

# Črno cvetenje Grenlandije

Nina Gunde – Cimerman

Raziskave ekstremofilnih mikroorganizmov, ki naseljujejo najbolj skrajnostna okolja na našem planetu, so ena od najbolj zanimivih vej mikrobne ekologije. Raziskave imajo pridih avanturizma, povezane so s pohodi po naravnih znamenitostih in spominjajo na prigode, ki jih običajni bralci vidijo na straneh revije *National Geographic*. Veter v laseh, nahrbtniki na ramah, v ozadju pa prelepe in divje pokrajine. Vse to drži. Imajo pa te raziskave tudi veliko bolj zapleteno stran, povezano s tveganji in naporji, nabiranjem mikrobioloških vzorcev, v katerih mikroorganizmi zaradi prilagoditev na skrajnostne naravne razmere pogosto ne preživijo prenosa v laboratorij, in z vsemi težavami pri preučevanju, ki iz tega izvirajo.

Znanstvene raziskave ekstremofilov so najpogostejše usmerjene v molekularne prilagoditve, ki ekstremofilom omogočajo preživetje v okoljih, ki so do nedavnega veljala za aseptična. Mnogo je tudi priložnosti za biotehnoško uporabo encimov in drugih molekul, ki so aktivne v skrajnostnih razmerah. Posebna veja ekstremofilne mikrobiologije je astromikrobiologija, ki ni povezana s horoskopom, temveč preučuje Zemljine ekstremofile kot prisposodbe možnega življenja na drugih planetih, kjer vladajo podobne razmere kot na nekaterih območjih na Zemlji, na primer pod več kilometrov debelimi plastmi ledu na Antarktiki ali v skrajno slanih vodah Mrtvega morja med Izraelom in Jordanijo.

Področje ekstremofilne mikrobiologije je razmeroma novo, saj se je v svetovnem okviru razcvetelo šele pred približno petindvajsetimi leti. Takrat smo ljudje začeli spoznavati, da predvsem arheje, pa tudi bakterije lahko naseljujejo skrajno vroča okolja termalnih vrečev in globokomorskih tekton-

skih špranj, kisle vode, s težkimi kovinami onesnažena tla, ledenike in vode, nasičene s soljo. Vsakič, ko je bil objavljen kakšen nov članek s tega področja, je ta prestavil mejo življenja še za nekaj stopinj, še za nekaj pH-enot. Vedno pa so bili glavni nastopajoči preprosti prokarioti - mikroorganizmi brez jedra: bakterije in arheje.

Kaj pa evkariontski mikroorganizmi, na primer mikroglive, bolj poznane kot nitaste plesni in kvasovke? Veljalo je, da so kljub relativni preprostosti preveč zapletene, da bi se lahko prilagodile na tako skrajne razmere in da jih zato tam nima smisla niti iskati.

In tukaj se začne naša zgodba, pred približno dvajsetimi leti, ko se je raziskovalna skupina pod mojim vodstvom vsemu navkljub odločila, da bi bilo vredno vsaj poskusiti. Naše prvo skrajnostno okolje so bile Sečoveljske soline, kjer pridobivajo sol po tradicionalnih postopkih že vsaj sedemsto do osemsto let, verjetno pa še precej dlje. Že prvi poskusi so obrodili sadove. Prve glive, ki smo jih uspeli osamiti, so bile večinoma povsem neznane in zelo črne. Takrat smo se prvič spoznali s črnimi kvasovkami, ki imajo v celičnih stenah pigment melanin. Z melaninom se varujejo pred premočnim ultravijoličnim sevanjem, tako kot tudi naša koža poleti, pa tudi pred drugimi neugodnimi okoljskimi dejavniki. Črne kvasovke imajo mnoge nenavadne lastnosti, med drugim lahko spreminjajo obliko rasti. Pojavljajo se kot kvasovke, plesni, v nitasti obliki in celo v grozdastih skupkih, kjer zunanje celice varujejo notranje pred sovražnimi zunanjimi razmerami. Kmalu smo se naučili, da je o njih v svetovnem merilu znanega izjemno malo, da so redke in običajno zaradi počasne rasti prezrte, saj jih prerastejo druge, hitrejše in bolj tekmovalne glive. Opisali smo za znanost nove vrste, počasi so se



*Helikopter, edino prevozno sredstvo do začasne raziskovalne baze na grenlandski ledeni plošči. Foto: Laura Perini.*

jim pridružile še druge solinske glive, rdeče, bele, roza kvasovke in nitaste glive. S temi raziskavami smo odprli povsem novo področje evkariontske ekstremofilne mikrobiologije v svetovnem merilu, in sicer področje slanljubnih (halofilnih) gliv.

V solinah je voda kemijsko vezana na velike količine raztopljenih soli v slanici in zato ni na voljo mikroorganizmom. Slanice so zato okolje z nizko vodno aktivnostjo, se pravi z majhno biološko dostopnostjo vode. Začeli smo razmišljati, da so tudi drugje okolja, kjer je voda biološko težko dostopna: na primer morski led ali arktični ledeniki, kjer je voda zmrznjena v led. V tistem času je veljalo prepričanje, da ledeniki delujejo le kot časovni stroj. Vodni prš in veter prineseta mineralne delce, cvetni prah in tudi mikroorganizme. Ti se ujamejo v led,

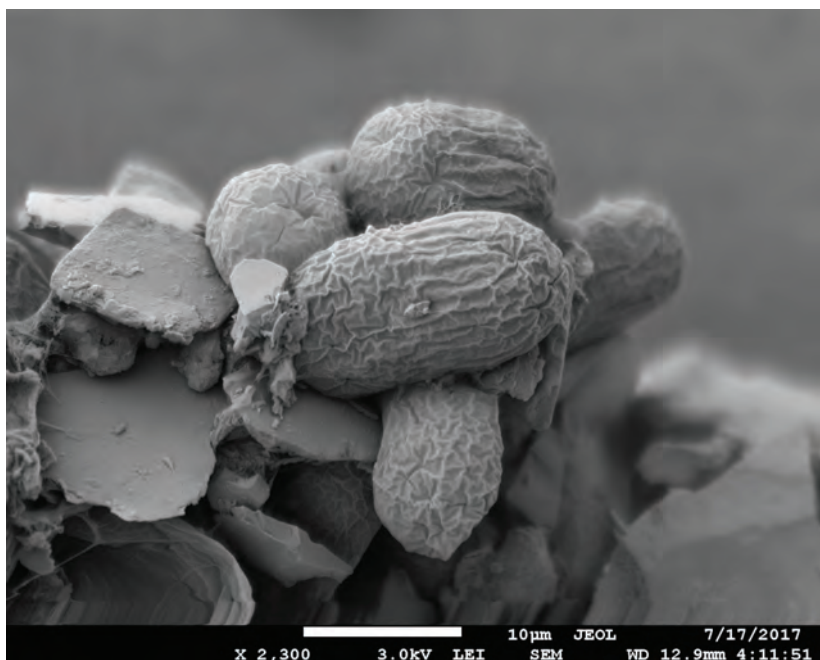
zmrznejo in le posamezni v ledu preživijo. Ti živi fosili se ohranijo tudi več deset tisoč let. Vendar nas niso zanimale posamezne celice živih glivnih fosilov, želeli smo odkriti aktivne populacije gliv, ki morda živijo v ledu. Hipoteze smo pogumno napisali v obliki evropskega projekta, ki je bil na naše veselje in presenečenje odobren. Omogočil nam je dostop do Arktike, najbolj severnega civilnega naselja na svetu, kjer se v kraju Ny-Ålesund na Svalbardu na Norveškem, tik pod severnim tečajem, nahaja mednarodna raziskovalna postaja. Pot na Arktiko je bila nadvse vznemirljiva, narava osupljiva, raziskovalna postaja pa sicer skromna, a izjemno dobro organizirana in opremljena. Kmalu smo bili tudi nagrajeni z rezultati, saj so se naša upajoča raziskovalna predvidevanja pokazala za pravilna. Kot prvi smo

odkrili velike združbe črnih, rdečih in belih kvasovk ter nitastih gliv na bazi arktičnih ledenikov, v tako imenovanem subglacialnem ledu. S tem smo odprli že drugo, povsem novo področje ekstremofilne mikrobiologije – raziskave hladnoljubnih (psihrofilnih) gliv, ki naseljujejo ledenike.

Z delom na Arktiki smo nadaljevali še v okviru drugih projektov in se vsako leto bolj soočali s posledicami globalnega segrevanja, ki so najbolj vidne prav v polarnih območjih. Ledeniki, ki smo jih začeli preučevati leta 2001, so se krčili in mesta vzorčenja so se pomikala z umikajočim ledom. Nismo bili edini, ki smo to opazili, do teh spoznanj so prišli tudi drugi evropski raziskovalci polarnih in alpskih okolij. To je sprožilo pobudo o prijavi evropskega projekta, usmerjenega v posledice globalnega segrevanja na ravni arktičnih mikroorganizmov, ki se sproščajo v okolje skupaj s talečimi ledeniki in predstavljajo še povsem nove in neznane posledice za polarna območja in s tem za ves svet. K sodelovanju smo bili povabljeni kot strokovnjaki za ekstremofilne glive.

Evropski projekt *MicroArctic*, ki je bil odobren leta 2017, še vedno poteka. V njem sodeluje petnajst evropskih raziskovalnih skupin, v okviru vsake od njih bo pridobil doktorat po en podiplomski študent, ki bo s tem tudi prepoznan kot mikrobiolog, specializiran za arktična okolja. V okviru naše raziskovalne skupine je to italijanska študentka Laura Perini, ki je tudi avtorica slik v tem prispevku. Del njenih raziskav arktičnih gliv je bil opravljen na Islandiji, del na arhipelagu Spitsbergen na Svalbardu, del pa tudi na Grenlandiji, v okviru še enega evropskega projekta – *Black and Bloom*.

Od kod to nenavadno, pravzaprav zlovešče ime – Črno cvetenje? Grenlandija je pokrita z ogromnim ledenim pokrovom, ki se razteza na 1,7 milijona kvadratnih kilometrov in je na nekaterih mestih debel cele štiri kilometre. Ta največja količina ledu na severni polobli predstavlja kar enajst odstotkov Zemljine kriosfere in pomembno vpliva na albedo – odbojnost Sončeve svetlobe od bele površine ledu. In prav tu je težava. V zadnjih petnajstih letih je grenlandska le-



*Mesotaenium berggrenii*, glavna med črnimi ledeniški algami.

Foto: Laura Perini.

dena plošča začela vedno bolj temneti. Led postaja sivo črn, umazan in sajast. Razlog za to so pripisali naraščajočim industrijskim izpustom, črnemu ogljiku, kot posledici izgorevanja fosilnih goriv. Umazano siva območja zdaj obsegajo že več kot tretjino grenlandske ledene plošče, zlasti na jugozahodu, in so dobro vidna tudi na satelitskih posnetkih. Ker temni led vpija več svetlobe, se hitreje tali, zmanjšuje se tudi odboj (albedo), staljeni led oziroma voda pronica skozi posamezne špranje v grenlandski ledeni plošči vse do permafrosta. Ta se oddaljuje, metanogene arheje v njem pa proizvajajo vedno večje količine toplogrednega plina metana. Ustvarjena je pozitivna zanka, ki vedno bolj vpliva na taljenje in s tem na podnebne spremembe.

Kaj v resnici povzroča črnenje grenlandske ledene plošče? Mikroorganizmi. Predvsem

cvetenje črnih ledeniških alg, ki živijo samo na površini ledu in nikjer drugje in se v zadnjih letih nezadržno širijo. Staljeni led jim omogoča razmnoževanje in razširjanje na nova območja. Vedno daljša obdobja taljenja ledu povečujejo njihovo biomaso. Te alge so fotosintezni organizmi, vendar imajo poleg pigmenta klorofila še prav poseben, vijoličasto črni pigment s strokovnim imenom purpurogalin karboksilna kislina-6-O-b-D-glukopiranozid. Ta varuje klorofil pred premočnim ultravijoličnim sevanjem, ki so mu na površju ledu izpostavljene alge, imel naj bi pa tudi protimikrobno, varovalno vlogo. Na veliko presenečenje raziskovalcev, ki so mu kot prvi določili kemijsko strukturo, ta fenolni pigment najdemo samo še v lubju nekaterih vrst hrastov in v velikih količinah v lističih fermentiranega črnega čaja! To odkritje je izjemno ne samo zaradi raz-

*Vzorčenje črnega ledu. Foto: Laura Perini.*



sežnosti pojava, temveč tudi zato, ker so te alge najbližje sorodnice prvih kopenskih rastlin in predstavljajo vezni evolucijski člen med vodnimi algami in višjimi rastlinami. Kljub vsem tem posebnostim pa jih preučujemo le z veliko težavo, saj so trenutno negojljive. To pomeni, da jih zaenkrat še nihče ni uspel vzgojiti v laboratoriju. Lahko jih preučujemo le na terenu, na sami Grenlandiji, ali pa prepeljemo sveže vzorce alg, najprej s helikopterji, nato z letali v zmrznjenem stanju v laboratorije. Dokler postopoma ne odmrejo, nato je treba počakati do naslednjega poletja.

Mikrobiološke raziskave črnega cvetenja so bile sprva usmerjene v preučevanje samo alg in bakterij. Z našim sodelovanjem se je začelo tudi raziskovanje gliv, za katere sprva nihče ni verjel, da živijo tudi v tem negotoljubnem okolju.

Glive imajo v naravnih okoljih mnogo pomembnih vlog. Imenujemo jih smetarji naravnega sveta, saj z encimi, ki jih izločajo v okolje, lahko razgrajujejo še tako trdovratne molekule, kot so lignocelulozni rastlinski ostanki, različni industrijski odpadki, napadajo tudi hrano, zaradi njih plesnijo stene v stanovanjih, najdemo jih na usnjenih čevljih, razgrajujejo papir in še veliko bi lahko naštevali. Čeprav so nam marsikdaj zaradi tega zelo nadležne, je njihova vloga v naravi neprecenljiva, saj omogočajo mineralizacijo snovi, ki bi se sicer neporabljene kopičile. Njihove razgradne produkte uporabljajo rastline in drugi mikroorganizmi. V črnem ledu so velike količine alg, ki bi potencialno lahko služile kot vir hrane za glive. Morda jih celo razgrajujejo in s tem odstranjujejo.

Poleg te »smetarske« vloga imajo glive pomembno vlogo tudi v mnogih simbiozah – z rastlinami sodelujejo v mikorizah, z algami pa v lišajih. V obeh primerih glive pomagajo pri dovajanju vode in anorganskih snovi in nudijo zaščito fotosinteznemu partnerju. Rastlina ali alga v zameno glivi dovaja del sladkorjev, pridobljenih s fotosintezo. Teoretično je obstajala možnost, da v črnem le-

du živeče glive sodelujejo z algami v obliki primitivnih protolišajev.

Poleti leta 2017 in leta 2018 smo vzorčili na grenlandski ledeni plošči sneg, vodo na površju ledu, kriokonitne luknje, to so vdolbine na ledu, napolnjene z vodo, ki nastanejo okoli temnih mineralnih delcev, predvsem pa črni led, na gosto poseljen z ledeniškimi algami.

Uporabili smo znanje, pridobljeno v drugih skrajnih okoljih, tako molekularne metode kot tudi različne načine gojenja. V celoti smo osamili več kot dvesto sevov oziroma šestinštirideset vrst gliv. Največ in tudi najbolj drugačne glive smo osamili iz črnega ledu. Med njimi so bile glive, ki jih poznamo kot patogene rastline oziroma take, ki naseljujejo notranjost rastlin (endofiti) v subpolarnem pasu. Osamili smo tudi mnoge bele, rdeče in črne kvasovke ter nekatere nitaste glive. Raziskave saprotrofne vloge teh gliv še vedno potekajo. Poleg naštetih smo osamili tudi dve glivi, ki sta nas še posebej zanimali. Prvo smo določili kot glivo rodu *Articulospora*, ki najverjetneje predstavlja novo vrsto in se je vedno pojavljala v tesni povezavi s skupki črnih ledeniških alg. Sorodniki te glive se pojavljajo v sladkovodnih okoljih kot razgrajevalci lignoceluloznih ostankov rastlin. Druga gliva je nova predstavnik rodu *Penicillium*, znanega po proizvodnji penicilina, ki je bila tudi izjemno pogosta v vzorcih črnega ledu in je bila sposobna rasti na gojišču iz same vode, brez dodanih kakršnih koli hranil tudi več mesecev. Ta izjemna skromnost je presenetila tako nas kot tudi druge mikrobiologe, ki smo jim predstavili to odkritje. Še vedno ostaja neznanka, kako lahko ta gliva v takih razmerah preživi. Zdeli sta se nam najprimernejši kandidatki za preučevanje potencialnega simbiotskega lišaju podobnega sodelovanja z algami. V več tednov dolgem poskusu, tako v temi kot tudi na svetlobi, smo združili glive in alge.

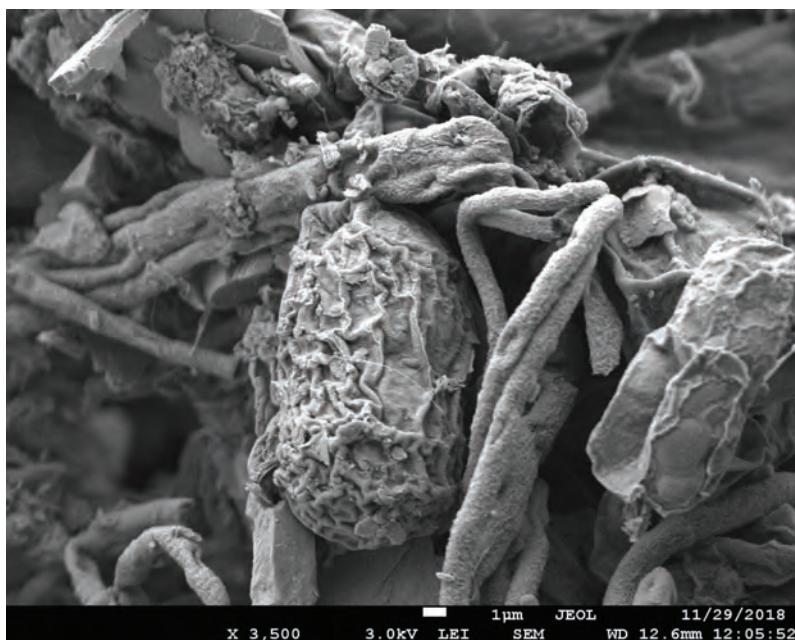
S svetlobnim in elektronskim mikroskopom smo spremljali, kako rastejo skupaj, kako



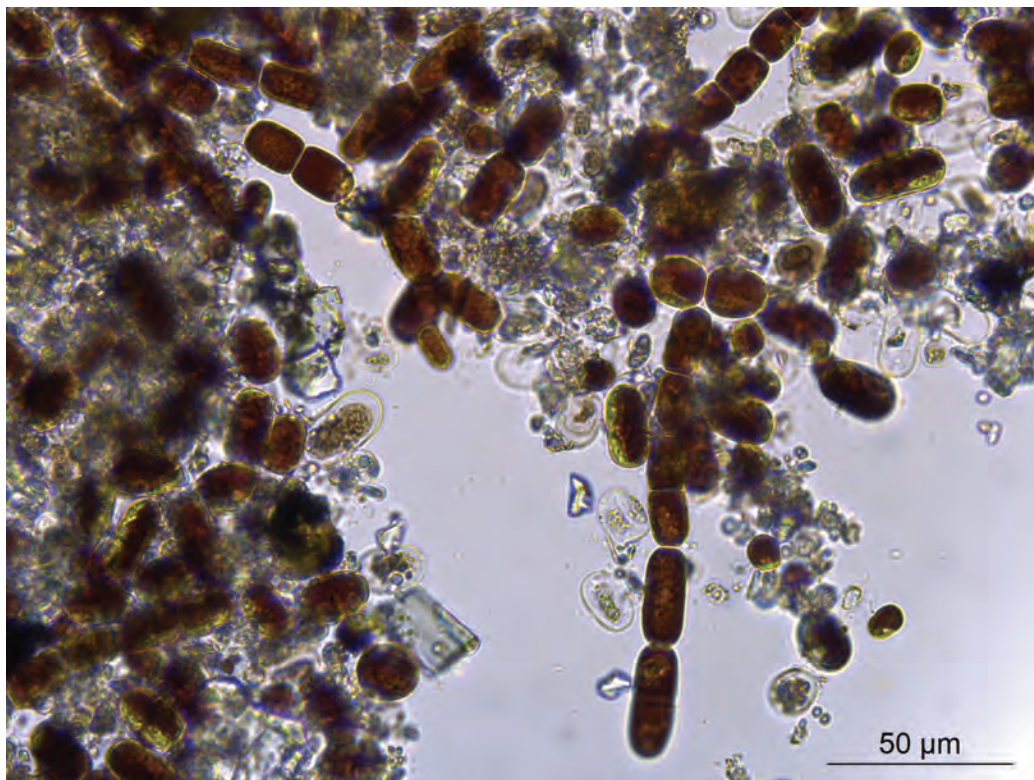
*Taborjenje v mrazu. Foto: Laura Perini.*



*Mehurčkaste zmrznjene kriokonitne luknje. Foto: Laura Perini.*



*Stik med ledeniskimi algami in glivo. Foto: Laura Perini.*



*Zgoraj: Čajanka alg, kot jo vidimo pod svetlobnim mikroskopom. Foto: Laura Perini.*

*Spodaj: Mir ob koncu delovnega dne in sončnem zahodu.*  
*Foto: Laura Perini.*







*Polet nad grenlandsko ledeno ploščo. Foto: Laura Perini.*

poteka fotosinteza, kakšni metaboliti nastajajo in kateri se porabljajo. Na naše veselje in presenečenje smo videli, da po določenem času prepletene glivne nitke (hife) oblikujejo mrežo, v katero so vključene celice alg. Z drugimi besedami, vidimo primitivno obliko lišaja, ki algam najverjetneje pomaga preživeti v tem okolju. Gliva alge varuje, jih pritrdja na podlago, pomaga tudi varovati klorofil, v zameno pa dobi – skodelico čaja! Videti je namreč, da glive razgrajujejo črni pigment purpurogalin in ga uporabljajo kot vir hranil. To povsem novo in presenetljivo odkritje, ki ga je nujno potrebno bolj podrobno raziskati, je prebudilo veliko zanimanje raziskovalcev in odprlo nove poglede na dogajanje na črni grenlandski ledeni plošči. Tam živče glive najverjetneje sodelujejo pri razgradnji alg, mnoge pa jim, tako kot ti dve opisani vrsti, verjetno celo pomagajo pri preživetju in razširjanju. Mikroorganizmi

Grenlandije si torej vsako poletje privoščijo svojevrstno čajanko, ki smo ji priča vsi – in če ne bomo pravočasno ukrepali, se utegnemo z vročim čajem, ki smo si ga sami skuhali, tudi pošteno opečti.

#### *Literatura:*

*Nina Gunde - Cimerman, Polona Zalar, Sybren de Hoog, Ana Plemenitaš, 2000: **Hypersaline waters in salterns: natural ecological niches for halophilic black yeasts. FEMS Microbiology Ecology, 32 (3): 235-240.***  
*Lorena Butinar, Isabel Spencer-Martins, Nina Gunde - Cimerman, 2007: **Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. Antonie van Leeuwenhoek: International Journal of General and Molecular Microbiology, 91 (3): 277-289.***  
*Laura Perini, Cene Gostinčar, Alexandre Anesio, Christopher Williamson, Martyn Tranter, Nina Gunde - Cimerman, 2019: **Darkening of the Greenland Ice Sheet: fungal abundance and diversity are associated with algal bloom. Frontiers in microbiology, 10: 1-14.***