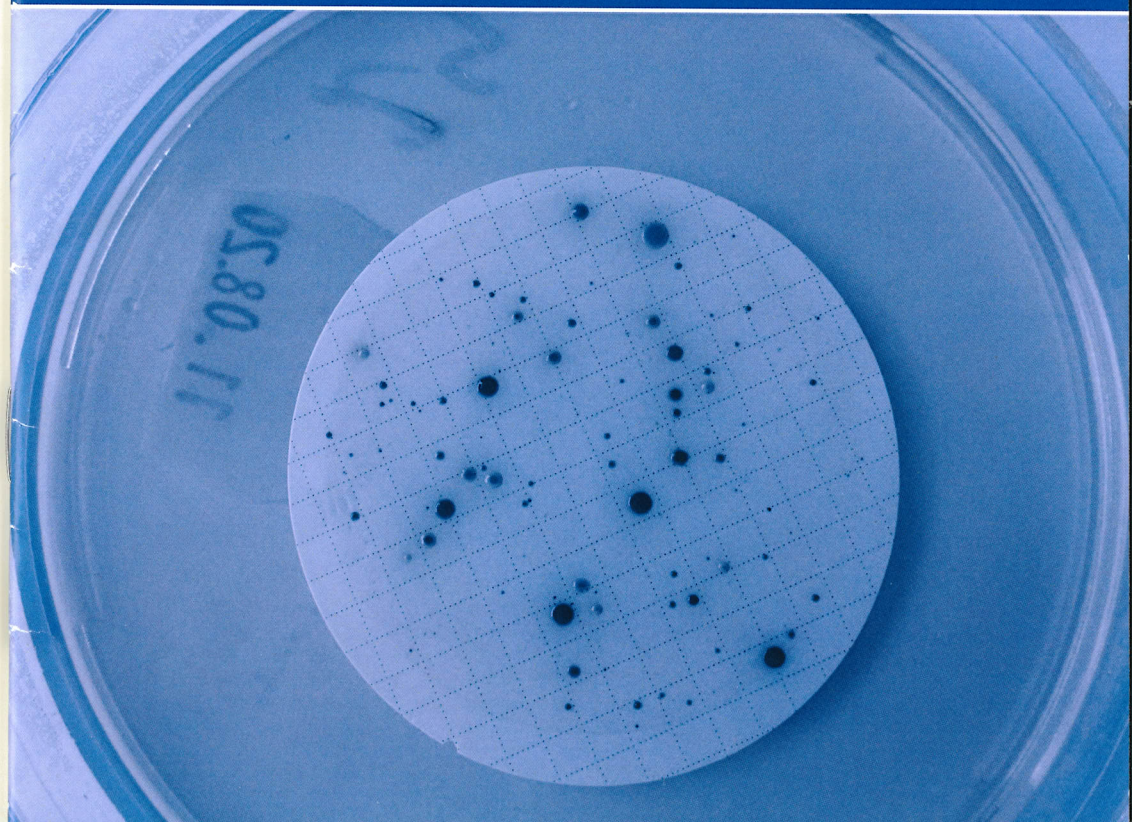


číslo 1 ročník LXIII ISSN 0009-0646 Praha – Bratislava 2022

bulletin

československé společnosti mikrobiologické



O čem neměla Baba Vanga ani ponětí?

David Kaftan

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Centrum Algatech, Třeboň

V tektonicky aktivních oblastech a obzvláště v okolí někdejších vulkánů dochází k ohřevu podzemních vod při jejich kontaktu s magmatem. Na povrch vyvěrající termální prameny obohacené o minerály pak podporují vznik unikátních ekosystémů. Výzkumné objevy uskutečněné na těchto lokalitách jsou nejméně tak traskavé jako vulkanická činnost, která jim dala vzniknout. Asi nejvýznamnějším objevem byla Taq DNA polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* pocházející z horkých pramenů v Yellowstone (Brock et Freeze, 1969). Tento klíčový enzym používaný při PCR je termostabilní, díky čemuž nemusíme při každém cyklu reakce přidávat čerstvý enzym.

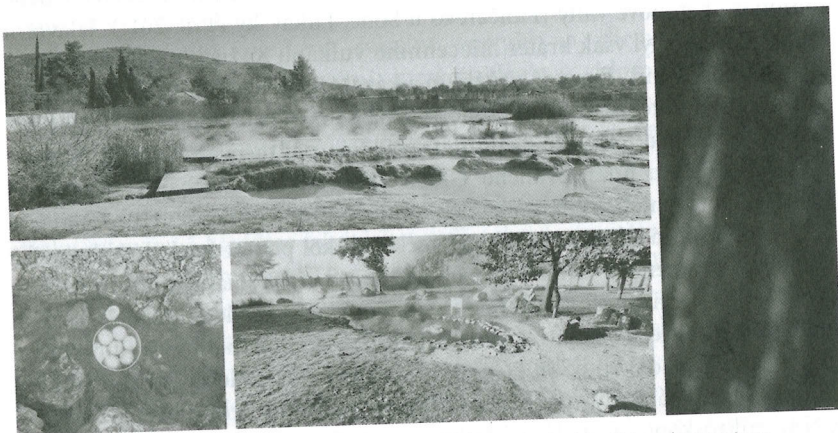
Zdroje povrchových termálních vod jsou často a bohatě osídleny společenstvy fotosyntetických mikroorganismů. Schopnost termofilních bakterií provádět fotosyntézu při vysokých teplotách přitahovala pozornost odedávna, ačkoliv zůstává pořád tak trochu záhadou. Existuje dokonce i několik druhů sinic (Cyanobacteria) fotosynteticky aktivních při teplotách dosahujících a někdy i převyšujících většinu kyslík nevyvíjejících fotosyntetických bakterií. Termofilní sinice k přeměně světelné energie na chemickou využívají fotosystémy téměř totožné s těmi, které najdeme v chloroplastech vyšších rostlin a zelených řas se kterými sdílejí společného předka. Co dělají termofilní bakterie včetně sinic jinak? Můžeme se od nich něčemu přiučit a následně využít při konstrukci hybridních či zcela syntetických fotosyntetických organismů a v biotechnologických procesech? Odpověď na tuto a podobné otázky intenzivně hledáme jak v laboratoři, tak v terénu. Na počátku našeho výzkumu jsme formulovali hypotézu podloženou jen několika známými případy odlišnosti sekvence proteinu D1 ve fotosystému II mezi mezofilními a termofilními sinicemi (Shlyk-Kerner et al. 2006). V následujících letech jsme vpravili mutace dvou klíčových aminokyselin do genomu mezofilní sinice, zelené řasy i vyšší rostliny a studovali vliv na teplotní odolnost nových mutantů. Zároveň nepřestáváme hledat a studovat nové kmeny termofilních a termotolerantních fotosyntetických bakterií v jejich přírodním prostředí. V tomto úsilí ale narážíme na stále intenzivnější snahy využívat termální vodní zdroje pro lázeňství a zemědělství. Mnohé přírodní termální biotopy, především v ekonomicky rozvinutých společnostech, jsou tak beze zbytku likvidovány. Zmizí spolu s teplými prameny i unikátní společenstva teplomilných mikroorganismů nebo se je podaří chránit v míře dostatečné pro jejich přežití?



Obr. 1: Pohled na východ od vesnice Starčevo směrem k vnějšímu okraji kráteru Kožuch (290 m.n.m.) a vrchu Pčelina (239 m.n.m) nalevo za ním. Dvojice vrcholů Golam Carev (2183 m.n.m.) a Gotsev Vrh (2212 m.n.m.) se tyčí mezi nimi na obzoru na hranicích s Řeckem.

Poprvé se tým doc. Michala Koblížka vydal hledat poslední zbytky přírodních horkých pramenů v jižním Bulharsku v roce 2013. V té době bylo cestování v této části Balkánu pořád ještě docela dobrodružné, neboť se modernizace místní dálniční sítě buď stále ještě pouze plánovala, nebo její budování teprve nesměle začínalo. Čtyřčlenná posádka se po cestě napříč východní Evropou zastavila u několika termálních vývěřů. Ukázalo se, že najít v Evropě přírodní horké (>50°C) prameny je dnes již téměř nemožné. Buď na jejich místě vyrostly hotelové komplexy s termálními bazény (Maďarsko), nebo byl pramen vyveden kovovou rourou do betonové vany (Pančarevo u Sofie, Lukavský *et al.* 2011). Hlavním cílem expedice byl však kráter miocenního vulkánu Kožuch na jihozápadním úpatí pohoří Pirin. Prvotní průzkum ukázal, že je lokalita nedaleko Rupite stále nepřiliš dotčená lidskou činností a navíc nebývale bohatá na termofilní fotosyntetické bakterie. Ve výzkumu jsme zde pokračovali v letech 2015-17 v rámci projektu financovaného GAČR (Molekulární mechanismy teplotní adaptace fotosyntetických reakčních center druhého typu). Hned na jaře 2015 jsme uspořádali expedici, která měla za úkol popsat fyzikálně-chemické vlastnosti pramenů a detailně zmapovat jejich mikrobiální fotosyntetickou flóru. Sedmičlenný mezinárodní tým taxonomů, mikrobiologů a molekulárních biologů metodicky postupoval podél teplotního gradientu od vývěru pramene až po tůně zchlazené vody, ve kterých si spokojeně lebedilo hejno kaprů spolu několika exempláři želvy nádherné (*Trachemys scripta*). Sekvenování izolované DNA, mikroskopická analýza i kultivace vzorků potvrdila předpokládanou, avšak na evropském kontinentu dříve nepopsanou vysokou diverzitu termofilní mikrobiální flóry (Strunecký *et al.* 2019) a to nejen z řad zástupců sinic, ale i kyslík nevyvíjejících fototrofů. Náš spolupracovník Marcus Tank z Penn State University tu tehdy dokonce znovuobjevil jediného existujícího zástupce kmene Acidobacteriota - fotosyntetické *Chloracidobacterium* které bylo doposud kultivováno pouze z Yellowstonekého národního parku (Saini *et al.* 2021).

Na podzim 2016 jsem se vydal do Rupite podruhé, tentokrát za doprovodu sinicového taxonoma Otakara Struneckého. Zkoumali jsme sinice a fotosyntetické bakterie rostoucí v místech s teplotou vody v rozmezí 50-73°C. Podařilo se mi izolovat několik cenných vzorků a udržet čisté kmeny v kultuře dodnes. Jednoduchá kokální termofilní sinice *Synechococcus bigranulatus* Skuja 1932 byla již na lokalitě popsána Jaromírem Lukavským, našim kolegou z Botanického ústavu AVČR. Tento kmen je hojně využíván jako zdroj teplotně stabilních fotosystémů pro biosenzorové aplikace (Koblížek *et al.* 2002) a syntetické konstrukty mimikující fotosyntetický elektronový transport. Termofilní druh stejného rodu byl také použit k izolaci a první úspěšné krystalizaci fotosystému 1 (Krauss *et al.* 1996) a nedlouho poté i fotosystému 2 (Zouni *et al.* 2001). Dalším neméně cenným získaným izolátem je vláknitá fotosyntetická bakterie *Chloroflexus aurantiacus* Pierson and Canstenholz 1974, schopná zachycovat energii fotonů pomocí unikátních světlosběrných agregátů bakteriochlorofylů c absorbující světlo (pro bakteriochlorofyly netypicky) v krátkovlnné infračervené oblasti ~740 nm. Struktura těchto kmů není na molekulární úrovni známá. Díky nově získanému kmenu, který na rozdíl od typového kmene toleruje při růstu přítomnost kyslíku se mi podařilo izolovat chlorozómy pro analýzu elektronovou tomografií a přispět tak konečně k vyřešení uspořádání bakteriochlorofylových molekul uvnitř chlorozómů.



Obr. 2: Pára vznášející se nad Rupitskými horkými prameny rozlévající se do soustavy mělkých lagun hojně využívanými veřejností (nahore). V pozadí zeď obepínající komplex chrámu Sv. Petka Bulgarska a domu a hrobu Baby Vangy. Vydávající voda dosahuje maximálně 73°C. Přimo v prameni si lze po vzoru místních připravit chutnou snídani (vlevo dole), nebo nalézt nárůstky termofilní fotosyntetické bakterie *Chloroflexus aurantiacus* (vpravo, obrázek jednotlivých vláken pořízený pomocí AFM, měřítko 500 nm). Zahrada komplexu Baby Vangy skrývá další termální pramen (dole uprostřed). Voda z něj sytí kaskádu rybníčků propojených úzkými kanály (Strunecký *et al.* 2019).

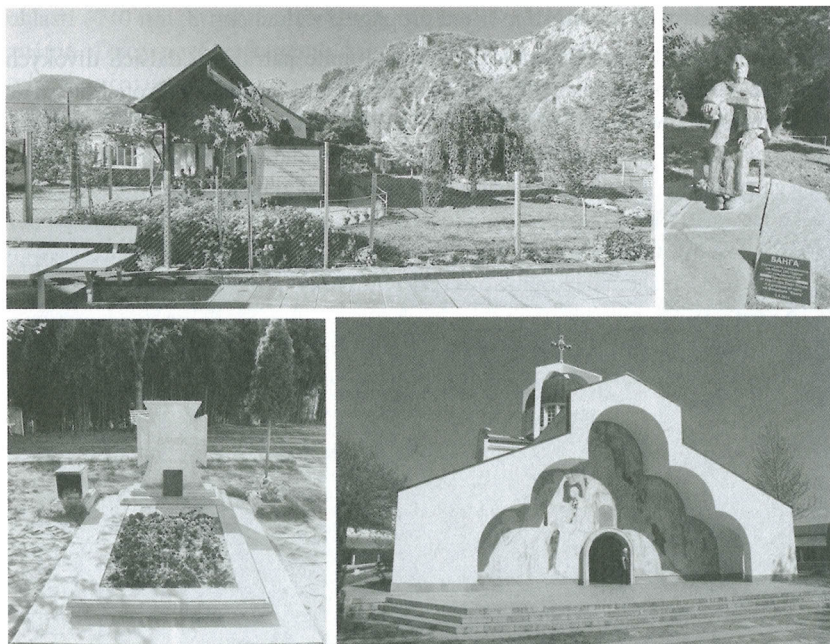
Mojí třetí výpravu za mikrobiální flórou horkých pramenů Rupite jsme odkládali několik let a nakonec jsme se odhodlali ji naplánovat na poslední zářijový týden roku 2021, kdy se pandemická situace v Evropě přeci jen trochu zlepšila. S obavami jsme do poslední chvíle sledovali křivky počtu nakažených ve všech státech po cestě. Expedice byla opět malá co do počtu účastníků. Kromě technické asistence zajištěné Jasonem Deanem se k nám přidal specialista na skupinu Chloroflexi, Vasil Gaisin z Curychu. Já i Jason jsme vyrazili vybaveni certifikáty o bezinfekčnosti, zatímco Vasil těsně před odjezdem ještě čerstvě přeočkoval Sputnika dvěma dávkami od Pfizeru. Jedním z cílů výpravy bylo zkoumat vrstevnatá společenstva Chloroflexů a sinic vytvářející biofilmy na dně kanálů omývaných opět tou nejteplejší vodou dostupnou na místě. Dalším z úkolů bylo kvantitativně odebrat vzorky vzduchu v blízkosti horkého pramene a filtrováním zachytit bakteriální buňky, které mohou být vzduchem od pramene unášeny. To, jak vysoce specializované termofilní mikroorganismy osidlují nově vzniklá stanoviště zůstává doposud zahalené tajemstvím. Jednou z předpokládaných možností je šíření propagulí vzduchem.

Tak jako pokaždé jsme i tentokrát v okolí Rupite pátrali po dalších divokých zdrojích termální vody. S několika tipy se s námi podělila i Prof. Margarita Kambourova z Mikrobiologického ústavu Bulharské akademie věd. Informace jsme se rozhodli ověřit v přílehlé vesničce vyzpovídáním několika domorodců. Kolega ovládající plynně ruštinu se dokonce vydal zeptat do místní knihovny. Nakonec naše hledání dopadlo, jako obvykle. Na místě jsme nenašli nic než chátrající zděný domeček, z jehož útrob se ozývaly temně bublavé zvuky. Necelých sto metrů od něj začínala krajina pokrytá fóliovníky táhnoucími se všemi směry.



Obr. 3: Zdroj termální vody na veřejném koupališti (vlevo) je celé dopoledne zahalen párou. Nad odtokovým kanálem je rozkročena naše aparatura filtrující aerosol unášený směrem od pramene. Hlavní proud pramene (vpravo) stéká po mírném svahu. Jak chladne, mikrobiální společenstva se postupně mění - centrální rezavá zóna, kde při 62°C přežívá hlavně *Chloroflexus aurantiacus* je lemována nejodolnějšími sinicemi např. *Chlorogloeopsis* sp. libující i při 58°C (tmavý okraj).

Naší práci během všech expedic dodával spirituální podporu odkaz místní vědmy známé jako Baba Vanga. Ta přímo zde po desetiletí žila a proslula svými proroctvími, která se prý do puntíku vyplnila. Své místní působiště si zvolila záměrně. Údajně cítila, že je místo naplněno silnou energií. Denně sem proto přijíždí mnoho aut a občas i celý autobus poutníků, kteří jdou tuto energii čerpat. Přístupovou cestu ke chrámovému komplexu lemují řada stánků se zaručeně místními produkty. Obvykle si tu koupím proutěný košík a naplním ho po okraj sklenicemi s medem, marmeládami nebo olivovým olejem. Až letos jsem se odhodlal k degustaci vína. Zcela dle očekávání jsem jako nejlepší vybral borůvkové, protože nic jiného, včetně údajného Cabernet Sauvignon, se nedalo pít. Místní ale obvykle stánky míjejí. Pomalu se šourající babičky jsou nejčastěji doprovázené dcerou a vážným zetěm, který by nejspíš nejraději zůstal se zapálenou cigaretou klábosit s trhovci. Uvnitř komplexu panuje téměř posvátná atmosféra.



Obr. 4: Dům (nahore vlevo), kde Vangelija Pandeva Dimitrova – Gušterova, neboli Baba Vanga (nahore vpravo) bydlela od roku 1970 až do své smrti v roce 1996 stojí uprostřed zahrady. Její hrob (vlevo dole) leží jen pár kroků od chrámu Sv. Petky Bulharské (vpravo dole) postaveného dle návrhu Bogdana Tomalevského a Lozana Lozanova v letech 1992-94 poblíž domu Vangy. Fresky a ikony v chrámu namaloval Svetlin Rusev, ikonostas vytvořil Grigor Paunov. Přáním Vangy bylo, aby se chrám stal duchovním útočištěm všech bez ohledu na národnost či náboženské vyznání.

Každý, kdo by se odvážil si vyfotit selfie se sochou Baby Vangy je ihned umraven. Výstražné tabule varující návštěvníky před sedmdesáti stupňovou minerální vodou v jezírku jsou ale ignorovány. Téměř každý z poutníků si přijde sáhnout a spálí se. Vně chrámového komplexu bývalo v předchozích letech veřejné koupání provozováno hlavně místními a jen vzácně se tu objevil někdo z místa vzdálenějšího než Sofie. Nezřídka tu parkovalo své koňské povozy i několik kočovných rodin. Teď je tu plno turistů a to i během pozdního podzimu. Dvě budky na převlékání a několik dřevěných laviček a truhlíků s květinami jsou oddělené nízkým plůtkem od prашného a kamenitého parkoviště. Parkoviště před chrámovým komplexem je dokonce vybaveno nabíjecí stanicí pro elektromobily. S obavami jsme během našeho posledního pobytu sledovali stavební ruch na pozemku přiléhajícím koupališti. Ze země se tam zdvihá železobetonová konstrukce. Co z toho bude se dozvíme příště. Nezbyvá než doufat, že tento jeden z posledních přírodních horkých pramenů v Evropě bude zachován v co nejpůvodnějším stavu. Spoléháme hlavně na ochranu Baby Vangy.

Literatura

- Brock TD *et Freeze H* *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a non-sporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology* 1969, 98(1): 289-297.
- Koblizek M *et al.* A biosensor for the detection of triazine and phenylurea herbicides designed using Photosystem II coupled to a screen-printed electrode. *Biotechnology and bioengineering* 2002 78(1): 110-116.
- Krauss N *et al.* Photosynthetic reaction center and core antenna system (trimeric), alpha carbon only. *Nature Structural Biology* 1996 3: 965-973.
- Lukavský J *et al.* Cyanobacteria of the thermal spring at Pancharovo, Sofia, Bulgaria. *Acta Botanica Croatica* 2011, 70 (2): 191-208.
- Saini MK *et al.* Genomic and phenotypic characterization of *Chloracidobacterium* isolates provides evidence for multiple species. *Frontiers in Microbiology* 2021, 12(704168)
- Shlyk-Kerner O *et al.* Protein flexibility acclimatizes photosynthetic energy conversion to the ambient temperature. *Nature* 2006, 442: 827-830.
- Strunecký O *et al.* High diversity of thermophilic cyanobacteria in Rupite hot-spring identified by microscopy, cultivation, single-cell PCR and amplicon sequencing. *Extremophiles* 2019, 23: 35-48.
- Zouni A *et al.* Crystal structure Photosystem II. *Nature* 2001 409: 739-743.