мицелиальных грибов.

Начиная с середины 1970-х годов число выделенных новых экстремофильных и экстремотрофных организмов начало заметно возрастать благодаря осознанию того, что жизнь может существовать в экстремальных с точки зрения человека условиях.

1.2 Среда обитания экстремофильных микроорганизмов

Экстремальные условия на Земле возникали и продолжают возникать как следствие тектонической активности плит, динамического характера криосферы и образования бессточных бассейнов. Столкновения тектонических плит приводят к образованию гор на суше, срединно-океанических хребтов, глубоководных желобов, вулканов. В таких местах с высокой тектонической активностью на суше образуются геотермальные, а на дне океанов – гидротермальные источники, известные как черные и белые «курильщики». Как наземные, так и подводные горячие источники являются средой обитания микроорганизмов. Морские гидротермальные источники служат источником тепла и питательных веществ для уникальных глубоководных экосистем, ключевую роль в которых играют экстремофильные микроорганизмы.

Большая часть поверхности Земли содержит воду в твердой форме (морской лед, ледяные шапки и щиты, ледники, снежные поля, вечная мерзлота), образующие криосферу, продолжительность жизни которой

может составлять тысячи или даже несколько миллионов лет. Криосферно-климатическая динамика сложна и влияет на осадки, гидрологию и циркуляцию океана. В регионах с крайне малым количеством осадков и непредсказуемым характером их выпадения, развиваются пустыни, засушливость которых определяется как гипер- (отношение суммы годовых осадков к годовому испарению $<0,05$) или экстремально гипераридные ($<0,002$). В этих условиях, а также в бессточных районах часто образуются соленые озера и котловины.

Учитывая, что средняя глубина мирового океана составляет около 3800 м, высокое давление создает еще одну экстремальную среду. Олиготрофные среды определяются как среды с очень низкими концентрациями питательных веществ. К ним можно отнести воды океанов, значительная часть которых содержит низкое количество железа, нитратов и фосфатов, тропические латеритные почвы и белые пески. Наконец, среда может считаться экстремальной из-за высокого содержания токсичных веществ или воздействия радиации.

Приведенные выше примеры включают в себя большинство доминирующих в мире экосистем, которые эволюционировали в результате естественных процессов в геологических масштабах времени. В относительно недавнее по геологическим меркам время подобные или значительно отличающиеся экстремальные условия были созданы в результате воздействия человека на окружающую среду. Например, засоление почв в результате орошения, промышленное и агрохимическое загрязнение разнообразными ксенобиотиками, радиоактивное заражение.

Следует отметить несколько основных моментов относительно перспектив дальнейшего изучения экстремофилов. Во-первых, разнообразие экстремальных сред, возможно, не исчерпывается уже известными примерами. В наше время продолжают открываться и исследоваться новые экстремальные экосистемы, такие как уже упомянутые глубокоководные гидротермальные источники, морские донные отложения, горные породы в глубине земной коры. Во-вторых, экстремальные условия почти всегда являются комбинацией двух или более факторов среды в их экстремальном проявлении. В-третьих, при описании экстремофилов и экстремотрофов необходимо четко различать организмы только присутствующие, возможно случайным образом, и те, которые растут или метаболически активны в экстремальной среде. В-четвертых, некоторые экстремофильные организмы могут быть выделены из «нормальной» среды. В-пятых, можно ли считать наши знания о разнообразии экстремофилов всеобъемлющими? Результаты недавних исследований говорят об отсутствии доказательств существования ацидопсихрофилов, ацидогалофилов и термогалофилов. Эти вопросы требуют дальнейших исследований. И наконец, вопрос о сохранении того, что можно назвать «очагами разнообразия» экстремофилов. Существует система выявления и сохранения регионов или местностей, которые

обладают необычайно высоким уровнем разнообразия животных и растений. В настоящее время необходима разработка подобной системы для сохранения репрезентативных мест обитания, в которых преобладают экстремофильные и экстремотрофные организмы. Как это ни парадоксально, представляется желательным сохранение в их нынешнем состоянии и некоторых сильно нарушенных экосистем, которые обеспечивают условия для продолжающейся эволюции экстремофилов.

1.3 Классификация экстремофильных микроорганизмов

В литературе встречается ряд терминов, которые используются для описания экстремофилов и экстремотрофов. Также существуют субкатегории для организмов, которые проявляют умеренную, экстремальную, гиперэкстремальную и/или обязательную экстремофилию. Наиболее часто выделяют следующие группы организмов:

Ацидофилы – организмы с оптимальным для роста $pH=4$ и ниже.

Алкалифилы – организмы с оптимальным ростом при $pH>10$.

Эндолиты – организмы, которые живут внутри скал.

Галофилы – организмы, требующие для роста концентрации соли в растворе не менее 1 М.

Гипертермофилы – организмы с оптимальной температурой роста 80 С или выше.

Гиполиты – организмы, которые живут внутри скал в холодных пустынях.

Металлотолерантные – организмы, устойчивые к высокому содержанию тяжелых металлов, таких как медь, кадмий, мышьяк и цинк.

Олиготрофы – организмы, способные к росту в питательно местобитаниях с недостатком питательных веществ.

Пьезофилы – организмы, для которых оптимальные условия роста подразумевают гидростатическое давление от 40 МПа или выше.

Психрофилы – организмы с оптимальной температурой роста 10°C или ниже и максимальной температурой 20 °С.

Радиорезистентные – организмы, устойчивые к высокому уровню ионизирующего излучения.

Термофилы – организмы, с оптимальным диапазоном температур от 60 до 85°C.

Токситолерантные – организмы, способные противостоять высоким уровням вредных веществ, таких как органические растворители.

Ксерофилы – организмы, способные к росту в очень сухих, обезвоженных условиях и устойчивые к сильному высыханию.

Приведенные антропоцентрические определения экстремофилии и экстремотрофии фокусируются на одной экстремальной среде, но многие из этих организмов проявляют экстремофилию по отношению сразу к не-

скольким факторам среды. Например, организмы, живущие в горячих скалах глубоко в земной коре. Явлениям полиэкстремофилии и полиэкстремотрофии посвящено сравнительно небольшое число подробных исследований. Хотя основное внимание здесь опять-таки уделяется прокариотическим организмам, среди эукариот также известны случаи ярко выраженной полиэкстремофилии. В качестве примера можно привести одноклеточную эукариотическую красную водоросль *Cyanidioschyzon* (порядок *Cyanidiales*), штамм которой является ацидофильным (рН 0,2–3,5), умеренно термофильным (38–57°C), обладает высокой устойчивостью к мышьяку и способностью к его биотрансформации.

1.4 Экстремофилы и происхождение жизни на Земле

За последние два десятилетия описание разнообразия прокариотических видов, которые процветают в экстремальных условиях, раньше считавшихся негостеприимными, расширило наше понимание диапазона условий, в которых может существовать жизнь. Открытие ряда видов архей и бактерий, которые живут в условиях воздействия высоких температур, ионизирующего излучения, высокого давления, ультрафиолетового излучения, высокой концентрации солей, сильноокислого или сильнощелочного уровня рН, недостатка питательных веществ, света или воды, подняло ряд вопросов: от возможности считать экстремофилов моделями древнейших организмов, до предположений о том, что их образ жизни может дать представление о внеземных средах обитания, в которых могла развиваться жизнь.

В некоторых исследованиях было показано, что основные черты генетического кода с высокой долей вероятности могли возникнуть в условиях повышенной кислотности окружающей среды или высокого давления. Однако, за исключением термофильных прокариот, филогенетическое распределение других экстремофилов на молекулярных кладограммах не дает ключа к разгадке их возможной древности. Тот факт, что самые глубокие и короткие ветви молекулярной филогенетической модели, основанной на рРНК заняты гипертермофилами, привел к гипотезе высокотемпературного происхождения жизни. Подобные идеи высказывались и ранее, однако именно изучение гидротермальных источников и их сложных микробиот, а также демонстрация сильных восстановительных свойств пирита предоставили серьезные аргументы в ее пользу.

На первый взгляд кажется, что и молекулярные, и палеонтологические данные подтверждают возможность гипертермофильного происхождения жизни. Жизнь на Земле в геологическом масштабе зародилась довольно рано. Поверхность Земли была чрезвычайно горячей вскоре после ее образования. Обычно считается, что планета оставалась расплавленной в течение некоторого времени после своего образования $4,6 \times 10^9$ лет

назад, но результаты исследования древнейших горных пород позволяют предположить существование жидкой воды уже $4,28 \times 10^9$ лет, что говорит о быстром остывании поверхности. Однако теоретические и эмпирические данные позволяют считать, что выделение тепла в результате «поздней тяжелой бомбардировки», происходившей около $3,8 \times 10^9$ лет назад могло полностью испарить океаны.

Гипотеза высокотемпературного происхождения жизни сталкиваются с серьезными проблемами, включая нестойкость предполагаемых основных биохимических соединений, таких как аминокислоты, азотистые основания, РНК и другие термолабильные молекулы, период полураспада которых при температурах между 250°C и 350°C – самое большее несколько минут. Более того, учитывая огромный пробел, существующий в нынешних описаниях эволюционного перехода между пребиотическим синтезом биохимических соединений и последним универсальным общим предком (LUCA) всех существующих живых существ, вероятно, наивно пытаться описать происхождение жизни и природу первых живых систем на основании молекулярных филогенетических построений. Несмотря на то, что Земля на ранней стадии своего существования представляла собой экстремальную среду, экстраполяция молекулярной филогении на пребиотические времена может ввести нас в заблуждение. Более вероятной представляется возможность перехода микробов к гипертермофильному образу жизни в результате вторичных адаптаций, развившихся на ранних стадиях эволюции клеток.

Когда первоначально расплавленная молодая Земля остыла, температура на ее поверхности должна была достигать 100°C , но не могла сохраняться более 20 миллионов лет. Глубоководные гидротермальные источники и другие местные высокотемпературные места обитания существовали на протяжении всей истории планеты и играли важную роль в формировании примитивных сред. Однако скорость термического разложения аминокислот, азотистых оснований и генетических полимеров, которая очень велика в геологическом масштабе времени, является сильным аргументом против высокотемпературного происхождения жизни в гидротермальных источниках.

Поскольку высокие концентрации соли защищают ДНК и РНК от повреждений при нагревании, можно предположить, что этот и другие небиологические механизмы, такие как адсорбция на минеральных поверхностях и образование комплексов нуклеиновых кислот с глинистыми частицами сыграли значительную роль в сохранении органических соединений и генетических полимеров в примитивных средах. Однако такие механизмы были бы неэффективными при температурах $> 100^\circ\text{C}$. Поскольку адсорбция подразумевает образование слабых нековалентных связей, концентрация на поверхности минералов была бы наиболее эффективной при низких температурах; при высоких температурах любые адсорбированные

мономеров будут уноситься в окружающую водную среду и гидролизироваться. Ускорение разложения аденина до гипоксантина при участии Cu^{2+} -монтмориллонита, ассоциация органических соединений с некоторыми минералами может сократить их период полураспада.

Замечательное совпадение мономеров, составляющих живые организмы и веществ, полученных в лабораторных симуляторах пребиотической среды слишком велико, чтобы быть случайным. Но в то же время разрыв между первичным бульоном и миром РНК, т. е. этап эволюции, предшествующий развитию белков и геномов на основе ДНК, во время которого могли существовать ранние формы жизни, в значительной степени основанные на рибозимах, обескураживающе огромен. Соответственно, если гипертермофилия не является подлинно первичной, то теплолюбивый образ жизни может быть реликтом вторичной адаптации, которая возникла после зарождения жизни и до или вскоре после разделения основных филогенетических линий. Так называемый корень универсальных деревьев не соответствует первой живой системе, а является верхушкой ствола еще неопределенной длины, в которой заключена история длинной (но не обязательно медленной) серии архаических эволюционных событий, таких как «взрыв» разнообразия семейств генов и множественных случаев латерального переноса генов. Возможно ли, что следы возникновения гипертермофилии сохраняются в молекулярных записях самых ранних этапов биологической эволюции где-то вдоль ствола основанных на рРНК филогенетических деревьев? Если бы гипертермофилы не были первыми организмами, то их базальное положение в молекулярных деревьях можно было бы объяснить следующим образом:

1. пережиток высокотемпературных условий раннего архея, которые могли быть результатом крупного планетарного столкновения;
2. адаптация бактерий к экстремальным условиям окружающей среды путем латерального переноса обратной гиразы и других термоадаптивных признаков от термофильных архей;
3. вытеснение в ходе конкуренции более древних мезофилов гипертермофилами, изначально адаптированными к стрессовым условиям, отличным от высоких температур.

Хотя были достигнуты значительные успехи в понимании химических процессов, которые могли иметь место до появления первых живых систем, зарождение жизни все еще окутано тайной. Вероятно, разнообразие условий окружающей среды, в которых могут развиваться прокариоты, следует понимать как доказательство их приспособляемости, а не как доказательство того, что зарождение жизни происходило в экстремальных условиях.

1.5 Применение экстремофилов

В различных областях промышленности существует потребность в надежных ферментах, особенно в химической, фармацевтической, пищевой, текстильной промышленности, производстве кормов для животных. Кроме того, необходимы эффективные ферментные системы для расщепления биомассы (возобновляемых ресурсов), которая содержит полимерные субстраты, такие как крахмал, целлюлозу и гемицеллюлозу. Микроорганизмы, обитающие в экстремальных средах обитания, являются хорошим источником таких ферментов (экстремозимов), которые позволяют проводить реакции биотрансформации в нетрадиционных условиях, при которых многие белки полностью денатурируются. Эти ферменты в целом превосходят традиционные катализаторы, потому что они обладают уникальными свойствами – активностью при экстремальных температурах от 0 до 120°C, рН от 0 до 12, а также в присутствии органических растворителей (до 99%). Эти ферменты и другие полезные для человека вещества продуцируются термофильными, термоацидофильными, термощелкафильными и галофильными микроорганизмами, как археями, так и бактериями.

Учитывая уникальную стабильность этих ферментов при высокой температуре, экстремальных значениях рН, высоком давлении, присутствии солей, органических растворителей, детергентов, металлов, следует ожидать, что они станут мощным инструментом в промышленных процессах биотрансформации, протекающих в жестких условиях. Чтобы обеспечить поставки энергии и сырья для различных отраслей в будущем, необходимо разработать новую стратегию, основанную на использовании биомассы. Новые технологии должны позволить эффективное преобразование возобновляемых ресурсов, содержащих полимерные субстраты, например, крахмал, целлюлозу, гемицеллюлозу и масла, в продукты с высокой стоимостью. Применение надежных ферментов и микроорганизмов для устойчивого производства химикатов, биополимеров, материалов и топлива из возобновляемых источников в промышленной («белой») биотехнологии откроет большие возможности для химической и фармацевтической промышленности. Белая биотехнология направлена на сокращение отходов, затрат энергии и сырья, а также на разработку высокоэффективных и экологически безопасных процессов.

Большинство известных на сегодняшний день промышленных ферментов было получено из бактерий и грибов. Ежегодный мировой рынок ферментов оценивается примерно в 5 миллиардов евро. Что касается экстремофилов, на рынок попало лишь несколько ферментов. Специальные ферменты необходимы в различных отраслях промышленности, таких как пищевая, кормовая, текстильная, бумажная, фармацевтическая промышленность и тонкая химия. Быстрое развитие геномики, метагеномики, протеомики, метаболомики, системной биологии и направленной эволюции

должно обеспечить создание биокатализаторов с необходимыми свойствами. Чтобы ответить на вызовы будущего, необходимы инновационные технологии для нового поколения ферментов и биотехнологических процессов.

Уникальные свойства экстремофилов и их ферментов обеспечат им бесчисленные возможности для применения в промышленности. Растущий спрос на более надежные биокатализаторы сместил тенденцию в сторону улучшения свойств существующих белков для установленных промышленных процессов и производства новых ферментов, специально разработанных для совершенно новых областей применения. Новые технологии, такие как геномика, метаногеномика, рекомбинация генов, а также мутагенез, предоставляют ценные инструменты для улучшения или адаптации свойств ферментов к желаемым требованиям. Однако для успеха этих методов требуется производство рекомбинантных ферментов на высоком уровне, позволяющем проводить разнообразные экспериментальные исследования и прикладные испытания. Таким образом, современные методы генной инженерии в сочетании с растущими знаниями о структуре и функциях, а также технологической инженерии будут способствовать дальнейшей адаптации биокатализаторов к промышленным потребностям, поиску новых применений и защите окружающей среды.

Тема 2

ТЕРМОФИЛЫ

2.1 Биоразнообразие в условиях высоких температур

Термальная среда представляет собой удивительный резерват биоразнообразия. В первую очередь – прокариот. У некоторых архей оптимальная для роста температура превышает 100°C. Это огромное биоразнообразие, в свою очередь, стало источником прогресса в областях биотехнологии, эволюционной биологии, астробиологии, биогеографии, биогеохимии и биогеологии. Среди различных типов сред с повышенными температурами, от вулканических и геотермальных, до антропогенных источников и временных тепловых микрониш в мезобиотических средах, существует множество разнообразных уникальных мест обитания, где часто сходятся многие экстремальные условия, например, нагретые солнцем хлоридные (соленые) и карбонатные (содовые) озера. Важный момент, который становится очевидным при изучении этих сред и биоразнообразия архей, бактерий, вирусов и даже нескольких видов эукариот, обитающих здесь, – это огромное разнообразие подходов и методов, которые использовались при попытках описать их условия. Более 350 видов культивируемых термофилов, хорошо описанных и достоверно опубликованных,

не отражает гораздо большее количество прокариот, известных в настоящее время только по последовательностям 16S рРНК, полученным из этих сред. Определение генетического разнообразия 16S рРНК и функциональных генов, которое дало возможность открытия многих ферментов для биотехнологии и выделения новых микроорганизмов, дает лишь ограниченную информацию об их численности *in situ* и активности. Среди множества адаптаций к термальной среде, включая метаболические пути, некоторые являются уникальными для термофилов, в то время как другие используются также их мезофильными родственниками. Эти разнообразные виды, отдельные последовательности и варианты метаболизма, в свою очередь, увеличивают экологическое разнообразие биоты планеты и играют важную роль в эволюции и стабильности биосферы. В целом, сочетание частных подходов, применяемых при изучении отдельных сред, с общими подходами для различных сред повысил надежность нашего понимания различных высокотемпературных сред и их биологического разнообразия. Учитывая то, как открытие жизни в мелководных и глубоководных гидротермальных источниках расширило наши представления о глобальном биоразнообразии, новые подходы и открытия, в том числе, возможно, во внеземных термальных средах, будут способствовать дальнейшему развитию многих областей фундаментальной и прикладной науки.

2.2 Функциональная геномика термофильных микроорганизмов

Доступность установленных протеомов термофилов во всем диапазоне температур роста дает возможность для структурных геномных исследований. В настоящее время проводятся интенсивные исследования экспрессии рекомбинантных генов для *Methanocaldococcus jannaschii*, *T. maritima* и *P. furiosus*. Можно утверждать, что структурное геномное исследование одного из «низших» термофилов, таких как *Thermus*, *Thermoplasma* или *Thermoanaerobacter* spp., обеспечит контрольный эксперимент по определению основы термостабильности белков, облегчения сравнительного исследования гипертермофилов. В будущем мы можем ожидать получения последовательностей генома «высших» гипертермофилов. Недавно описанный для архей штамм 121, выделенный из подводного источника, может медленно расти в условиях автоклавирования. К сожалению, как у *P. fumarum*, так и у штамма 121 последовательности генома не были опубликованы, что ограничивает возможности сравнительных исследований.

Исследования на основе микрочипов, которые уже ведутся с использованием информации о геноме *P. furiosus*, будут иметь важное значение для изучения общей регуляции стресса. Недавнее открытие репрессора, который опосредует реакцию на тепловой шок у *P. furiosus*, и продолжающаяся работа с репрессором бактериального типа обещают быстрое накопление

информации о регуляции генов. Кроме того, хотя многие детали работы репликационной вилки ДНК проясняются в результате изучения экстремальных термофилов, таких как *S. solfataricus* или *M. thermautotrophicus*, механизм инициации репликации ДНК остается неясным. Предположительно, решение этой проблемы также даст ценную информацию о механизмах регуляции клеточного цикла у архей.

Недавно было показано, что мезофильные археи кодируют 22-ю аминокислоту, пирролизин, с использованием кодона UAG и соответствующей специфичной тРНК. Хотя это еще не подтверждено для термофильных архей, кажется вероятным, что повторное исследование известных геномов может выявить кодоны UAG, кодирующим пирролизин.

Исследования термофилов продолжают развиваться как в фундаментальной, так и в прикладной науке. Например, исследование механизмов преобразования энергии в их клетках может быть использовано в будущем для производства топлива, поскольку многие анаэробные гипертермофилы выделяют водород или метан. Требуются дальнейшие исследования физиологии роста и молекулярной биологии гипертермофилов и галофилов для определения потенциала их применения в производстве газообразного топлива и термостабильных ферментов в биотехнологии.

2.3. Адаптации нуклеиновых кислот к высокой температуре среды

Ответ на вопрос о том, как нуклеиновые кислоты гипертермофилов преодолевают действие высоких температур представляется сложным из-за широты проблемы. Действительно, разнообразие последовательностей и структур нуклеиновых кислот, часто делает невозможным распространение закономерностей, установленных для одного типа макромолекул, на все остальные типы. Мало что известно о внутриклеточной химии и физической организации клетки, в которой существуют ДНК и РНК. Кроме того, наличие различных взаимозависимых факторов, действующих совместно, затрудняет изучение адаптаций к каждому из них в отдельности.

Стратегии стабилизации РНК и ДНК можно разделить на три основные группы: 1) стратегии, присущие химической структуре нуклеиновых кислот; 2) зависящие от взаимодействия с другими биомолекулами; 3) зависящие от ферментных систем, способных обнаруживать и восстанавливать повреждения ДНК или постоянно обновлять функциональные молекулы РНК. Эти адаптивные метаболические процессы «контроля качества» применимы не только к ДНК и РНК, но и к белкам, липидам и всем промежуточным метаболитам, которые прямо или косвенно участвуют в процессах синтеза и созревания ДНК и РНК. У термофильных прокариотов эти биосинтетические процессы, многим из которых все еще уделяется недостаточно внимания, могут быть более сложными и эффективными, чем гомологичные метаболические процессы у мезофилов и психрофилов.

Полное понимание того, как нуклеиновые кислоты в составе целых термофильных организмов могут справляться с высокой температурой, может быть достигнуто, только на основе анализа многих синергических факторов.

Следует помнить, что большинство идентифицированных биомолекул и метаболических процессов, которые могут объяснить устойчивость нуклеиновых кислот у термофильных организмов, получены в результате исследований *in vitro*. Чтобы лучше понять важность каждого отдельного параметра, необходимы более глубокие знания о внутреннем биохимическом составе и, что, вероятно, наиболее важно, об организации этих молекул в пространстве клетки. Требуется более систематическое использование штаммов, мутантных по одной или нескольким биомолекулам, предположительно участвующим прямо или косвенно в стабилизации нуклеиновых кислот, за исключением нескольких случаев, этот генетический подход ранее почти не применялся из-за недостатка знаний о генетической динамике гипертермофилов. Однако, в сочетании с современными доступными методами функциональной геномики и потенциальной прогностической силой систематических анализов *in silico* экспоненциально увеличивающегося числа полностью секвенированных геномов термофилов, он должен позволить систематическое определение молекулярных основ термофилии, открытие новых аспектов у Архей, установление точной филогенетической взаимосвязи всех существующих форм жизни и, возможно, разработку полезных продуктов для промышленного применения.

2.4 Проблема термолабильности метаболитов и пути ее решения микроорганизмами

Многие низкомолекулярные метаболиты и коферменты, используемые гипертермофилами в их биохимических путях, термически нестабильны. Некоторые из них, такие как фосфорибозиламин (PRA) и Карбамоил фосфат (CP), чрезвычайно термолабильны. Термическая (не)стабильность метаболитов и коферментов представляет собой важный аспект молекулярной физиологии гипертермофилов, которому, однако, уделялось недостаточно внимания. Гипертермофилы, по-видимому, преодолевают ограничения термолабильности метаболитов и коферментов, за счет ряда механизмов, включая быстрый оборот этих веществ или повышенную каталитическую эффективность, локальную стабилизацию, замену или обход, компартментацию или использование «метаболических каналов» (*metabolic channeling*). Однако подробной информации об этих механизмах пока недостаточно.

Достаточное количество термочувствительных соединений может быть получено за счет их быстрого повторного синтеза. Однако такая стратегия требует значительных затрат энергии. Замена или обход позволяет избежать термической нестабильности метаболита за счет использования

более стабильного альтернативного соединения или альтернативного пути. Термическая стабильность многих метаболитов (НАДН, АТФ) сильно зависит от физиологических условий. Вероятным способом защиты этих молекул от термической деградации могут быть изолированные участки внутри клетки с более мягкими условиями. Термофилы и гипертермофилы накапливают совместимые органические растворенные вещества. Было высказано предположение, что помимо осморегуляции, они могут действовать как термозащитные средства. В качестве механизма преодоления термической нестабильности субстратов была предложена очень высокая каталитическая эффективность некоторых ферментов. Например, фосфорибозилантранилат изомеразы (PRAI) *T. maritima*. Некоторые примеры демонстрируют, что метаболические каналы, т.е. прямой перенос метаболита между последовательными ферментами в метаболическом пути, может быть эффективной стратегией защиты химически лабильных промежуточных продуктов. Существование метаболического канала подразумевает некую структурную организацию ферментов метаболического пути.

За последнее десятилетие стало ясно, что цитоплазма – это не просто вместительное место ферментов и субстратов, а, скорее, высокоорганизованная и структурированная система. Компартиментация уже давно признана важной и, вероятно, необходимой структурной особенностью клетки. Но, хотя идея микроструктуры цитоплазмы уже осознана, ее влияние на физиологические процессы еще не до конца понятны. Компартиментация не только определяет структурную организацию живых клеток, но и создает уникальное физико-химическое окружение, обусловленное различными поверхностными свойствами (например, поверхностным зарядом) фосфолипидных поверхностей, белков и комплексов нуклеиновых кислот. Цитоплазма живой клетки содержит значительное количество растворенных веществ и макромолекул. Становится все более очевидным, что повышение концентрации, в том числе вследствие уменьшения объема компартиментов, приводит к значительным сдвигам в скоростях и равновесиях для многих реакций макромолекул по сравнению с реакциями, проходящими в разбавленном растворе. Скопление макромолекул способствует образованию компактных структур и макромолекулярных комплексов и форсирует образование (растворимых) гомо- и гетероолигомеров. Важно отметить, что скученность не приводит к образованию между макромолекулами нетипичных связей, но усиливает присущую им тенденцию к специфическому связыванию. Скученность в клетке, по большей части, является избирательной и специфичной, поскольку эволюция, по-видимому, сохранила не только функциональные участки белковых молекул, но и структурные особенности, которые могут определять способность белков связываться друг с другом. Клетка – это динамическая система, вовлеченная в различные физиологические процессы, с множеством взаимосвязанных реакций, протекающих одновременно. Клеточная биохимия,

по-видимому, в значительной степени управляется набором белковых комплексов, а не белками, которые действуют индивидуально и существуют изолированно. Уже несколько лет назад было высказано предположение о том, что ферменты нескольких метаболических путей организованы в структурные и функциональные единицы. Сообщалось о нескольких примерах образования фермент-ферментных комплексов, особенно среди ферментов, которые последовательно связаны в метаболических путях. Помимо стабильных мультиферментных комплексов и многофункциональных ферментов, вероятно, существует множество специфических взаимодействий между растворимыми последовательными ферментами метаболических путей. Предполагается, что эти ассоциации могут направлять промежуточные продукты метаболизма.

В таком канализирующем комплексе промежуточный продукт может передаваться с помощью различных механизмов: промежуточные продукты могут быть ковалентно связаны с качающимся рычагом, они могут проходить через туннель внутри белка, либо благоприятное электростатическое поле между соседними активными сайтами может быть использовано для удержания промежуточных соединений в канале пути вдоль поверхности белка. Другой механизм образования каналов может возникать, когда активные центры двух ферментов временно входят в контакт друг с другом, образуя полость, которая позволяет прямой перенос промежуточного продукта и стерически предотвращает его выход вовне. Несмотря на наличие некоторых примеров, подробная механистическая и структурная информация о механизмах временных фермент-ферментных взаимодействий и соответствующих структурах все еще недостаточна.

Таким образом, метаболический канал для движения промежуточных соединений между физически ассоциированными ферментами, которые являются последовательными участниками метаболического пути, может быть основным термозащитным механизмом для термолабильных метаболитов и, следовательно, может играть решающую роль в физиологии термофилов. Внутриклеточная структура и организация метаболизма могут быть важными факторами адаптации метаболических путей к высоким температурам. Кластеризация функционально родственных генов в опероны могла быть выбрана в качестве механизма, облегчающего ассоциацию белков, стабилизирующих друг друга и / или передающих термолабильные промежуточные соединения. Для лучшего понимания адаптации метаболизма к высоким температурам, помимо внутренней стабильности, необходимо учитывать функциональные потребности белков. Также необходимо накопление большего числа количественных данных о фактической стабильности определенных метаболитов, особенно в условиях *in vivo*.

2.5 Молекулярные адаптации белков к экстремальным температурам

Несмотря на то, что психрофильные и термофильные организмы вместе со всем своим набором белков находятся на противоположных концах температурного диапазона существования жизни, ограничения, налагаемые внешней средой на их белки, не всегда противоположны. Например, температура может не представлять прямой угрозы структурной целостности психрофильных белков. Это связано с тем, что температуры жизни психрофильных белков, хотя и довольно низкие, все же они выше ожидаемых температур холодной денатурации для однодоменных белков в воде в отсутствие денатурирующих агентов. При этом возможность холодной денатурации мультидоменных белков нельзя полностью исключить. Однако настоящим вызовом для психрофильных белков является не сохранение конформационной целостности, а поддержание каталитической эффективности, активности и, следовательно, метаболического потока. Психрофильные белки должны преодолеть ожидаемую более низкую растворимость самих себя, а также растворимость субстратов в воде в сочетании с низкой скоростью реакции при низких температурах.

По сравнению с термофильными и гипертермофильными белками количество доступных последовательностей и структурных данных для психрофильных белков все еще невелико. Следовательно, сравнительных исследований пар белков психрофильный–мезофильный / психрофильный–термофильный или семейств психрофильных–мезофильных–термофильных белков было проведено меньше. Такие исследования выявили ряд исходных тенденций. Например, психрофильные белки часто имеют меньше остатков пролина и дисульфидных связей по сравнению с их термофильными и мезофильными гомологами. Они также, как правило, содержат кластеры глицина, часто вокруг активных центров ферментов. Так, при совместном анализе 21 психрофильного фермента их 427 мезофильных и термофильных гомологов было обнаружено, что Arg и Glu в открытых участках α -спиралей могут быть заменены на Lys и Ala в психрофильных белках. Однако сравнения последовательностей полных геномов термофильных, мезофильных и психрофильных организмов не смогли выявить какой-либо устойчивой тенденции. Но замены Lys→Arg в альфа-амилазе *Pseudoalteromonas haloplanktis* облегчают его адаптацию к холоду. Сравнение последовательностей психрофильных белков, имеющих в базе данных SWISS-PROT, с их термофильными и гипертермофильными гомологами показало большее содержание гидроксильных групп, обусловленное присутствием остатков Ser и Thr, у психрофилов. Увеличение количества этих остатков может потенциально помочь в сольватации психрофильных белков.

Психрофильные белки обладают высокой удельной активностью, но их термическая стабильность относительно невысока. Психрофильные

белки часто более гибкие, особенно в областях рядом с активными центрами. Например, было показано повышенное содержание остатков глицина, локализованных вокруг активного центра щелочной фосфатазы из антарктического штамма TAB5. Считается, что этот кластер глицина в активном центре обеспечивает локальную подвижность. Сравнительное молекулярно-динамическое моделирование трипсинов крупного рогатого скота и лосося в целом не выявило серьезных различий в гибкости двух белков. Однако активный центр адаптированного к холоду трипсина лосося оказался более гибким и относительно легко деформируемым. Это может снизить активационный барьер для связывания лиганда и катализа. Было показано, что электростатические свойства сайта связывания у трипсинов психрофилов и мезофилов различаются, особенно с точки зрения величины отрицательного потенциала в кармане специфичности S1. Путем введения множественных мутаций в психрофильную альфа-амилазу для имитации ее мезофильного гомолога, свиной альфа-амилазы, была установлена центральную роль слабых взаимодействий в модуляции как кинетических, так и термодинамических параметров фермента. Путем компьютерного моделирования очень гибкий участок из сайта связывания субтилизина антарктического *Bacillus* TA39 был внедрен в мезофильный субтилизин *Bacillus lentus*, савиразу. Гибридный белок показал повышенную активность при низких температурах, а также увеличение локального сайта связывания и общей гибкости.

Мезофильные белки также часто содержат очень гибкие, даже внутренне неупорядоченные области. Такие области часто характеризуются повторяемостью (низкая сложность последовательностей), более слабым гидрофобным эффектом (меньшее количество гидрофобных, ароматических или объемных остатков) и более высокой частотой полярных и заряженных остатков. Внутренняя неупорядоченность мезофильного белка может быть связана с конформационной гибкостью психрофильных ферментов, а особенности аминокислотного состава в этих двух случаях могут быть схожими из-за общих основных физических причин. Внутренне неупорядоченные области мезофильных белков часто участвуют в распознавании и передаче сигналов клетками. В таких случаях можно было бы постулировать существование в растворе значительного количества «нативных» конформаций полипептидов, которые отбираются в присутствии партнера(ов) связывания. Для психрофильных ферментов конформационная гибкость необходима для катализа, для захвата молекул субстрата и для высвобождения молекул продукта. Это также требует системной гибкости активного центра фермента, где все конформации полипептидов являются нативными, имеют аналогичные популяции и расположены в нижней части их энергетических воронок.

Было проведено сравнение кристаллических структур трех высокогомологичных (> 65% идентичности последовательностей) аденилаткиназ

с равной длиной белка из психрофильных *Bacillus globisporus*, мезофильных *Bacillus subtilis* и термофильных *Bacillus stearothermophilus*. Три фермента имеют разные температуры оптимальной активности, отражающие температуру жизни исходных организмов. Трехмерные структуры трех аденилаткиназ очень похожи, среднеквадратичные значения для центральных и АМФ-связывающих доменов составляют менее 0,7 Å. Три аденилаткиназы, по-видимому, приспосабливаются к соответствующим температурным условиям посредством тонких изменений нековалентных внутримолекулярных взаимодействий. Адаптации к высокой температуре основаны на электростатических (увеличенное количество ионных пар) и гидрофобных (большее захоронение неполярной площади поверхности) свойствах. Адаптация к холоду в основном происходит через небольшие изменения гидрофобных взаимодействий. Психрофильная аденилаткиназа имеет при наименьшем количестве неполярных атомов наибольшую открытую площадь неполярной поверхности, что дестабилизирует свернутую структуру белка и делает его более гибким. Психрофильная аденилаткиназа имеет наибольшее среднее значение для В-факторов атома основной цепи и редкие кристаллических упаковочных контактов, что указывает на ее большую гибкость. Аналогичные результаты были получены при сравнении гомологичных малатдегидрогеназ (MDH) термофильных, мезофильных и психрофильных организмов, у которых также были отмечены различия в электростатических потенциалах в активном центре трех MDH, которые могут быть важны для эффективного направления субстрата в активный центр.

Способность белков адаптироваться к различным температурам жизни исходных организмов путем модуляции электростатических эффектов стала известна из исследований цитрат-синтазы. В этом исследовании последовательность, структурные свойства и подробные электростатические свойства цитрат-синтазы из гипертермофильных, мезофильных и психрофильных организмов были изучены с помощью вычислительных средств. Во-первых, было обнаружено, что термофильная и психрофильная цитрат-синтазы больше похожи друг на друга, чем на их мезофильный гомолог, как по аминокислотной последовательности, так и по структуре. Более того, как термофильная, так и психрофильная цитрат-синтазы показали повышенное присутствие заряженных остатков, солевых мостиков и их сетей. Однако между термофильной и мезофильной цитрат-синтазами имелись важные различия в расположении заряженных остатков и солевых мостиков, а также в их сетях. Заряженные остатки, солевые мостики и сети солевых мостиков в основном обнаруживаются на границе раздела димеров и в областях активного центра термофильной цитрат-синтазы. Напротив, для психрофильной цитрат-синтазы они были распределены по всей структуре белка и, как правило, лучше экспонировались на поверхности, обеспечивая лучшую сольватацию молекулы белка в воде при низких

температурах. В случае психрофильной цитрат-синтазы вклад свободной электростатической энергии в стабильность белка ($\Delta\Delta G_{ele}$) заряженными остатками показал большие вариации, чем для гипертермофильного гомолога. Активные центры цитратсинтазы содержат несколько заряженных остатков. Было обнаружено, что участки активного центра психрофильной цитрат-синтазы являются более дестабилизирующими, обеспечивая большую гибкость. Недавно на основании экспериментов по гомологичным альфа-амилазам из психрофильных, мезофильных и термофильных организмов было высказано предположение о дестабилизации активного центра психрофильного белка для обеспечения каталитической активности при низких температурах.

2.6 Осмотически активные вещества термофилов

Микроорганизмы могут заселять среду с широким диапазоном концентраций солей, от пресноводных и морских биотопов до гиперсоленых участков с концентрацией NaCl вплоть до насыщенной. Следовательно, они должны адаптироваться к условиям внешней среды, накапливая осмотически активные молекулы, поскольку для деления клеток требуется положительный тургор. Есть два основных механизма, с помощью которых микроорганизмы могут справляться с высокой соленостью окружающей среды. Один связан с притоком неорганических ионов и требует радикальной адаптации клеточных структур к высокой ионной силе. Однако наиболее распространенная и гибкая стратегия заключается в накоплении растворенных низкомолекулярных органических веществ, которые способны обеспечивать надлежащее внутреннее осмотическое давление без необходимости специальной молекулярной адаптации. Эта стратегия широко распространена в биологическом мире и используется организмами различных филогенетических линий, такими как археи, бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы и водоросли, которые полагаются исключительно на накопление растворенных веществ для осмозащиты.

Чтобы достичь осмотического баланса в сильно засоленных средах, эти вещества должны накапливаться в значительном количестве (вплоть до молярного диапазона концентраций) без нарушения клеточного метаболизма, отсюда и термин «совместимые растворенные вещества», введенный Брауном в 1970-х годах. Совместимые растворенные вещества должны быть хорошо растворимыми и обычно принадлежат к одной из следующих групп соединений: аминокислоты, сахара, многоатомные спирты, бетаины и эктоины. Концепция совместимых растворенных веществ, первоначально ограниченная осмоадаптацией, недавно была расширена для учета веществ, которые защищают клетки от различных стрессовых условий, таких как повышенная температура, высыхание или действие свободных радикалов. Соответственно, под названием «совместимые растворен-

ные вещества» можно понимать низкомолекулярные органические соединения, которые накапливаются в ответ на осмотический или тепловой стресс и чье накопление в значительном количестве совместимо с метаболизмом клеток.

Многие термофилы и гипертермофилы были выделены как из пресной, так и из морской воды. Накопление совместимого растворенного вещества происходит не только в ответ на увеличение внешней солености, но и в ответ на повышенную температуру среды. Последнее наблюдение выглядит довольно интригующим, особенно если учесть, что внешняя активность воды практически не меняется при повышении температуры. С другой стороны, хорошо задокументировано превосходное защитное действие совместимых растворенных веществ гипертермофилов на клеточные структуры (а именно белки). Из этих двух наблюдений неизбежен вывод о связи между накоплением совместимых растворенных веществ гипертермофилами и структурной защитой от теплового повреждения. И если такое соотношение правомерно, сразу возникает ряд вопросов. Накапливают ли термофилы те же растворенные вещества, которые используются мезофилами для осмоадаптации? Какие еще вещества могут выполнять в клетке подобные функции? Могут ли они обеспечивать более эффективную защиту от теплового повреждения? Каков механизм их действия? Какие пути используются для их синтеза? Накапливаются ли они в разной степени в ответ на разные стрессовые факторы? Как регулируется их накопление? У нас, возможно, до сих пор нет ответов на многие из них, но бесспорно, что знания в этой области значительно продвинулись за последние два десятилетия, со времени, когда растворенные вещества гипертермофилов были в значительной степени неизвестны, до наших дней, когда многие новые растворенные вещества были идентифицированы, открыто несколько путей биосинтеза и термозащитные свойства этих растворенных веществ хорошо проиллюстрированы, а их применение имеет перспективы в различных областях, от производства косметики до медицины. В связи с повышенной способностью стабилизировать биологические материалы, предполагалось применение этих веществ в промышленности, в связи с чем было зарегистрировано несколько промышленных патентов на их использование.

Поскольку основным недостатком использования ферментов в промышленных процессах является их относительная нестабильность, приводящая к деградации при длительном хранении и многократном использовании, существует большой интерес к методикам, повышающим стабильность ферментов. Поэтому высокоэффективные растворенные вещества, способные стабилизировать ферменты при более низких концентрациях, чем обычные стабилизаторы, в настоящее время рассматриваются в качестве добавок в аналитических / клинических тестовых наборах, при разработке термостабильных вакцин, биосенсоров, косметических средств,

амплификации ДНК и для сохранения клеток. Более того, способность этих растворенных веществ препятствовать агрегации белков и образованию фибрилл может дать подсказки для конструирования шаперонов, полезных для лечения и / или предотвращения заболеваний, связанных с неправильной упаковкой белка.

2.7 Адаптации мембран к высоким температурам

Из всего разнообразия экстремальных условий, с которыми сталкиваются живые организмы, температура, по-видимому, оказывает наибольшее влияние на физико-химические свойства мембран и влияет на фазовое поведение и характеристики проницаемости мембраны. Липиды и мембранные белки гипертермофилов хорошо адаптированы к этому стрессовому фактору окружающей среды. В частности, тетраэфирные липиды гипертермофильных архей хорошо приспособлены для поддержания необходимого для жизни уровня протон-движущей силы мембрану в этих экстремальных тепловых условиях. Кроме того, у некоторых архей в зависимости от температуры роста наблюдаются серьезные изменения липидного состава, которые, вероятно, влияют на проницаемость для протонов. Кроме того, второстепенные липидные компоненты также могут оказывать сильное влияние на общую стабильность мембраны. Способность расти при определенной температуре не только определяется составом мембран, но и является комплексным результатом термостабильности всех метаболических ферментов и клеточных структур. Кроме того, многие гипертермофилы также сталкиваются с другими экстремальными условиями, такими как кислотность среды или высокое давление. Высокое давление может способствовать росту некоторых гипертермофилов без изменения температурного диапазона их роста, но точные молекулярные основы этого барофильного поведения неизвестны. Возможно, барофильность также связана с определенными адаптациями в липидном составе мембран, но этот вопрос еще не изучен. Интересно, что тетраэфирные липосомы чрезвычайно устойчивы к давлению *in vitro*. Терморезистентность и толерантность мембран гипертермофилов, вероятно, является результатом взаимодействия липидов и белков. Действительно, было показано, что состав мембраны влияет на термостабильность белка за счет белок-липидных взаимодействий. Например, исследования восстановления терминальных комплексов оксидазы, выделенных из разных источников, демонстрируют, что термостабильность определяется как происхождением белка, так и составом липидов. На данном этапе взаимодействие между белками и липидами мало изучено и останется перспективной задачей для будущих исследований.

Тема 3

ПСИХРОФИЛЫ

3.1 Экология и разнообразие психрофильных микроорганизмов

Среды обитания с низкой температурой широко распространены на Земле. Однако, несмотря на сходство по температурным условиям, они могут сильно различаться прочими параметрами. Например, условия обитания в морских низкотемпературных средах относительно постоянны, тогда как некоторые условия наземных полярных местообитаний могут существенно колебаться ежегодно, суточно или даже ежечасно. Некоторые из них существовали на протяжении значительной части эволюции планеты, в то время как другие являются результатом совсем недавнего антропогенного воздействия. Вероятное следствие различий в происхождении и физико-химических свойствах низкотемпературных сред обитания состоит в том, что в из них каждой будут обитать существенно разные сообщества микроорганизмов. Более того, из этого следует, что члены этих сообществ будут иметь разные физиологические и биохимические характеристики, которые отражают их специфические приспособления к этим средам обитания. Общее убеждение в том, что облигатные психрофилы преобладают в холодных морских экосистемах, в то время как факультативные психрофилы (психротрофы) более распространены в наземных местообитаниях, косвенно подтверждает эту точку зрения. Недавнее выделение множества новых линий актиномицетов из глубоководных морских отложений также служит подтверждением этого.

Однако подтверждать или опровергать эти прогнозы пока рано. При существующем консенсусе в отношении того, что культурально-зависимые исследования разнообразия дают совершенно нереалистичную картину истинного микробного разнообразия, точные сравнения могут быть сделаны только на основе результатов культурально-независимых методов. Даже филогенетический анализ микроорганизмов отдельных узкоспециальных экологических ниш в низкотемпературной среде ограничен двумя важными факторами. Во-первых, стоимость секвенирования и анализа ДНК обычно ограничивает такие исследования идентификацией нескольких сотен уникальных флотипов, которые обычно составляют лишь небольшую часть от общего микробного разнообразия. Во-вторых, текущее количество накопленных данных о последовательностях гена 16S рРНК таково, что значительная часть запросов к международным базам данных (обычно от 20 до 30%) дает мало полезной информации или вообще оказывается безрезультатно. Несколько факторов, вероятно, убудут способствовать преодолению этих ограничений в течение следующих десятилетий: 1) развитие высокопроизводительного секвенирования с последующим снижением

его стоимости позволит большему количеству лабораторий получить лучший охват микробного разнообразия в любом образце; 2) разработка новых подходов к быстрой характеристике видового разнообразия микроорганизмов; 3) повышение внимания к культивированию «некультивируемых» микроорганизмов будет медленно, но неуклонно обогащать существующие базы данных генетических последовательностей.

Низкотемпературные места обитания имеют значительную экономическую ценность, учитывая, что многие из них являются популярными объектами туризма, либо могут стать таковыми в будущем (например, горные районы, незамерзающие окраины Антарктики). В то же время некоторые из них очень чувствительны к внешним воздействиям. Медленные темпы роста психрофильных микробных сообществ делают их потенциально очень восприимчивыми к физическим воздействиям. Это вызывает беспокойство в связи с прогнозируемым увеличением туристической активности на антарктическом континенте. Климатические изменения потенциально могут иметь более разрушительные последствия для низкотемпературных сред и их специализированных микробных популяций.

Более значительным экономическим потенциалом обладают психрофильные микробные популяции данных местообитаний, которые могут служить в будущем объектами биотехнологии. Неуклонный рост новых методов выявления метагеномных генов, а также продолжающееся расширение рынка промышленных ферментов предполагают, что психрофилы, даже если их использование в настоящее время невелико, будут играть все более важную роль в будущем биотехнологии.

3.2 Жизнь в ледяных образованиях

При рассмотрении потенциальной пользы внеклеточных полисахаридов (EPS) для микробных обитателей переохлажденного рассола, содержащегося в пористой структуре зимнего морского льда в Арктике, возникают многочисленные вопросы. Некоторые из них касаются исключительно морского льда, но многие также актуальны для любых ледяных образований с очень низкими температурами. Например, как бактерия прикрепляется к поверхности кристалла льда, когда система смачивается рассолом (как в морском льду и вечной мерзлоте), или кислой жидкостью (как в ледниковом льду)? Могут ли сложные биопленки образовываться на ледяных поверхностях, как на других поверхностях в более мягких условиях? Какие молекулярные или наноразмерные структурные механизмы позволяют EPS стабилизировать фермент от денатурации в незамерзшем рассоле? Упаковывают ли некоторые вирусы свои деполимеразы таким образом, чтобы усилить активность в незамерзших жидкостях ледяного образования, или их возможность заражения клеток хозяина зависит от присутствия EPS, предоставленных этими клетками? Является ли наличие

собственных ферментов отличительной чертой холодноактивных вирусов? Происходит ли латеральный перенос генов в ледяных образованиях в условиях очень низких температур? Если да, то получают ли организмы в ледяных оболочках выгоду от этого процесса, приобретая признаки, необходимые для выживания, или, позволяющие им процветать при наступлении более мягких условий?

Наши знания о микробной жизни в очень холодных ледяных образованиях накапливались в течение ряда лет, и сейчас можно ожидать ускорения прогресса в решении этих и других проблем. Хотя основное внимание в исследованиях уделяется гетеротрофным бактериям, особенно в случае зимнего морского льда, хемолитотрофные бактерии и все типы архей ждут изучения с разных точек зрения. Давно известно, что вечная мерзлота, как и не замерзшая почва, является средой обитания метаногенных архей. Хотя их активность явно повышается при нагревании, способность метаногенов потреблять CO_2 и H_2 и выделять CH_4 при очень низких температурах неясна. Как было показано для условий холодного ледникового льда, потенциал поглощающих газ (NH_4^+ и CO_2) нитрифицирующих хемолитотрофов, будь то бактерий или архей, позволяет предложить концептуальную модель, согласно которой газозависимые микроорганизмы в целом может хорошо переносить существование в очень холодных ледяных образованиях. Даже в зимнем морском льду, где органические растворенные вещества имеются в большом количестве и имеется достаточно жидкости для их диффузионного и даже адвективного переноса, недавно были обнаружены археи. Здесь же в значительном количестве присутствуют и представители группы бактерий *Cytophaga – Flavobacterium – Bacteroides (CFB)*, многие из которых известны производством экзополимеров и прикрепленным образом жизни. При понижении температуры увеличивалась доля как архей, так и CFB. Несмотря на то, что физиология газозависимых микроорганизмов в этом исследовании не была выяснена и они присутствовали только в небольшом количестве (1–3% от всего микробного сообщества), наличие газообразных веществ, необходимых для существования, может объяснить их устойчивость в условиях доминирования гетеротрофных бактерий. Рядом последующих работ по однолетнему зимнему морскому льду в Арктике было подтверждено присутствие архей с метановым циклом и их устойчивость в условиях -28°C и солености рассола 230‰. Вырабатывают ли адаптированные к холоду археи ЭПС или физиология газозависимых микроорганизмов этого не требует? Избегают ли они таким образом вирусной атаки, или наоборот, провоцируют ее?

Ключевой вопрос эволюции микробной жизни в очень холодных ледяных образованиях на нашей планете или где-либо еще связан с латеральным переносом генов, опосредованным вирусами или свободной ДНК – действительно ли условия в очень холодных ледяных образованиях способствуют генетическому обмену между организмами и даже между

представителями различных доменов, как предполагает ранее упомянутая модель более быстрого контакта фага с хозяином? Если газозависимая физиология обеспечивает преимущество в системе с жестким дефицитом жидкости, особенно в древнем ледяном образовании, можем ли мы обнаружить процессы обмена генами, которые, возможно, способствовали их сохранению или распространению в таких стрессовых условиях? Приоритет в поиске ответов на эти вопросы, очевидно, будет принадлежать геномике и протеомике. Обнаружение генов метаногенных архей в штамме 34Н *C. psychererythraea* представляется многообещающим началом. Наличие больших объемов очень холодного рассола, погребенного в древней вечной мерзлоте, открывает большие перспективы для прямых исследований вирусных и микробных геномов в окружающей среде.

Чрезвычайно холодные ледяные образования – с температурой ниже эвтектики морской воды (-55°C) – редко, если это вообще когда-либо имело место, проверялись на наличие живых микроорганизмов. Такие среды – поверхностный ледниковый лед зимой, ледяные агрегаты в тропосфере – либо редки, либо вообще недоступны на Земле. В других местах, как, например, на Марсе и Европе, они широко распространены. С прикладной точки зрения сохранения культур для исследований известно, что бактерии могут выживать в условиях глубокой заморозки до -80°C в морозильной камере или до -196°C в резервуарах для хранения жидкого азота. Такая работа показала, что высокие концентрации растворенных веществ могут иметь значение для выживания культуры в сочетании со стеклованием – быстрым процессом замораживания, при котором вода переходит из жидкой в «стеклянную» (твердую) фазу, минуя образование кристаллов льда и, таким образом, повреждения ими клеточных мембран. В каком состоянии находятся клетки при этом клетки? Принято считать, что клетки в этом состоянии полностью неактивны. Новые эксперименты со штаммом *C. psychererythraea* 34Н свидетельствуют об обратном. Если исходная суспензия клеток находится в растворе морской соли, обогащенном EPS, синтез белка, по-видимому, продолжается даже при субэвтектических температурах. Индикаторы для измерения синтеза должны входить в клетку при более низких температурах, допускающих диффузию растворенного вещества, но включение в белок, по-видимому, возможно через конформационные изменения ферментов, которые не требуют диффузии.

3.3 Исследование подледных озер Антарктиды и перспективы поиска внеземной жизни

В любой окружающей среде на Земле, какой бы экстремальной она ни была, присутствует жизнь. В последнее время догма о том, что жизнь на Земле возникла и первоначально развивалась в условиях высоких температур, ставится под сомнение. Хотя криосфера традиционно рассматривалась

как лишенная жизни, стало ясно, что, напротив, она обеспечивает существование некоторых из самых необычных и экстремальных микробных экосистем на Земле (и, возможно, также жизнь во внеземных телах). Микроорганизмы были обнаружены в самых разнообразных ледовых местобитаниях, где они остаются жизнеспособными в течение долгого времени. Например, в вечной мерзлоте, полярных океанах и снеге, морском льду, ледниковом льду и криоконитовых отверстиях. В качестве примеров можно привести обитателей ледяных покровов гиперсоленых и других озер, криптоэндолитические сообщества, населяющие трещины и поры обнаженных горных пород в Сухих долинах и других местах Антарктиды; метаногенных архей; и ультрамикрорганизмы, обнаруженные в самой глубокой части 3053-метрового ледяного керна из Гренландии.

Следовательно, возникает вопрос, может ли жизнь существовать в озере Восток и других подледных озера Антарктиды поддерживать жизнь? В пробах замерзшей воды, полученных в ходе бурения 2012 г. были обнаружены фрагменты ДНК как минимум двух видов микроорганизмов, в отношении которых существует уверенность, что они не были занесены с поверхности в ходе бурения. К сожалению, дальнейшие исследования были приостановлены на неопределенный срок из-за сокращения финансирования программы.

Если какие-либо формы жизни действительно существуют в подледных озерах, скорее всего, среди них будут доминировать микроорганизмы. В ходе эволюции микроорганизмы приобрели широкий спектр биохимических, физиологических и морфологических адаптаций, которые позволили им колонизировать любые среды на Земле, в том числе наиболее экстремальные и враждебные. Эти адаптации представляют собой прежде всего приспособительные механизмы к условиям экстремальных температур, солености и pH; новые окислительно-восстановительные пары для производства энергии; новые механизмы получения энергии; стратегии выживания при недостатке питательных веществ. Они чрезвычайно устойчивы. Галофилы были обнаружены во включении кристалла соли возрастом 250 миллионов лет; бактериальная спора была извлечена из янтаря возрастом 40 миллионов лет, помещена в культуральную среду и идентифицирована. Бактериальная жизнь обитает в земной коре на глубине нескольких километров, на дне океана рядом с «черными курильщиками», при очень высоких температурах и давлениях и (как упоминалось выше) при чрезвычайно низких температурах.

Исходя из этого, разумно ожидать присутствия жизни и в подледных озерах. Потомки микроорганизмов, обитавших в антарктической почве до образования ледяного покрова, и/или попавшие в ледяную ловушку из воздуха, а затем в результате крайне медленного вертикального переноса через толщу ледника оказавшиеся в озере, в настоящее время могут процветать в воде и донных отложениях. На дне при наличии

подходящих источников энергии могут также обитать простейшие и мелкие беспозвоночные (например, коловратки, тихоходки, нематоды). В любом случае, в озере Восток и других озерах эти организмы, вероятно, оставались изолированными в течение нескольких миллионов лет. Этот временной промежуток невелик с точки зрения эволюции (принимая во внимание частоту мутаций у прокариот, для расхождения видов может потребоваться до 100 миллионов лет, но его достаточно, чтобы, по крайней мере, произвести такие адаптивные изменения в генотипе, которые непременно сделают его уникальным среди земных организмов. На сегодняшний день мы не знаем ни одного организма, способного одновременно противостоять исключительному набору экстремальных условий озера Восток (низкая температура, высокое давление, темнота, рН, низкая соленость / доступность питательных веществ / энергии и высокие концентрации газов). Если биота на дне озера существует, время изоляции могло быть достаточно долгим, чтобы вызвать заметную дивергенцию, учитывая эволюционное давление в такой экстремальной среде. Изменения фенотипа также могут быть связаны с явлением рекомбинации.

Согласно нескольким гипотезам о происхождении жизни в холодных условиях, открытие бактериальных штаммов, происходящих из этих предковых клеток, должно было иметь большое значение для эволюционных исследований. Чтобы обеспечить метаболическую совместимость, у них должны были постепенно развиваться уникальные стратегии молекулярной, биохимической и физиологической адаптации.

Таким образом, нет никаких сомнений в необходимости согласованно инвестировать средства в адекватную (хотя и дорогостоящую) логистику и предоставить науке инструменты, необходимые для изучения существования подледных озера и получения доступа к ним. На сегодняшний день ледяной керн озера Восток дает обширный обзор жизни во льду и, хотя и косвенно, подо льдом. Поскольку вода пока недоступна, нарастающий лед, ввиду водообмена из-за равновесия процессов таяния – замерзания на границе раздела воды и льда озера, служит наиболее подходящим шаблоном для экосистемы Востока. Таким образом, условия жизни для микроорганизмов, попавших в ледовую ловушку и занесенных в озеро, действительно существуют.

Озеро Восток и другие подледные озера являются уникальным полигоном для изучения существования, эволюции и устойчивости жизни на ледяных лунах и планетах. Это еще одна веская причина для инвестирования ресурсов и энергии в изучение жизни в подледных озерах.

На Европе, одной из лун Юпитера, лед толщиной от 3 до 4 км, по видимому, покрывает жидкий океан глубиной от 50 до 100 км. Поверхность Европы похожа на полярные льдины Земли, что предполагает периодический обмен между ледяной оболочкой и жидким океаном. Национальное управление по авиации и исследованию космического

пространства (NASA) и Европейское космическое агентство (ESA) планируют миссии на Марс с целью поиска жидкой воды, ледяных раковин и свидетельств вымершей или сохранившейся жизни. Водяной лед существует на полюсах и под поверхностью, а марсианские метеориты, содержащие микрофоссилии и химические признаки потенциально биологического происхождения, позволяют предположить, что когда-то здесь были прокариоты.

Опасность необратимого загрязнения внеземных тел биологическим материалом, поступающим с Земли, является серьезной проблемой для космических миссий, проведение которых с этой точки зрения требует крайней осторожности. Следовательно, безопасное бурение и соответствующие экспериментальные процедуры не только являются обязательными для доступа к экосистемам подледных озер, но и будут иметь дополнительную ценность, поскольку могут в дальнейшем быть использованы в астробиологии. Помимо борьбы с загрязнением, внеземные миссии потребуют транспортных средств и максимально компактного оборудования для бурения и решения многих других задач. Для этого потребуется робототехника. Все эти грандиозные задачи непосредственно связаны с исследованиями подледных озер и их выполнение потребует объединенных усилий ряда стран.

3.4 Адаптации мембран микроорганизмов к низкой температуре

В течение многих лет в центре внимания адаптации мембран к холоду (и температурных адаптаций в целом) были изменения состава с упором на содержание в мембранах жирных кислот. Меньше внимания уделяется метаболическим аспектам таких изменений, и практически все наши знания об энзимологии синтеза липидов у бактерий основаны на экспериментах с кишечной палочкой. Ни один экстремофил не был исследован достаточно тщательно и глубоко. Тем не менее, потребность в таких исследованиях сейчас остро ощущается, поскольку становится очевидным существование большего разнообразия механизмов биосинтеза, например, ненасыщенных жирных кислот, чем считалось ранее.

Бактерии обладают интерактивным набором стрессовых ответов с общими элементами, включая двухкомпонентные сенсорно-эффекторные системы и сигма-факторы для координированного транскрипционного контроля биохимических и физиологических адаптаций к изменениям в экстремальных условиях. Общие элементы этих ответов в некоторой степени объясняют скоординированную регуляцию адаптивных изменений, и применение новой технологии геномики / протеомики начинает демонстрировать, насколько обширна координация таких реакций клеточного стресса. Тем не менее, мы все еще очень мало знаем о том, как внутриклеточные явления связаны с регуляцией липидного состава мембран, хотя

в настоящее время наблюдается прогресс в понимании регуляции десатурации мембранных липидов. Следует надеяться, что такой же прогресс может быть достигнут в изучении механизмов контроля текучести за счет изменений в разветвлении жирных кислот, которые используются большинством грамположительных бактерий, и для которых чувствительный к холоду фермент не был идентифицирован. Сходным образом механизм регуляции текучести с помощью цис / транс-изомеризации и синтеза полиненасыщенных жирных кислот (PUFA) еще предстоит выяснить. Если мы хотим понять холодадаптивные изменения липидного состава мембран, необходимы дополнительные физиологические / биохимические исследования метаболизма липидов микроорганизмов и его терморегуляции, в сочетании с подходом геномики / протеомики.

3.5 Холодоустойчивость ферментов

Приспособленные к холоду ферменты психрофильных микроорганизмов имеют структурные особенности, которые, как правило, приводят к снижению стабильности белковой конструкции, главным образом, за счет снижения энтальпии стабилизации, связанной с уменьшением количества и / или силы слабых связей. Эта дестабилизация, по-видимому, необходима для достижения соответствующей гибкости всей или важнейших частей молекулярной структуры и позволяет снизить энергетические затраты на механизмы индуцированной подгонки ферментов и облегчить приспособление субстрата при низких температурах. Каждый фермент использует свою собственную стратегию, совместимую с сохранением структурных характеристик, необходимых для обеспечения адекватной субстратной специфичности. Во многих случаях адаптация кажется неполной, поскольку специфическая активность не достигает уровня активности соответствующих мезофильных ферментов при их собственных температурах окружающей среды. Вероятно, это связано с тем, что «замораживающий эффект» низких температур на структуру не может быть полностью компенсирован гибкостью, обусловленной понижением стабильности. Действительно, стабильность структур достигла своего рода предела, о чем свидетельствует необычно низкая термодинамическая стабильность, ΔG_{stab} , исследованных к настоящему времени холодадаптированных ферментов. Два основных свойства этих ферментов – высокая удельная активность при низких и умеренных температурах и низкая термостабильность, обеспечивающая их быструю инактивацию в сложной смеси, – делают эти ферменты особенно подходящими для различных биотехнологических процессов при низких и умеренных температурах.

3.6 Реакция на холодовой шок

Изучение реакции на холодовой шок у мезофильных, термофильных и психрофильных бактерий показало, что, несмотря на наличие определенных общих для всех этих групп свойств, каждая из них сохраняет уникальные особенности, которые позволяют ей расти при определенной температуре. Исследование этих особенностей также полезно для изучения эволюции. Реакция на холодовой шок осуществляется на различных уровнях, таких как клеточные мембраны, а также метаболические процессы, в частности – транскрипция и трансляция. Белки холодового шока (сспs) играют ключевую роль в борьбе с первоначальным пагубным воздействием холодового шока и поддержании продолжающегося роста организма при низкой температуре. Изучение этих аспектов реакции на холодовой шок дало понимание общих принципов, лежащих в основе клеточных функций, включая функции РНК, мембран и метаболизма. В последнее время исследование реакции на холодовой шок открывает новые перспективы. Многие свойства, которые оказались критическими для реакции на холодовой шок и адаптации бактерий, в настоящее время используются в прикладной биотехнологии. Клеточные явления, происходящие во время реакции на холодовой шок, используются в пищевой промышленности и сельском хозяйстве, а также в исследовательской деятельности. Интеграция структурных элементов, таких как энхансеры трансляции (ТЕЕ), основного белка холодового шока *E. coli* CspA в векторы позволяет поддерживать экспрессию белков с улучшенной растворимостью и стабильностью с необходимой интенсивностью при низкой температуре. Структурные элементы из холодолюбивых бактерий быстро приобретают все большее значение в биотехнологии, например, использование холодноактивных ферментов в пищевой промышленности (при переработке молока для снижения содержания лактозы и при производстве мороженого, производстве пищевых добавок на основе полиненасыщенных жирных кислот из некоторых антарктических морских психрофилов), а также в производстве моющих средств. Таким образом, учитывая новые впечатляющие открытия в этой области, можно с уверенностью утверждать, что изучение реакции на холодовой шок и адаптации быстро приобретает значение как в фундаментальных исследованиях, так и в биотехнологии.

3.7 Восприятие низкой температуры и механизм ответной реакции

Модуляция текучести мембран, по-видимому, имеет решающее значение для восприятия низких температур бактериями, и обычно это достигается путем преобразования насыщенных жирных кислот в ненасыщенные. При этом происходит преобразование физическое изменение упаковки жирных кислот в мембранах, достаточное для активации сенсора,

воспринимающего и передающего сигнал регулятору ответа, который затем вызывает активацию генов, участвующих в модуляции текучести мембран. Аспекты этой двухкомпонентной системы передачи сигнала были изучены в ограниченной степени и применительно лишь к нескольким бактериям. Тем не менее, мы далеки от понимания многих ключевых аспектов механизма передачи сигнала у бактериальных клеток в ответ на низкую температуру. Например, необходимо идентифицировать сенсорную молекулу (молекулы) и регуляторы ответа у различных бактерий; выяснить механизмы перекрестных помех между двумя вышеупомянутыми компонентами; и, в конечном итоге, понять функцию регулятора ответа как индуктора экспрессии генов. Кроме того, остается неясным вопрос о том, как клетка выбирает конкретный датчик, который необходимо активировать, когда один или несколько датчиков воспринимают один и тот же сигнал, и как в таких условиях она выбирает конкретный регулятор реакции? Домены в датчике, которые воспринимают изменение текучести мембраны, и липидные молекулы, которые специфически взаимодействуют с датчиком, еще не известны. Следовательно, решение этих вопросов, в конечном итоге раскрыло бы молекулярные основы восприятия низких температур, передачи сигналов и выживания при низких температурах.

3.8 Изучение геномов психрофильных прокариот

Исследователи в области геномных программ совсем недавно начали заниматься жизнью в условиях низких температур. Поэтому на данный момент невозможно сделать твердые выводы о конкретных ограничениях для поддержания жизни при температурах, преобладающих на дне океанов или вблизи основных центров оледенения Земли. Однако кажется очевидным, что прокариоты процветают в этих условиях при достаточном поступлении необходимых питательных веществ. Некоторые, кажется, даже выработали способы выживать в условиях чередования избытка и недостатка питательных веществ и демонстрировать быстрый экспоненциальный рост, когда эти вещества внезапно становятся доступными. В геномах и протеомах этих организмов можно наблюдать три основных особенности: разнообразные средства борьбы с активными формами кислорода, множество механизмов укладки и разворачивания нуклеиновых кислот и, наконец, смещение в аминокислотном составе их протеома. С выполнением этих функций связано множество индивидуальных решений для конкретных видов, позволяющих справляться с низкими температурами. Через несколько лет станет известно, будут ли подтверждены сохраненные признаки результатами секвенирования многих новых психрофилов.

Тема 4

ГАЛОФИЛЫ

4.1 Биоразнообразие в условиях высоких концентраций солей

Разнообразие микроорганизмов, обладающих необходимыми для жизни в гиперсоленой среде адаптациями относительно велико, в том время как лишь несколько групп макроорганизмов научились жить при концентрациях соли, намного превышающих таковую в морской воде. Многие могут даже жить в условиях насыщенных растворов NaCl, которые встречаются в некоторых естественных соленых озерах, а также в соляных прудах. Было высказано предположение, что способность жить при высоких концентрациях соли могла появиться очень рано в эволюции прокариот и что жизнь могла даже возникнуть в гиперсоленой среде – концентрированном растворе органических соединений в приливных бассейнах, где происходило частичное испарение морской воды. Гипотеза зарождения жизни в гиперсоленых условиях, однако, не подтверждается филогенетическими данными: большинство галофилов расположены на дистальных, относительно «молодых» ветвях филогенетического дерева, основанного на последовательности гена малой субъединицы рРНК. Более того, большое разнообразие стратегий по адаптации к высокой солености среды у современных галофилов свидетельствует в пользу многократного независимого возникновения галофильности в ходе эволюции у представителей всех трех доменов.

Мир галофильных микроорганизмов очень разнообразен. Они рассеяны по всему филогенетическому дереву жизни. Метаболически они почти так же разнообразны, как и «неэкстремофильный» микробный мир: известны галофильные автотрофы и гетеротрофы, аэробы и анаэробы, фототрофы и хемоавтотрофы. Таким образом, гиперсоленые экосистемы могут функционировать в значительной степени так же, как их «обычные» пресноводные и морские аналоги. Из-за отсутствия макроорганизмов и в целом низкой численности хищных простейших плотность микробного сообщества галофилов в гиперсоленой среде может быть чрезвычайно высокой: содержание от 10^7 до 10^8 клеток красных галофильных архей на 1 мл рассола не является предельной для Большого Соленого озера, Мертвого моря и соляных прудов, где они часто придают рассолам ярко-красный цвет. Такая высокая плотность сообществ делает их идеальными модельными системами для изучения функционирования микроорганизмов в природе.

Поскольку осмотическое равновесие цитоплазмы клетки с соленостью окружающей среды важно для функционирования любого галофильного или галотолерантного микроорганизма, существует несколько способов достижения этого состояния. Примечательно, что есть два принципиально

разных подхода к решению проблемы: не допустить попадания соли в клетку или позволить огромному количеству соли (KCl, а не NaCl) проникнуть в цитоплазму. Нет четкой корреляции между филогенетическим положением галофильного микроорганизма и стратегией, которую он использует для достижения осмотического равновесия. Как ясно показывает пример *Salinibacter*, сходные растворы обнаруживаются у совершенно неродственных микроорганизмов.

Применение культурально-независимых методов исследований продемонстрировало высокое разнообразие микробных сообществ в соленых озерах. Несколько недавних открытий сделали возможным культивирование ряда доминирующих форм жизни во многих гиперсоленых средах (плоские квадратные, содержащие газовые вакуоли, археи и *Salinibacter*). Тщательное изучение таких экологически значимых организмов, несомненно, углубит наше понимание функционирования сильно засоленных экосистем, а также прольет больше света на природу адаптации жизни к функционированию при самых высоких концентрациях солей.

4.2 Молекулярные адаптации к высокой солености

Экстремально галофильные организмы требуют для роста высоких концентраций соли. Они накапливают многомолярные концентрации солей в цитозоле, чтобы уравновесить высокое осмотическое давление окружающей среды. Они разработали стратегии адаптации к окружающей среде. При этом на основе информации, полученной при анализе геномов галофилов, были выявлены конкретные клеточные реакции. Их протеомы адаптированы для обеспечения необходимой стабильности и функционирования в условиях высокой концентрации солей. В семи доступных на сегодняшний день структурах галофильных белков, изученных с достаточно высокой точностью, были обнаружены кислотные поверхности, специфические участки связывания ионов и множественные солевые мостики. Эти особенности позволяют привлекать частицы растворителя для стабилизации свернутых активных ферментов и их ансамблей. При исследовании растворов галофильных белков было проведено измерение больших объемов растворителя в возбужденном состоянии. Состав сольватной оболочки – ионов солей и воды – зависит от состава растворителя. Отрицательно заряженная поверхность молекулы обеспечивает растворимость белка, необходимую в обогащенном солями цитозоле. Экспериментальные исследования показали, что в присутствии физиологических солей K^+ динамика галофильных белков обеспечивает не только стабильность при физиологических температурах, но и соответствующую гибкость, способствующую биологической активности. Исходя из универсального поведения галофильных ферментов в различных средах растворителей и их устойчивости к агрессивным средам, можно рассматривать перспективы их биотехнологического применения.

Тема 5 АЦИДОФИЛЫ

5.1 Физиология и экология ацидофильных микроорганизмов

По общепринятому определению ацидофилом считается организм, для роста которого оптимальный рН составляет значительно меньше 7. Нет единого мнения относительно границы рН, которая очерчивает ацидофилию, но следует учитывать, что для экстремальных ацидофилов оптимальный для роста рН <3,0 а для умеренных ацидофилов –от 3 до 5. Следует также отметить, что многие умеренно ацидофильные микроорганизмы могут расти при рН <3, включая мезофилов (например, *Thiomonas* spp. и *Acidobacteriaceae*), умеренных термофилов (например, некоторые виды *Alicyclobacillus*) и экстремальных термофилов (например, некоторые виды *Sulfolobus*).

Чрезвычайная ацидофильность известна исключительно для микробных организмов, как для прокариот, так и эукариот, и утверждение о снижении биоразнообразия с ростом экстремальности параметров окружающей среды, верно для обеих групп. Хотя рост некоторых покрытосеменных (например, *Juncus bulbosus*) наблюдается в сильно кислых озерах, их корневая система находится в донных отложениях, рН которых обычно намного выше, чем в толще воды. Многие эукариотические микроорганизмы, которые были обнаружены в средах с чрезвычайно низким рН, являются скорее кислотоустойчивыми, чем истинно ацидофильными, и могут расти с таким же, или бóльшим успехом в среде с циркумнейтральным рН. Среди эукариот ацидофилы / кислотоустойчивость известна для грибов, например, *Acontium velatum*, устойчивый к меди (14 mM) митоспорический гриб, который растет при рН от 0,2 до 7, и *Scytalidium acidophilum*, который переносит концентрацию меди до 140 mM и может расти при рН близким к 0 (но не при рН > 7), хотя оптимальный для его роста диапазон рН лежит между 1 и 2. Простейшие (жгутиконосцы, инфузории и амёбы) также часто наблюдались в кислых шахтных водах – кислых водах с высоким содержанием металлов, которые поднимаются на поверхность из заброшенных шахт и рудников. Было продемонстрировано, что они питаются хемолитотрофными и гетеротрофными ацидофилами *in vitro* в культурах с рН <2. Микроскопические водоросли, такие как *Chlamydomonas acidophila*, *Euglena mutabilis* и умеренные термоацидофилы *Cyanidium caldarium* и *Galdieria sulphuraria*, могут вносить основной вклад в чистую первичную продукцию в чрезвычайно кислой среде. Многоклеточные формы жизни, как правило, в этих условиях встречаются редко, за исключением некоторых видов коловраток (например, *Cephalodella hoodi*). Обзорам разнообразия эукариот в средах с низким рН посвящен ряд относительно недавних работ по грибам, гетеротрофным протистам, микроскопическим водорослям, коловраткам и ракообразным. При исследованиях эукариотиче-

ских микроорганизмов *in situ* и в лабораторных условиях в основном использовались традиционные (небиомолекулярные) подходы. Совсем недавно биоразнообразие эукариотических микробных сообществ в чрезвычайно кислых (рН 0,8–1,38), богатых металлами и умеренно термальных (от 30°C до 50°C) водах рудника Ричмонд в Айрон-Маунтин, Калифорния, было изучено с использованием биомолекулярных методов. Представители грибов, водорослей и простейших были идентифицированы при помощи геномных библиотек. При этом были обнаружены новые ацидофильные грибы.

5.2 Механизмы противодействия токсичности металлов и кислот

Ацидофилам пришлось разработать высокоэффективные механизмы защиты от высоких концентраций протонов, металлов и полуметаллов. К настоящему времени не известно объединяющего признака, наличие которого могло бы объяснить наблюдаемую высокую устойчивость к металлам и полуметаллам. Описанные на сегодняшний день механизмы очень похожи на те, которые обнаружены у организмов, которые растут при нейтральном рН. Их гены часто присутствуют либо в плаزمиде, либо в транспозонах, что облегчает их распространение путем межвидового переноса генов. Однако с быстрым прогрессом в различных областях микробиологии, таких как экологическая геномика, микробная биохимия, и появлением новых прикладных спектроскопических методов, таких как инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье, в ближайшие годы можно ожидать значительного прогресса в выяснении механизмов устойчивости.

5.3 Эволюция термоацидофилов и концепция «генов образа жизни»

Термофильные и ацидофильные археи принадлежат двум филогенетическим линиям – евриархеотам и кренархеотам. Большинство этих микроорганизмов являются аэробными или микроаэрофильными гетеротрофами, которые часто живут в одной и той же среде обитания. Все более широко признается, что микроорганизмы, живущие вместе, обмениваются генами с более высокой частотой. Когда в 2000 г. был секвенирован первый геном ацидофильных архей, *T. acidophilum*, было обнаружено, что между *Thermoplasma* и отдаленно родственным кренархеотом *S. solfataricus*, обитающим в той же среде, имел место обширный горизонтальный перенос генов (ГПГ). Таким образом, гены *T. acidophilum* можно отнести к двум классам: «гены домашнего хозяйства», которые соответствуют филогенетическому происхождению организма, и «гены образа жизни», которые обычно связаны с метаболизмом и имеют ближайших гомологов у *S. solfataricus*. Последний класс генов включает, например, весь набор белков, необходимых для использования экзогенных пептидов – внеклеточные протеазы, системы транспорта олигопептидов, трикорновую протеазу (tricorn protease) и ее кофакторы. С получением еще нескольких

геномных последовательностей ацидофильных архей, обширный ГПГ между кренархейными и эвриархейными ацидофилами был дополнительно подтвержден. Если принять в качестве порогового значения идентичность 30% аминокислотной последовательности, то *P. torridus* имеет почти такое же количество гомологичных генов, что и экологически сходные и филогенетически близкие *T. acidophilum*, а также экологически схожие, но филогенетически отдаленные *S. solfataricus* (66% и 58% соответственно). Напротив, значительно меньшее количество гомологов характерно для филогенетически и экологически обособленного *P. furiosus* (35%), гипертермофильного архея, выделенного из абиссальных источников. Еще 13,5% открытых рамок считывания у *P. torridus* имеют гомологи у *S. solfataricus*, но не в геноме *T. acidophilum*, что позволяет предположить относительно недавний (после разделения *Picrophilus* и других линий) перенос этих генов. Важно отметить, что эти предполагаемые события ГПГ должны происходить в горячей и кислой среде, которая представляет собой препятствие для прямого переноса ДНК между клетками. С другой стороны, сильное давление отбора, обусловленное этими суровыми условиями, может быть причиной наблюдаемой высокой частоты общих генов, поскольку большинство этих генов могут быть связаны с образом жизни экстремальных ацидофилов. Другая убедительная линия доказательств частого генетического обмена в чрезвычайно кислой среде происходит от прямого секвенирования, близкого к полному, двух геномов организмов, образующих биопленку в кислых шахтных водах. Отдельные геномы популяции *Ferroplasma* типа II, одного из видов, доминировавших в биопленке, имели «мозаичную» структуру, т. е. содержали различные комбинации трех основных генотипов (в виде нуклеотидных полиморфизмов), найденных в популяции. Кроме того, авторы смогли оценить, что мозаичный характер индивидуальных геномов должен быть вызван по крайней мере 400 событиями рекомбинации, основываясь на частоте переходов между тремя паттернами нуклеотидного полиморфизма. Таким образом, в любой момент времени популяция ферроплазм состоит из множества слегка различающихся комбинаторных геномных вариантов, генерируемых, скорее всего, в результате гомологичной рекомбинации, что больше напоминает организм, размножающийся половым путем. Хотя в приведенном выше примере наблюдаемая вариация последовательности находится на уровне популяции (внутривидовом), можно ожидать, что частота, с которой микроорганизмы интегрируют дивергентную ДНК, будет увеличиваться с усилением положительного воздействия передаваемых генов. Важно отметить, что эти результаты показывают, реальное существование генетического обмена, затрагивающего большие области генома, в жаркой и кислой среде, типичной для ацидофильных архей. Фактические механизмы переноса генов среди экстремальных ацидофилов до сих пор неясны; однако конъюгация и трансдукция представляются более вероятными по сравнению с трансформацией путем поглощения «голой» ДНК, поскольку можно ожидать, что ДНК будет иметь короткий период полураспада в кислой среде.

Тема 6

АЛКАЛИФИЛЫ

6.1 Экологическое и таксономическое разнообразие грамположительных алкалифилов

За последнее десятилетие было выделено множество грамотрицательных и грамположительных алкалифильных бактерий и определено их таксономическое положение. Теперь мы также лучше понимаем экологическое и таксономическое разнообразие алкалифилов, чем десять лет назад. В естественной среде, несмотря на некоторые исключения, облигатные алкалифилы более распространены в обширных и обязательно щелочных средах, таких как содовые озера, чем в обычных средах, таких как садовая почва. Более того, несколько видов облигатных алкалифилов занимают сходные филогенетические позиции на основе сходства последовательностей гена 16S рРНК. С другой стороны, первоначальное распространение в естественной среде облигатных алкалифилов, выделенных из искусственных сред, таких как чаны для ферментации индиго и растительный компост, еще не известно. Можно предположить, что они повсеместно существуют в искусственной или естественной среде и что они устойчивы к неблагоприятным условиям, таким как засуха, неподходящие значения рН и недостаток питательных веществ. Также неясно, почему факультативные алкалифилы распространены в обычных средах, таких как почва. Можно предположить существование щелочных сред очень ограниченных размеров, которые распределены мозаично. Так, почвенные личинки некоторых насекомых, например, жука *Trypoxylus dichotoma*, имеет высокий рН кишечника, близкий к 10. Такие насекомые могут рассеивать алкалифилов вместе с фекалиями.

В следующем десятилетии наше понимание распространения алкалифилов в окружающей среде и их таксономического разнообразия будет углубляться не только путем выделения новых видов, но и на основе результатов анализов ДНК, непосредственно полученных из различных сред.

6.2 Биоэнергетические адаптации к щелочной среде

До сих пор в центре внимания исследований механизмов поддержания постоянства рН у алкалифилов были активные циклы Na^+ , которые поддерживают этот гомеостаз, и свойства клеточной поверхности, которые играют вспомогательную роль. Проблема большей толерантности алкалифилов, чем нейтрофилов, к повышенному рН цитоплазмы заслуживает большего внимания исследователей. Необходимо выяснить, обусловлена ли она большим набором адаптаций, ли в ее основе лежат всего несколько

ключевых адаптаций. Также требует практической проверки предположение о том, что адаптированные алкалифильные ферменты смогут обеспечить большую устойчивость штаммов нейтрофилов, у которых выявлены мишени, особенно уязвимые для щелочного стресса. По мере развития более разнообразной группы генетически пластичных алкалифилов можно будет изучить следующие вопросы: 1) присутствует ли у кого-либо из них связанная с Na^+ АТФ-синтаза, которая отвечает за окислительное фосфорилирование и, возможно, потеряла способность к связанному с H^+ синтезу; 2) возможен ли для некоторых алкалифилов оптимальный рост при значениях рН цитоплазмы $> 8,5$; 3) создают ли археи или другие необычные алкалифилы достаточно высокие значения $\Delta\psi$, чтобы энергетически компенсировать их ΔpH при закислении; и для дальнейшего определения роли NH_4^+ в биоэнергетике как аэробных, так и анаэробных алкалифилов.

Тема 7 **ПЬЕЗОФИЛЫ**

Пьезомикробиология в наши дни остается одной из слабо разработанных областей экстремофильной микробиологии, хотя она представляет обширное поле для исследований, учитывая, что их среда обитания, глубоководная зона океанов, занимает значительную часть поверхности планеты. Трудоемкость процесса отбора проб и необходимость в узкоспециализированном лабораторном оборудовании являются основными ограничениями для более широкого участия в этих исследованиях. Термин пьезофил (ранее барофил) применяется к микроорганизму, который демонстрирует оптимальную скорость роста при давлении выше атмосферного (1 атм = $\sim 0,1$ МПа). Давление представляет собой фундаментальный и уникальный физический параметр, который оказывает влияние на химические фазы, равновесия и скорости реакций в результате изменения объема системы. Это один из ключевых факторов, наряду с температурой, активностью воды, электромагнитным излучением, окислительным стрессом, окислительно-восстановительным балансом и характеристиками питательных веществ, который управлял эволюцией и распределением жизни как на поверхности Земли, так и в ее глубинах.

Как правило, с увеличением глубины на 10 м давление увеличивается на $\sim 0,1$ МПа (1 атм). Это правило полезно для оценки условий пресноводной и морской среды, а также может применяться к содержащимся в трещинах верхней земной коры водам. Давление в морской среде может достигать ~ 110 МПа (~ 1100 атм) в самом глубоком месте океанического дна, «бездне Челленджера» Марианского желоба (10 898 м). Сообщалось о глубоководных микроорганизмах, способных расти при давлении

до 130 МПа. Среда обитания океанических психрофильных микроорганизмов включает абиссальную и ультраабиссальную зоны, которые характеризуются низкими температурами, отсутствием света, спорадическим поступлением питательных веществ и высоким разнообразием беспозвоночных и позвоночных при низкой биомассе. Абиссальная равнина обычно считается бесплодной пустыней, перемежающейся наличием участков восстановительной среды, таких как гидротермальные источники, зоны холодного просачивания и туши китов. Кроме того, экстремальное давление характерно для океанических и материковых сред обитания в глубоких трещинах земной коры, которые обладают высоким богатством прокариотических форм жизни. Примерами подповерхностных сред служит озеро Восток и другие антарктические подледные озера, Большой Артезианский бассейн Австралии, триасовая рифтовая котловина Тейлорсвилля в Вирджинии, залегающие глубоко под землей нефтяные месторождения и несколько южноафриканских шахт, глубиной более 3 км.

Область исследований в пьезомикробиологии расширяется, и все больше исследователей включается в изучение различных аспектов биологии этих экстремофильных микроорганизмов. Однако отсутствие широкого доступа к местам их обитания и необходимому оборудованию по-прежнему сильно ограничивает развитие этой области. Разработка технологий выращивания глубоководных и подземных микроорганизмов способна внести большой вклад в изучение высокого разнообразия гетеротрофных и автотрофных психрофильных микроорганизмов. Полученные последовательности геномов метагеномов, безусловно, помогут в выявлении ключевых для жизни на глубине адаптаций, а также заложат фундамент для исследования соответствующих генов и регуляторных путей. К настоящему времени описано очень мало генов, необходимых для роста при высоком давлении, но, вероятно, их число значительно увеличится в результате текущих генетических и геномных исследований. Исследования функций макромолекул пьезофилов при высоком давлении все еще находятся в зачаточном состоянии, равно как изучение биологии пьезофильных экосистем и возможности применения этих микроорганизмов в биотехнологии.

Тема 8

ЭКСТРЕМОФИЛЫ И ПРОБЛЕМЫ АСТРОБИОЛОГИИ

Астробиология – это исследование происхождения, эволюции, распространения и будущего жизни во Вселенной. Термин «астробиология» в значительной степени вытеснил термин «экзобиология», который буквально означает жизнь за пределами Земли. В качестве отправной точки поисков жизни за пределами Земли разумно принять выяснение факторов,

которые ограничивают существование жизни на Земле. Кроме того, прежде чем начать поиски жизни во Вселенной, нам нужно точно определить, что мы подразумеваем под словом «жизнь». В подобных рассуждениях мы ограничены знанием единственного известного нам примера – земной жизни. Существует обширная литература, посвященная возможности существования более экзотических форм жизни, основанных на соединениях кремния вместо углерода, растворителях, отличных от воды, и различных альтернативных источниках энергии, таких как осмотические градиенты и магнитная энергия. Известная нам активная жизнь основана на обмене веществ, росте и воспроизводстве. Ее следует отличать от покоящейся жизни в форме различных защитных структур, таких как споры, которые, по видимому, могут выживать в неблагоприятных условиях на протяжении миллионов лет. Существует множество различных определений жизни. Для облегчения задачи по поиску и обнаружению жизни за пределами Земли было предложено следующее определение: жизнь состоит из ограниченных микросред, находящихся в термодинамическом дисбалансе с внешней средой, способна преобразовывать энергию и среду для поддержания состояния низкой энтропии (высокой упорядоченности) и способна кодировать и передавать информацию (Schulze-Makuch and Irwin, 2004). Согласно другому определению, принятому НАСА, жизнь – это самоподдерживающаяся химическая система, способная к дарвиновской эволюции (Benner, 2010).

В таблице 1 указаны экологические ограничения для активной жизни. Энергия, вода и питательные вещества – это ресурсы, которые требуются всем формам жизни. Остальные семь факторов в таблице 1 – это экологические ограничения для активной жизни в том виде, в каком мы ее знаем. Некоторые из этих факторов легче определить дистанционно, чем другие. Например, обнаружить наличие или отсутствие поверхностной жидкой воды на поверхности принципиально проще, чем оценить, все ли основные питательные вещества присутствуют в необходимых количествах.

Таблица 1 – Экологические требования и ограничения для активной жизни на Земле

| Ограничивающий фактор | Требования / ограничения* |
|----------------------------------|--|
| Энергия | Солнечная, геохимическая, геотермальная |
| Вода | Наличие, состав |
| Питательные вещества | C, O, H, N, K, Ca, P, Mg, S, Fe, Cl, Cu, Mn, Zn, Mo, B |
| Температура | -20 to 121°C |
| Соленость | $a_w = 0.6 - 1.0$ |
| Водоотнимающая способность среды | относительная влажность ~ 60 – 100% |

| | |
|--------------------|---|
| Кислотность | pH ~ 0 to >12 |
| Токсичные элементы | Pb, Hg, Cd, Zn, Cu, As, Al, B, Ni, Se, Ag, Mg, Mn, Mo |
| Радиация | Микробы в 4000 раз более устойчивы, чем люди |
| Давление | ~ 0.1 ... >1100 bar |

* Энергия, вода и питательные вещества – это необходимые условия (ресурсы) для жизни. Остальные свойства являются факторами окружающей среды, которые потенциально могут ограничить жизнь; приведенные диапазоны их изменения ограничивают существование активных форм земной жизни.

В поисках признаков внеземных жизни различают следующие направления исследования в Солнечной системе, за ее пределами и поиск разумной жизни.

Вполне вероятно, что в XXI веке большинство потенциально обладающих жизнью тел в нашей Солнечной системе будет исследовано с помощью спускаемых аппаратов или миссий по доставке образцов на Землю. Такие миссии смогут при помощи высокотехнологичного оборудования высокотехнологичную оценить наличие жизни или, по крайней мере, уточнить возможность существования жизни на планетарном теле. В обозримом будущем исследования жизни за пределами Солнечной системы должны будут полностью полагаться на дистанционное зондирование. В настоящее время поиск разумной жизни во Вселенной в основном ограничивается мониторингом радиоволн, который проводится в рамках программы поиска внеземного разума (SETI).

Есть две маркера жизни (биосигнатуры) на Земле, которые могут быть особенно важны в ее поисках за пределами нашей планеты: 1) наличие сложных органических химических веществ и 2) неравновесные концентрации O₂ (или O₃) и метана в атмосфере. К сложным органическим веществам – маркерам жизни относятся хлорофилл, белки, полипептиды и фосфолипиды. Высокое содержание O₂ и O₃ в атмосфере служит важным индикатором, поскольку эти молекулы обладают высокой реакционной способностью. В земной атмосфере поддерживается высокий уровень кислорода (21%), поскольку его продукция в ходе фотосинтеза находится в равновесии с реакциями восстановления O₂.

Наличие атмосферы сама по себе служит маркером (геосигнатурой) благоприятной для жизни среды. Атмосфера способствует смягчению климата, защищает поверхность от радиации и метеоритных ударов, а также предотвращает рассеивание жидкостей и газов в космосе.

Согласно разработанной шкале вероятности жизни (Plausibility of Life, POL) за пределами Земли планетарным телам земного типа с жидкой водой, легко доступной энергией и органическими соединениями была присвоена категория I (высокая). На другом конце шкалы, в категории V (исключена) находятся такие тела солнечной системы, как Солнце и Луна, где условия настолько суровыми, что существование жизни на них

невозможно. Ранее обсуждавшиеся Марс и Европа относятся к Категории II (благоприятная), поэтому этим двум телам Солнечной системы уделяется так много внимания.

Для поисков жизни в нашей Солнечной системе можно использовать все вышеперечисленные признаки: наличие необходимых для жизни ресурсов, ограничений, а также био- и геосигнатуры. В поисках жизни за пределами Солнечной системы внимание следует сосредоточить на 1) источниках энергии (особенно солнечной), 2) присутствии жидкой воды, 3) сложных органических веществ, 4) наличии атмосферы и 5) неравновесном содержании O_2 (O_3).

Наши поиски жизни за пределами солнечной системы должен быть сосредоточен на планетах земного типа, где будут обнаружены сильные маркеры жизни. Такие планеты также могли бы стать дополнительными объектами внимания программы поиска разумной жизни (SETI). Разумная жизнь может быть крайне редким явлением в нашей Вселенной, но наши поиски, особенно в других солнечных системах, должны продолжаться и сосредотачиваться в первую очередь на свойствах, которые легко измерить и которые являются очевидными потребностями и сильными индикаторами жизни. Уже выполнено несколько миссий по поиску экзопланет, результаты которых будут способствовать поиску жизни за пределами Солнечной системы, например, Convection, Rotation, & Planetary Transits (CoRoT), Gaia и Kepler. Их сочетание с данными, полученными в ходе уже выполненных и будущих миссий по изучению Солнечной системы: Кассини–Гюйгенс (Cassini–Huygens), Mars Exploration Rover, Mars Express, Jovian Europa Orbiter (JEO), Jupiter Icy Moon Explorer (JUICE) позволяет надеяться на крупные прорывы в наших поисках жизни за пределами Земли.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Extremophiles handbook / ed. by K. Horikoshi, G. Antranikian, A.T. Bull, F.T. Robb, K.O. Stetter. – Tokyo: Springer, 2011. – 1247 p.
2. Biotechnology of extremophiles: advances and challenges / ed. by P.H. Rampelotto. – Cham: Springer, 2016. – 720 p.
3. Physiology and biochemistry of extremophiles / ed. by C. Gerday, N. Glansdorff. – Washington, DC: ASM Press, 2017. – 429 p.

Дополнительная

1. Жизнь микробов в экстремальных условиях / под ред. Л.В. Калакуцкого, Е.Н. Кондратьевой. – М.: Мир, 1981. – 519 с.
2. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology / ed.-in-chief G.M. Garrity. N. Y.: Springer, 2001–2003. Vol.1–5.
3. Babu, P. Extremophiles and their applications in medical processes / P. Babu, A.K. Chandel, O.V. Singh. – Cham: Springer, 2015. – 54 p.
4. Giddings, L.A. Bioactive compounds from extremophiles: genomic studies, biosynthetic gene clusters, and new dereplication methods / L.A. Giddings, D.J. Newman. – Cham: Springer, 2015. – 58 p.
5. Giddings, L.A. Bioactive compounds from marine extremophiles / L.A. Giddings, D.J. Newman. – Cham Springer, 2015. – 150 p.
6. Giddings, L.A. Bioactive compounds from terrestrial extremophiles / L.A. Giddings, D.J. Newman. – Cham Springer, 2015. – 90 p.
7. Rainey, F.A. Extremophile microorganisms and the methods to handle them / F.A. Rainey, A. Oren // Methods in microbiology – 2006. – Vol. 35. – P. 1–25.
8. Singh, O.V. Extremophiles: sustainable resources and biotechnological implications / O.V. Singh. – Wiley-Blackwell, 2013. – 456 p.
9. Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology / ed. by R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, Ch. Gerday. – Berlin – Heidelberg: Springer, 2017. – 685 p.
10. Tiquia-Arashiro, S. Extremophiles: Applications in Nanotechnology / S. Tiquia-Arashiro, D.F. Rodrigues. – Cham: Springer, 2016. – 193 p.
11. Schulze-Makuch, D. Life in the Universe / D. Schulze-Makuch, L.N. Irwin. – Berlin: Springer, 2004. – 343 p.
12. Benner, S.A. Defining Life / S.A. Benner // Astrobiology. – 2010. – Vol. 10. – P. 1021–1030.

Учебное издание

БИОЛОГИЯ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методические рекомендации

Составитель

ДЕРЖИНСКИЙ Евгений Александрович

Технический редактор

Г.В. Разбоева

Компьютерный дизайн

В.Л. Пугач

Подписано в печать 2021. Формат 60x84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,91. Тираж экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Свидетельство о государственной регистрации в качестве издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/255 от 31.03.2014.

Отпечатано на ризографе учреждения образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.