

**ACADEMIA ROMÂNĂ  
INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI**

**TEZĂ DE DOCTORAT  
REZUMAT**

**Diversitatea Microorganismelor în Gheața Perenă  
din Peștera “Ghețarul Scărișoara”**



Conducător de doctorat:

**CS I Dr. CRISTINA LIGIA PURCĂREA**

Student doctorand:

**CORINA IȚCUȘ**

**BUCUREȘTI**

2018

## CUPRINS

<b>Mulțumiri</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Lista Figurilor</b> .....	<b>8</b>
<b>Lista Tabelelor</b> .....	<b>10</b>
<b>Cuvinte cheie</b> .....	<b>11</b>
<b>Lista Abrevierilor</b> .....	<b>12</b>
<b>Capitolul I - Introducere</b> .....	<b>13</b>
1.1 Peșterile de gheață ca parte a criosferei.....	13
1.2 Microbiomul din gheață .....	14
1.3 Microorganisme psihrofile .....	16
1.4 Peștera Ghețarul Scărișoara – descrierea zonei.....	17
<b>Capitolul II - Importanța cercetării</b> .....	<b>20</b>
<b>Capitolul III - Materiale și Metode</b> .....	<b>22</b>
3.1 Prelevarea probelor.....	22
3.2 Analize chimice și fizico-chimice .....	25
3.3 Cultivare microbiană .....	25
3.3.1 Cultivare pe medii lichide.....	27
3.3.2 Biolog Ecoplates .....	28
3.3.3 Cultivare pe medii solide .....	29
3.4 Citometrie în flux .....	29
3.5 Extracția ADN genomic .....	30
3.6 Amplificare PCR.....	30
3.7 Electroforeză în gel cu gradient denaturant (DGGE).....	34
3.8 Analiza secvențelor 16S/18S ARNr .....	35
3.9 Analiză filogenetică.....	35
3.10 Analiza datelor de pirosecvențializare .....	36
3.11 Analiză statistică.....	36
<b>Capitolul IV - Rezultate</b> .....	<b>38</b>
4.1 Proprietățile chimice și fizico-chimice ale probelor de gheață .....	38
4.2 Abundența celulelor microbiene .....	40
4.3 Diversitatea microorganismelor procariote heterotrofe necultivate din blocul de gheață din Peștera Scărișoara .....	44
4.3.1 Structura comunității bacteriene folosind tehnica DGGE.....	44
4.3.2 Diversitatea bacteriilor și arheelor prin pirosecvențializarea genei 16S ARNr .....	45
4.4 Diversitatea bacteriilor cultivate din blocul de gheață din Peștera Scărișoara pe mediu de creștere solid.....	63
4.5 Diversitatea bacteriilor cultivate din blocul de gheață din Peștera Scărișoara pe mediu de creștere lichid.....	67
4.5.1 Cultivarea pe diferite medii de creștere lichide.....	67
4.5.2 Diversitatea bacteriilor cultivate prin analiza profilului DGGE a fragmentelor de gene 16S ARNr.....	71
4.5.3 Cultivarea pe Biolog EcoPlates folosind diferite surse de carbon .....	82
4.6 Diversitatea fungilor din blocul de gheață din Peștera Scărișoara .....	90
4.6.1 Diversitatea și structura comunităților de fungi necultivați prin analiza genei 18S ARNr.....	90
4.6.2 Diversitatea și structura comunităților de fungi cultivați prin analiza genei 18S ARNr.....	93
<b>Concluzii</b> .....	<b>99</b>
Direcții de cercetare suplimentare.....	100
<b>Lista publicațiilor</b> .....	<b>102</b>
<b>Bibliografie</b> .....	<b>106</b>

## **INTRODUCERE**

Ideea generală a acestei teze de doctorat a fost abordarea acesteia prin intermediul biologiei moleculare. Obiectivul studiului a fost reprezentat de diversitatea microbiană din blocul de gheață din Peștera Scărișoara corelată cu chimismul probelor și vârsta stratelor de gheață.

Comunitățile microbiene reprezintă un excelent model de studiu al diversității moleculare (delimitare precisă, omogenitate, condiții stabile impuse de temperatura și compoziția chimică a apei), temperatură scăzută, pe care cercetările ulterioare vor putea să le valorifice.

Microcosmosul încorporat în gheață reprezintă o sursă vastă de specii noi și o alternativă pentru reconstituirea climatică din trecut. Printre mediile glaciare, peșterile de gheață reprezintă unul dintre habitatele înghețate, foarte puțin cercetate.

În această teză, pentru a descrie microcosmosul înglobat în gheața perenă din cadrul ecosistemelor carstice în raport cu schimbările climatice trecute, am considerat atât conservarea cât și rolul funcțional al speciilor microbiene în peșteră.

Datorită interesului crescut față de microorganismele psihrofilice datorită potențialului lor biotehnologic mare, această investigație a diversității microbiene din blocul de gheață perenă din Peștera Scărișoara, reprezintă primul studiu al biodiversității microorganismelor procariote și eucariote din depozitele de gheață din peșteri în corelație cu vârsta stratelor de gheață și parametrii geo-climatici.

Depozitele criosferice, cum ar fi ghețarii, conțin cel mai bun înregistrări paleoclimatice, furnizând date relevante pentru înțelegerea variațiilor climatice și evaluarea impactului antropic asupra mediului.

Depozitele criosferice cel mai puțin studiate sunt peșterile de gheață formate din acumulări perene de apă (Perșoiu & Onac, 2012) și reprezintă cel mai mic grup din cadrul criosferei globale.

Peșterile de gheață sunt formate de apa care ajunge la faza solidă într-o porțiune a unei peșteri naturale, cum ar fi tuburile de lavă sau peșterile de calcar, care înregistrează constant o temperatură sub 0°C în mod constant pe parcursul anului, fiind compuse din

cantități importante de gheață perenă și izolate termic față de exterior (Barck, 1913; Wigley & Brown, 1976).

Studiul diferitelor medii de gheață a condus la o mai bună înțelegere a rolului și a mecanismului de adaptare a diversității microbiene în ceea ce privește aceste tipuri de habitate extreme.

La nivel internațional, s-au desfășurat numeroase studii asupra zonelor care conțin gheață, iar descoperirea vieții în medii deosebit de reci și izolate a modificat noțiunea de zone care permit supraviețuirea de pe Pământ. Astfel, la sfârșitul anilor 1990, au fost descoperite forme de viață la aproximativ 3590 m adâncime în gheață (Karl, et al., 1999; Priscu și colab., 1999) și în depozitele subglaciare (Sharp și colab., 1999). Microorganisme s-au întâlnit, de asemenea, în permafrost (Rivkina, et al., 2000) și în gheața marină (Junge, și colab., 2004).

Fundamental în definirea rolului ecologic pe care microorganismele îl au în sistemele înghețate este cunoașterea activității lor metabolice la temperaturi sub 0°C. Celulele latente din sistemele înghețate consumă carbon-C, azot-N, fosfor-P și alți nutrienți vitali și de neînlocuit, spre deosebire de celulele metabolice care participă activ în faze biogeochimice. Determinarea activității metabolice sub temperatura zero a apei ridică probleme metodologice. Numeroase protocoale au fost stabilite în încercarea de a calcula nivelul proceselor microbiene la aceste temperaturi extreme (Mikucki, et al., 2011).

Chiar dacă diversitatea microorganismelor prezente în blocurile de gheață subterane este mai puțin studiată, s-au investigat multe alte medii înghețate, cum ar fi gheața din Arctica și Antarctica, gheața polară și ghețarii, permafrostul, zonele superioare ale ghețarilor etc. fiind vizată cercetarea paleoclimatică pentru informațiile obținute din markerii geochimici (Racoviță & Șerban, 1990; Yonge & MacDonald, 1999; Citterio și colab., 2004; Kern și colab., 2004; Luetscher, 2005; al., 2011). Peșterile de gheață din diferite zone de altitudine, unde amestecul de morfologie a cavităților subterane și condițiile lor climatice permit conservarea gheții, au fost legate de condițiile climatice azonale ale gheții (Perșoiu & Onac, 2012). Cercetările parțiale cuprind izolarea procariotelor și eucariotelor (Margesin și colab., 2004; Vincent, 2007; Namsaraev și colab., 2010; Uetake și colab., 2010) din acest tip de mediu.

Din câte știm, o distribuție cronologică microbiană în peșterile alpine care conțin gheață nu a fost raportată până în prezent.

Investigarea recentă a tuburilor de lavă (Teehera și colab., 2017) a evidențiat prezența diferitelor comunități bacteriene și arheene în depozitele de dioxid de siliciu și calcit (Zak, et al., 2008) și în apa din lacurile înghețate. Comunitatea bacteriană înregistrată în alte medii înghețate a fost dominată de specii aparținând filumului Proteobacteria (39%), asemănător cu depozitele recente de gheață din Peștera Scărișoara, urmat de Bacteroidetes (18%), Verrucomicrobia (8%) și diviziunea OD1 (7%), diversitate întâlnită în probele recente 1-S, 1-L și 400-O. Între timp, mostrele minerale din peșterile vulcanice din Hawaii au arătat o abundență relativ ridicată (86%) de Actinobacteria, asemănătoare straturilor de gheață de 900 de ani ale blocului de gheață alpină, iar specii aparținând filumului Euryarchaeota s-au găsit și în peștera de gheață vulcanică, dar foarte rar reprezentată (< 1%) spre deosebire de stratele de gheață din Peștera Scărișoara. Cu toate acestea, în ciuda unor taxoni frecvent întâlniți în aceste două tipuri de peșteri, o diversitate mai mare, OTU-uri bacteriene unice și o distribuție microbială specială caracterizează structura procariotică din blocul de gheață perenă de la Scărișoara.

\*\*\*

Munca de teren privind prelevarea probelor analizate în această teză a fost realizată în Peștera Ghețarul Scărișoara, care se află în Carpații Occidentali (Munții Bihor). Peștera Scărișoara este situată geografic la 46°29'23" latitudine nordică și 22°48'35" longitudine estică la o altitudine de 1165 de metri deasupra nivelului mării și este formată în principal pe calcar. Blocul de gheață găzduit de peșteră a fost datat până la peste 13.500 de ani și este unul dintre cele mai mari, cu un volum de aproximativ 100.000 m<sup>3</sup> (Holmlund și colab., 2005; Perșoiu & Pazdur, 2011). O varietate de cercetări și studii privind blocul de gheață Scărișoara au fost realizate de mai mulți autori pentru a înțelege și descrie factorii și procesele climatice legate de glaciologie (Racoviță, 1927, Șerban și colab., 1948, Rusu și colab., 1970; Racoviță & Viehmann, 1987; Racoviță, 1994; Racoviță & Onac, 2000).

În ultimii ani, datorită interacțiunii dintre masa gheții și temperatura aerului, Peștera Scărișoara a devenit un punct de referință important pentru reconstrucția climatică și pentru schimbările de mediu (Onac, et al., 2007, Feurdean și colab., 2011, Perșoiu et. al., 2011; Perșoiu & Pazdur, 2011). Ghețarul Scărișoara a fost format prin congelarea apei, spre deosebire de alți ghețari din peșteri (Perșoiu, et al., 2011). În timpul sezonului cald (din primăvară până în toamnă), apa din afară se infiltrează în zona peșterii (Sala Mare) care duce la formarea, pe suprafața blocului de gheață, a unui lac adânc de ~ 20 cm care, în sezonul rece, ia formă solidă, rezultând un strat de gheață de grosime similară care conține

sedimente aduse de apă în perioada de vară. Acest proces repetitiv conduce la formarea stratelor de gheață cu un conținut diferit de sedimente organice și anorganice (Perșoiu, et al., 2011; Perșoiu & Pazdur, 2011). În 1949, E. Pop a identificat în calcarul din Peștera Scărișoara organisme chimolitotrofice, un exemplu fiind bacterile nitrificatoare (Pop, 1949).

\*\*\*

Această teză, constituind un studiu de bază, reprezintă prima caracterizare a microbiomului din gheața perenă acumulată în peșteri, cuprinzând comunitatea bacteriană totală și cultivată și structura comunităților de fungi cultivați provenind din diferite locații ale blocului de gheață Scărișoara, din strate cu o vechime de până la 2000 de ani .

Peștera Scărișoara (România) cuprinde cel mai mare bloc de gheață subterană din lume, datat până la ~10.500 de ani (datat cu  $^{14}\text{C}$ ), format în calcar. Condițiile specifice de permafrost ale mediului de peșteră în timpul formării straturilor de gheață au fost corelate cu modelele climatice. În acest context, interesul nostru principal a fost identificarea biodiversității microbiene în depozitele de gheață din Peștera Scărișoara și determinarea distribuției cronologice a microorganismelor pentru a identifica eventuali biomarkeri corelați cu clima. Acest studiu cuprinde analiza filogenetică și fiziologică a bacteriilor și fungilor necultivați și cultivați și a arheelor necultivate izolate din stratele de gheață de diferite vârste și conținut organic diferit.

Fiind un mediu puțin studiat, cercetarea privind biodiversitatea microbială din peșterile de gheață alpine aduce un mare impact în contextul schimbărilor climatice prin conservarea speciilor în gheață, care poate fi definiți ca și biomarkeri climatici.

În timp ce microbiomul peșterilor de gheață este aproape nedocumentat, această investigație reprezentând primul studiu al microorganismelor din Peștera de Gheață Scărișoara este relevantă pentru cercetarea fundamentală, determinând biodiversitatea unui tip de ecosistem foarte puțin cunoscut prin corelarea diversității comunităților microbiene cu vârsta stratelor de gheață din peșteră, expunere la lumină / întuneric și conținut organic.

Cercetarea privind identificarea diversității microbiene încorporate în gheață are un interes crescut datorită potențialului biotehnologic aplicativ imens al microorganismelor psihrofile ca biocatalizatori în procesele ce au loc la temperaturi scăzute.



Speciile bacteriene noi au fost izolate din gheața perenă a acestei peșteri în vederea identificării microorganismelor psihrotolerante și psihrofilice cu proprietăți îmbunătățite, utile în bionanotehnologii.

## **Obiective**

- 1. Studiul densității microbiene, viabilității, diversității și distribuției cronologice a comunităților microbiene din sedimentele de gheață din peșteră*
- 2. Caracterizarea filogenetică și fiziologică a bacteriilor și fungilor necultivați și cultivați, microorganisme izolate din diferite strate de gheață de până la 2000 de ani*
- 3. Selecția și caracterizarea speciilor noi adaptate la medii extreme cu potențial aplicativ în biotehnologie*
- 4. Identificarea markerilor microbieni pentru variațiile climatice în timpul formării gheții în această peșteră*

\*\*\*

Lucrarea de față este structurată în două părți divizate în cinci capitole și conține 39 figuri și 17 tabele.

Prima parte prezintă stadiul actual al cunoașterii, incluzând informații generale despre criosferă și peșteri de gheață din cadrul depozitelor criosferice; microbiomul din gheață; microorganisme psihrofile; descrierea zonei de prelevare; importanța cercetării; materiale și metode.

În partea a doua se prezintă contribuțiile originale, constituite din rezultatele obținute în acest studiu precum și discuțiile privind diversitatea microbiană din blocul de gheață din Peștera Scărișoara. Lucrarea prezentată se încheie cu un capitol de concluzii generale și direcții de cercetare ulterioare, precedate de o listă de lucrări publicate pe tema tezei de doctorat. Bibliografia cuprinde un număr de 172 de lucrări și cărți citate în text.

Tehnicile utilizate în cercetarea diversității microbiene din blocul de gheață Scărișoara cuprind o serie de metode după cum urmează: microbiologice (cultivare pe mediu lichid / solid), moleculare (extracție ADN, amplificare PCR, DGGE, secvențializare Sanger, pirosecvențializare 454, instrumentale (citometrie de flux, microscopie electronică de baleiaj), chimice (pH, EC, TDS, conținut de carbon / azot, salinitate, nutrienți), bioinformatică (statistică și filogenie).

Eșantioane de gheață aparținând diferitelor vârste au fost extrase din stratele de gheață perenă datate cu carbon 14 din Peștera Scărișoara (Perșoiu & Pazdur, 2011).

Șapte probe diferite de gheață de 1, 400, 900, 1500 și 2000 de ani au fost prelevate din diferite locații ale blocului de gheață. Două probe de gheață recentă aparținând vârstei de 1 an au fost colectate folosind o procedură de forare verticală în zona Sălii Mari, o probă (1-S) dintr-o regiune a blocului expusă la soare, iar cealaltă (1-L) situată în centrul peșterii, dintr-o zonă slab luminată.

Probele de gheață veche (400-O 900-O / I) au fost extrase din peretele de gheață situat în zona Rezervației Mici folosind o foreză orizontală, după ce în prealabil au fost îndepărtați aproximativ douăzeci de centimetri din suprafața peretelui de gheață.

Probele vechi de 1500 și 2000 de ani au fost colectate prin forare verticală. Pentru fiecare locație, procedura de prelevare a probelor a fost efectuată în condiții aseptice, iar probele de gheață au fost extrase în triplicat (Hillebrand-Voiculescu și colab., 2014).

Pentru a asocia diversitatea microbiană cu proprietățile chimice și fizico-chimice ale probelor extrase din gheață, s-au determinat masa de carbon și azot, împreună cu măsurători ale pH-ului, conductivității electrice EC și parametrilor privind totalitatea solidelor dizolvate TDS. Rezultatele arată că parametrii probelor de gheață topită alternează atât cu vârsta probei, cât și cu conținutul organic al sedimentului.

Analiza rezultatelor provenite în urma pirosecvențializării a arătat o diversitate microbiană comună care cuprinde 161 de OTU-uri distincte (33,7% din organismele procariote), în timp ce 218 OTU-uri (45,6% din taxoni) au fost împărțite între diferite straturi de gheață. Dintre acestea, cel mai mare număr de filotipuri (41) au fost comune între gheața veche de 400 și 900 de ani, în timp ce foarte puține OTU-uri procariote au fost găsite în gheața recentă 1-L (1-6), 1-S (1-2), comune cu probele mai vechi de gheață 400-O, 900-O și, respectiv, 900-I.

Distribuția filogenetică a taxonilor bacterieni în cele cinci strate de gheață din peșteră a arătat diferențe puternice ale filumurilor de-a lungul blocului de gheață. Taxonii au fost identificați ca aparținând unui număr de 30 de filumuri, cu o incidență majoră de Proteobacteria (33,9%), Actinobacteria (25,6%) și Firmicutes (17,2%). Cel mai mare conținut relativ al taxonilor aparținând proteobacteriilor a fost găsit în depozitele de gheață fără substrat organic 1-L (54%) și 900-I (42%). Actinobacteriile au constituit grupul major al straturilor de gheață de 900-O (până la 54%) și 900-I (39%), în timp ce atât probele de



1-S, cât și cele de 400-O au avut o reprezentare mai mică (11%) ai acestor taxoni. OTU-uri aparținând filumului Firmicutes au fost observate în principal în gheața de 400-O (până la 37% din numărul total). Alte șase filumuri au prezentat o abundență relativă substanțială (> 1%) în blocul de gheață din peșteră.

Genurile *Crenothrix*, *Cryobacterium* și *Polaromonas* au fost evidențiate în toate probele de gheață (cu un procent mai mare de specii aparținând genului *Polaromonas* în proba de gheață 900-I), datorită conținutului de specii psihrofilice. Printre speciile adaptate la temperaturi scăzute, taxoni aparținând genului *Chryseobacterium* au fost înregistrați în toate probele de gheață ca și microorganisme psihrotolerante.

Un număr de 7 filumuri aparținând domeniului Archaea au fost identificate în stratele de gheață de 400 și 900 de ani.

Abundența relativă a taxonilor aparținând filumurilor Crenarchaeota, Thaumarchaeota și Euryarchaeota a fost foarte variabilă în cele trei straturi de gheață. Crenarchaeota a predominat în stratul de gheață de 400-O (62%), în timp ce un conținut relativ scăzut (2 + 5%) a fost înregistrat în probele de gheață de 900-O și de 900-I. OTU-urile aparținând Euryarchaeota au fost găsite în cea mai mare parte în proba de 900-O (52%) și 900-I (95%), în timp ce doar 13% au contribuit la comunitatea arheeană a probei de 400-O. Thaumarchaeota a fost prezentă în stratele de gheață bogate în conținut organic, cu cea mai mare reprezentare în probele de 900-O (45%) și 400-O (25%).

Proprietățile geochimice ale probelor de gheață din peșteră (1-S, 1-L, 400-O, 900-O și 900-I) au fost determinate, înregistrând un pH ușor alcalin (7,45-8,03), valori scăzute ale conductivității electrice (EC) (124,2-15  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ), conținutul total de carbon organic (TOC) scăzând odată cu vârsta stratelor și cu conținutul de sedimente al gheții în intervalul 33,38-3,03  $\text{mg L}^{-1}$ , iar azotul total (TN) înregistrând valori de 0,53-2,15  $\text{mg L}^{-1}$ .

Analiza compoziției filumurilor microbiene din toate depozitele de gheață investigate în raport cu parametrii geochimici de gheață a explicat 88% din diferența de date a probelor de gheață în ceea ce privește distribuția filumurilor bacteriene și arheene care pare a fi explicată de substratul geochimiei stratelor de gheață.

Astfel, pH-ul a avut mari încărcări pozitive, în timp ce EC și TOC au înregistrat încărcări negative, cu o contribuție egală la distribuția în funcție de probă. Proba de gheață 400-O a arătat un scor mai mare, fiind bine delimitată de celelalte probe în baza conținutului de TN, cu o corelație puternică între Chloroflexi și Firmicutes. Conținutul

relativ al cianobacteriilor și proteobacteriilor din probele de gheață recentă 1-S și 1-L par a fi influențate de valorile EC. Conținutul de Actinobacterii și Chlamydia în stratele vechi de gheață 900-O și 900-I arată o dependență puternică de pH-ul substratului de gheață.

Distribuția microbiană în stratele de gheață perenă a dezvăluit o comunitate bacteriană și arheană heterogenă în blocul de gheață. Un total de 435 de OTU-uri distincte aparținând acestor regnuri procariote au fost găsite în stratele recente de gheață de pe suprafața blocului, gheața de 400 de ani, formată în timpul Micii Glaciațiuni (LIA) și gheața de 900 de ani, corespunzătoare Perioadei Medievale Calde (MWP) (Perșoiu, et al., 2011; Perșoiu, et al., 2017). Astfel, microorganismele predominante în acest habitat de gheață formată recent (1 an), în perioada LIA și MWP corespund filumurilor Proteobacteria, Firmicutes și Actinobacteria.

OTU-uri bacteriene și arheene specifice au fost găsite în probele de 400 de ani (perioada LIA rece și uscată) și în gheața de peste 900 de ani (perioadă caldă și umedă), constituind presupuși biomarkeri pentru caracteristicile climatice din timpul formării gheții. Printre cele 26 de filotipuri unice determinate în gheața formată în perioada LIA, OTU-uri aparținând genului *Methanobacterium* (Euryarchaeota) au evidențiat prezența metanogenilor hidrogenotrofici anaerobi (Whitman și colab., 2014). OTU-uri aparținând Crenarheotelor (MCG), un grup arheean predominant în medii anoxice, în principal în habitatele marine adânci (Fry et al., 2008), cu un posibil rol semnificativ în ciclurile biogeochimice globale, au înregistrat o proporție ridicată (40-69%) în proba de gheață 400-O.

Datele actuale despre microorganismul din Peștera Scărișoara au subliniat o comunitate bacteriană foarte diversă în tot blocul de gheață din peșteră și apariția diferiților taxoni arheeni în stratele vechi de gheață de 400 și 900 de ani, profiluri variind în funcție de vârstă, conținutul de sedimente și expunerea la lumină a gheții. Atât procariotele heterotrofe, cât și cele autotrofe au fost identificate în depozitele de gheață recentă și veche, prezentând grupuri microbiene anaerobe. În plus, variațiile climatice înregistrate în timpul formării stratelor de gheață în cadrul intervalelor de timp LIA și MWP par a avea un impact atât asupra filumurilor bacteriene majore, cât și asupra arheelor, cu microorganisme distincte identificate până la nivelul genelor care ar putea servi drept markeri climatici.

Analizele au arătat existența bacteriilor cultivabile în toate probele analizate din blocul de gheață Scărișoara, rezultat similar cu alte habitate extreme (Skidmore et al., 2000, Lee și colab., 2011, Bell E., 2012 ).

Analiza secvențelor de gene 18S ARNr a evidențiat 23 OTU-uri care corespund fungilor cultivați la 4°C (16 OTU) și 15°C (13 OTU) din toate probele de gheață. Dintre acestea, 21 OTU-uri au fost specifice pentru probe distincte de gheață în timp ce 7 OTU-uri apar ca fiind comune între diferite straturi de gheață. Secvențele rezultate din probele de gheață au fost înregistrate cu un procentaj de similitudine și acoperire ridicat cu diferite OTU-uri omoloage aparținând unor medii extreme (de ex., SM 1-1, T1-15 KY614581 cu *Thelebolus* sp. GU004225 provenit din solul Antarctic cu un coeficient de identitate de 98 % pe o acoperire de 96%).

În profilul DGGE al probelor cultivate la 4°C și 15°C, drojdiile psihrofilice *Mrakia stokesii* și *Mrakia gelida* par să fie comune pentru toate cele cinci straturi de gheață fiind cele mai predominante OTU-uri (14). În probele de gheață recentă și de 400 de ani, a fost găsită *Teberdinia hygrophila* (o drojdie crioofilă) cu o identitate de 98% fiind comună cu regiunea Murmansk din Marea Albă din Rusia și cu solul alpin din Munții Caucazului (Sogonov et al., 2005 ).

Secvențele de fungi, aparținând de 5 filumuri, au fost examinate ulterior printr-o analiză filogenetică.

Diversitatea fungică din mediile extreme de gheață cum sunt Polii Pamântului este descrisă sumar: Polul Nord (Butinar, et al., 2011) și Polul Sud (Connell & Staudigel, 2013). Microorganisme fungice cultivabile au fost descoperite în stratele vechi de gheață din Antarctica (Taylor, et al., 1997; Christner, et al., 2003). În gheața din Scărișoara s-au identificat tipuri specifice de fungi, majoritatea OTU-urilor putând proveni din exterior fiind prinși în stratul de gheață în prezența sedimentelor organice acumulate în timpul verii (Kern & Perșoiu, 2013; Perșoiu, 2018).

Fungii identificați în Ghețarul Scărișoara pot oferi date importante despre schimbările climatice. Datorită încălzirii globale, microorganismele care trăiesc în gheață ar putea fi eliberate (Kern & Perșoiu, 2013). Studiile privind adaptarea și rolul conținutului fungic al peșterilor de gheață ar putea aduce informații valoroase pentru cercetarea și crioconservarea care ar putea duce la eventuale aplicații bionanotehnologice (Margesin & Feller, 2010).

În această cercetare, 19 OTU-uri izolate din blocul de gheață Scărișoara au împărțit un procent mic de identitate și acoperire cu alte secvențe din baza de date GenBank, fiind înregistrate ca tulpini noi.

## CONCLUZII

Prezentul studiu este relevant pentru cercetarea fundamentală, fiind primul studiu microbiologic asupra comunității microbiene încorporate în gheața din Peștera Scărișoara.

În această cercetare inițială privind diversitatea microbiană captivă în blocul de gheață din Peștera Scărișoara (România), a fost identificată apariția microorganismelor viabile (bacterii și eucariote) în toate stratele de gheață.

Diferențe ale profilelor de creștere a comunităților microbiene din fiecare probă de gheață (1-S, 1-L, 400-O, 900-O, 900-I, 1500-1 și 2000-I) au fost date de expunerea la lumină, vârsta gheții și conținutul organic al probelor.

Compoziția chimică a stratelor de gheață recentă și veche care încorporează aceste microorganisme a reprezentat schimbări importante în nivelurile lor ca un rol al conținutului organic și a vârstei gheții. Această ipoteză este susținută de o scădere a creșterii bacteriene observată pentru probele mai vechi de gheață (900-O / I) comparativ cu o probă organică veche de 400 de ani care sugerează o densitate mai mică a tulpinilor cultivabile.

Chiar dacă eșantioanele diferă în funcție de vârstă, există și o variație clară în ceea ce privește influența climatului exterior în timpul depunerii stratelor de gheață din care au fost colectate probe vechi organice (400-O, 900-O) și gheață limpede (900-I). Probele 900-O / I provin din depunerea gheții în perioada medievală caldă (MWP), un interval de timp cu veri calde și uscate evidențiate de extinderea pădurilor de *Fagus sylvatica* (Vesterdal și colab., 2008, Feurdean și colab. 2011).

Ca o diferență, proba de gheață de 400 de ani este legată de un strat format în perioada numită Mica Glaciațiune (LIA). În acel timp, pădurile erau constituite în principal din *Picea abies*, un marker pentru solurile acide, predominând peisajul din jurul zonei de

prelevare și indicând o perioadă umedă și rece (Cankar et al., 2006, Feurdean și colab., 2011).

Condițiile climatice care au persistat în timpul perioadei LIA și MWP au condus la o scurgere recurentă de volume mari de apă în peșteră, transportând cantități substanțiale de materie organică și substanțe nutritive care au sporit creșterea diversității microbiene.

Această teză este primul studiu asupra unei peșteri de gheață și raportează existența microorganismelor cultivabile și necultivabile din Peștera Ghețarul Scărișoara (România), în stratele de până la 2000 de ani vechime, cuprinzând totodată dependența de vârstă, temperatură și substratul organic.

În timp ce, până în prezent, acest tip particular de nișă ecologică a primit o atenție foarte limitată, studiul prezent a făcut primul pas în descoperirea diversității microbiotei înfloritoare în depozitele de gheață subterane din această peșteră în corelație cu schimbările climatice trecute.

Secvențele de ADN raportate în acest studiu au fost încărcate în baza de date GenBank sub următoarele numere de acces:

- 16S ARNr pirosecvențializare 454 Archiva - BioProject număr acces PRJNA263762, BioSamples corespunzătoare numerelor de acces (1-S), SAMN03140080 (1-L), SAMN03140081 (400-O), SAMN03140082 (900-O) și SAMN 0314 0083 (900-I)
- fragmente 16S ARNr DGGE (bacterii cultivate) - KF85203-KF853221, KJ454416-KJ454425 și KP219085-KP219133
- fragmente 18S ARNr DGGE - KY614706-KY614719 (fungi necultivați) și KY614552- KY614602 (fungi cultivați)

În cele din urmă, metodele utilizate în acest studiu converg către rezultate interdependente care evidențiază aceeași compoziție microbiană, dependentă de vârstă și substrat organic, care se corelează cu perioadele climatice și poate duce la crearea unui model comun.

### **Direcții de cercetare suplimentare**

O analiză mai profundă a diversității microbiene și a distribuției în stratele de gheață diferite ar putea conduce la identificarea markerilor climatici microbieni.

Screeningul asupra diversității metabolice și a fracției microbiene active din acest habitat de gheață va contribui la înțelegerea rolului microbiomului ghețarilor din peșteră asupra habitatului ecologic.

Compararea comunității bacteriene din gheață de peșteră cu cea a ghețarilor alpini, arctici și antarctici va contribui la înțelegerea particularităților formării microbiomului din aceste zone extreme și a activității / rezilienței în gheața perenă de peșteră în comparație cu gheața expusă.

O altă direcție viitoare este selectarea, izolarea și caracterizarea noilor specii microbiene adaptate la mediile extreme cu temperaturi scăzute care constituie premise pentru dezvoltarea de tulpini și biomolecule noi pentru aplicații bionanotehnologice.

Modelele identificate pot fi utilizate în continuare ca puncte de plecare în dezvoltarea de modele pentru studiile exobiologice ale planetelor care conțin gheață.



## LISTA PUBLICAȚIILOR

Rezultatele obținute din abordarea științifică a acestei teze de doctorat au fost exploatate prin următoarele lucrări și participări la conferințe:

### A. Articole științifice publicate

1. Brad, T.<sup>#</sup>, **Ițcuș, C.<sup>#</sup>**, Pascu, M.D., Perșoiu, A., Hillebrand-Voiculescu, A., Iancu, L., Purcărea, C. (2018). *Fungi in perennial ice from Scărișoara Ice Cave (Romania)*. Nature Scientific Reports, 8(1), 1-9. (IF 4.122)
2. **Ițcuș, C.**, Pascu, M.D., Brad, T., Perșoiu, A., Purcărea, C. (2016). *Diversity of cultured bacteria from the perennial ice block of Scarisoara Ice Cave, Romania*. International Journal of Speleology, 45(1), 89-100, (IF 2.057)
3. Hillebrand-Voiculescu, A.<sup>#</sup>, **Ițcuș, C.<sup>#</sup>**, Ardelean I., Rusu, A., Perșoiu, A., Brad, T., Popa, E., Onac, B.P., Purcărea, C. (2014). *Searching for cold-adapted microorganisms in the underground glacier of Scarisoara Ice Cave, Romania*. Acta Carsologica, Volume 43, 319-329. (IF 0.792)
4. Hillebrand-Voiculescu, A.<sup>#</sup>, Rusu, A.<sup>#</sup>, **Ițcuș, C.**, Perșoiu, A., Brad, T., Pascu, M.D., Ardelean, I., Onac, B.P., Purcărea, C. (2013). *Bacterial 16S-rRNA gene clone library from recent ice stalagmites of Scărișoara cave*. Rom. J. Biochem Volume 50, 109-118. BDI

(<sup>#</sup> authors with equal contribution)

### B. Articole științifice trimise spre publicare

1. **Ițcuș, C.<sup>#</sup>**, Pascu, M.D.<sup>#</sup>, Perșoiu, A., Brad, T., Iancu, L., Lavin, P., Purcărea, C. (2018). *Bacterial and archaeal community structures in perennial cave ice*. Submitted to Nature Scientific Reports
2. Mondini, A., Donhauser, J., **Ițcuș, C.**, Marin, C., Perșoiu, A., Frey, B., Purcărea, C. (2018). *High-throughput sequencing of fungal communities across the perennial ice block of Scărișoara Ice Cave*. Submitted to Annals of Glaciology

### C. Conferințe internaționale

1. Cristina Purcare, Corina Ițcuș, Constantin Marin, Soon Gyu Hong, Victoria I. Paun, Aurel Persoiu, Paris Lavin, Traian Brad, Alexandra Hillebrand-Voiculescu, Denisa Pascu, Cristian Coman, Iris Tusa, Manuela E. Sidoroff, 2018, "Ice Microbiome: From Antarctic Glaciers to Alpine Ice Caves" POLAR 2018 - XXXV SCAR Biennial Meetings - Open Science Conference, Davos, Elveția, 15 – 26 Iunie
2. Victoria Ioana Paun, Corina Ițcuș, Constantin Marin, Aurel Persoiu, Paris Lavin, Alexandra Hillebrand-Voiculescu, Antonio Mondini, Carmen Badaluta, Cristina Dorador, Cristina Purcare, 2018, *Chronosequence of Active Bacterial Community*

- from an Alpine Ice Cave*, POLAR 2018 - XXXV SCAR Biennial Meetings - Open Science Conference, Davos, Elveția, 15 – 26 Iunie
3. **Purcărea, C., Ițcuș, C.,** Păun, V.I., Marin, C., Perșoiu, A., Brad, T., Bădăluță, C.A. Icaza, G., Dorador, C., Lavin, P., Donhauser, J., Frey, B. (2018). *Searching for microbial biomarkers for past climate changes in Scarisoara ice cave*, 8th International Workshop on Ice Caves IWIC-VIII, Potes, Picos de Europa National Parc, Spain, June 11-16.
  4. **Purcărea, C., Ițcuș, C.,** Păun, V.I., Marin, C., Perșoiu, A., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., Bădăluță, C., Lavin, P. (2018) *Cave ice microbiome*. International Symposium on Cryosphere and Byosphere, Kyoto, Japan, March 14-19.
  5. **Ițcuș, C.,** Pascu, M.D., Paun, V.I., Perșoiu, A., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., **Purcărea, C.** (2017). *Reconstruction of Scarisoara ice cave microbiome based on 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics*, 7th International Conference on Polar and Alpine Microbiology (PAM), Nuuk, Greenland, September 8 -12.
  6. **Ițcuș, C.,** Pascu, M.D., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., Perșoiu, A., Onac, B.P., Purcărea, C. (2016). *Cultured bacterial diversity in Scarisoara Ice Cave*, 7th International Workshop on Ice Caves, Postojna, Slovenia, May 16 - 22.
  7. **Ițcuș, C.,** Pascu, M.D., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., Perșoiu, A., Onac, B.P., Purcărea, C. (2016). *Distribution of Bacteria and Archaea in the ice block of Scarisoara Cave, Romania*, 7th International Workshop on Ice Caves, Postojna, Slovenia, May 16 - 22.
  8. **Ițcuș, C.,** Pascu, M.D., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., Perșoiu, A., Purcărea, C. (2015). *Diversity of cultured ice cave microcosm*. 6th International Conference on Polar and Alpine Microbiology (PAM), České Budějovice, Czech Republic, September 6-10.
  9. **Ițcuș, C.,** Pascu, M.D., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., Perșoiu, A., Onac, B.P., **Purcărea, C.** (2015). *Prokariotic community structure across the ice block of Scarisoara Cave determined by 454 pyrosequencing*. 6th International Conference on Polar and Alpine Microbiology (PAM), České Budějovice, Czech Republic, September 6 - 10.
  10. Pascu, D.M., **Ițcuș, C.,** Ardelean, I., Cirnu, M., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., Perșoiu, A., Purcărea C. (2015). *Diversity of phototrophic bacteria in Scarisoara Ice Cave*. 6th International Conference on Polar and Alpine Microbiology (PAM), České Budějovice, Czech Republic, September 6-10.
  11. **Ițcuș, C.,** Pascu, M.D., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., Perșoiu, A., Purcărea, C. (2015). *Bacterial diversity in perennial ice deposits from Scarisoara Ice Cave*. International Symposium of the “Young Researchers in BioSciences”, Cluj-Napoca, Romania, July 22-26.

12. Pascu, D., **Ițcuș, C.**, Cirnu, M., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., Perșoiu, A., Ardelean, I., Purcărea, C. (2015). *Molecular and microbiological study of phototrophs from Scarisoara Ice Cave*. International Symposium of the “Young Researchers in BioSciences”, Cluj-Napoca, Romania, July 22-26.
13. **Ițcuș, C.**, APECS World Summit (2015). “*The Future of Polar Research*” Sofia, Bulgaria, June 6-8.
14. **Ițcuș, C.**, Pascu, M.D., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., Perșoiu, A., Ardelean, I., Purcărea, C. (2014). “*Diversity of cultured and uncultured ice cave microbiota*”, 10th International Congress on Extremophiles, Sankt Petersburg, Rusia, September 6-11.
15. **Ițcuș, C.**, Pascu, D.M., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., Perșoiu, A., Purcărea C. (2014). *Molecular analysis of bacterial diversity from Scarisoara Ice Cave*. 1<sup>st</sup> International Symposium of the "Young Researchers in BioScience", Cluj-Napoca, Romania, July 23-27.
16. Pascu, D.M., **Ițcuș, C.**, Ardelean I., Cirnu M., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., Perșoiu, A., Purcărea C. (2014). *Metabolic activity and diversity of phototrophs from Scarisoara Ice Cave*. 1<sup>st</sup> International Symposium of the "Young Researchers in BioScience", Cluj-Napoca, Romania, July 23-27.
17. Pascu, M.D., Ardelean, I., **Ițcuș, C.**, Hillebrand-Voiculescu, A., Perșoiu, A., Brad, T., Purcărea, C. (2013). *Phototrophs in ice cave and supraglacier summer pond*. Life in The Cold, Workshop, Leeds, UK, November 28.
18. **Ițcuș, C.**, Hillebrand-Voiculescu, A., Pascu, M.D., Perșoiu, A., Brad, T., Purcărea, C. (2013). *Cultured and uncultured microorganisms from perrenial cave ice*. . Life in The Cold, Workshop, Leeds, UK, November 28.
19. Hillebrand-Voiculescu, A., **Ițcuș, C.**, Rusu, A., Popa, E., Pascu, D., Ardelean, I., Perșoiu, A., Brad, T., Onac, B.P., Purcărea, C. (2013). *Unravelling underground ice microcosms*. 16th International Congress of Speleology, Brno, Czech Republic, July 21-28.
20. **Ițcuș, C.**, Hillebrand-Voiculescu, A., Pascu, M.D., Ardelean, I., Perșoiu, A., Brad, T., Purcărea, C. (2013). *Molecular analysis of microorganisms diversity from perrenial underground ice sediments*. 16th International Congress of Speleology, Brno, Czech Republic, July 21-28.
21. **Ițcuș, C.**, Hillebrand-Voiculescu, A., Pascu, M.D., Rusu, A., Ardelean, I., Perșoiu, A., Brad, T., Popa, E., Onac, B.P., Purcărea, C. (2013). *Diversity of ice embedded microorganisms from Scarisoara Cave, Romania*. 5th International Conference on Polar and Alpine Microbiology, Big Sky, MT, SUA, September 8-12.
22. Hillebrand-Voiculescu, A., **Ițcuș, C.**, Rusu, A., Ardelean, I., Pascu, D., Perșoiu, A., Brad, T., Popa, E., Onac, B.P., Purcărea, C. (2012). *Microbial Diversity in the Subterranean Ice Deposits of Scărișoara Cave*. A New Approach of the Academic

Research in Biology, IBB Annual Conference, Bucuresti, Romania, December 11-12.

23. **Ițcuș, C.**, Hillebrand-Voiculescu, A., Pascu, D., Perșoiu, A., Brad, T., Purcărea, C. (2012). *Cell growth and DGGE analysis of microorganisms from Scarisoara Cave ice sediments*. A New Approach of the Academic Research in Biology, IBB Annual Conference, Bucuresti, Romania, December 11-12.
24. Hillebrand-Voiculescu, A., **Ițcuș, C.**, Rusu, A., Perșoiu, A., Brad, T., Popa, E., Onac, P. B., Purcărea, C. (2012). *Microbial Biodiversity in ice sediments from Scărișoara Ice Cave (ROMANIA)*, The 5th International Workshop on Ice Caves, Barzio, Valsassina, Grigna, Italia, September 16-23.

#### **D. Conferințe naționale**

1. Iancu, L., Păun, I., **Ițcuș, C.**, Mondini, A., Purcărea, C. (2017). *Microbial diversity through 16S rRNA Illumina sequencing and shotgun*, Perspectives of bioinformatics in Romania, Biology and Geology Faculty, Babeș-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania, November 24.
2. **Ițcuș, C.**, Pascu, M.D., Hillebrand-Voiculescu, A., Brad, T., Perșoiu, A., Brad, T., Ardelean, I., Purcărea, C. (2016) *Comunități microbiene din Peștera Ghețarul Scărișoara*, 56<sup>th</sup> Annual Scientific Session, Institute of Biology of the Romania Academy, Bucharest, Romania, December 10.
3. **Ițcuș, C.**, Hillebrand-Voiculescu, A. Pascu, D., Perșoiu, A., Brad, T., Purcărea, C., (2013). *Microorganisms diversity in Scărișoara Ice Cave*. 53<sup>rd</sup> Annual Scientific Session, Institute of Biology of the Romania Academy, Bucharest, Romania, December 10.
4. Pascu, D., Ardelean, I., **Ițcuș, C.**, Hillebrand-Voiculescu, A., Perșoiu, A., Brad, T., Purcărea, C. (2013). *Highlighting the phototroph microorganisms in perrenial ice from Scărișoara Ice Cave*. 53<sup>rd</sup> Annual Scientific Session, Institute of Biology of the Romania Academy, Bucharest, Romania, December 10.
5. **Ițcuș, C.**, Hillebrand-Voiculescu, A., Pascu, D. M., Perșoiu, A., Brad, T., Purcărea C. (2013) *Identifications of microorganisms from Scărișoara Ice Cave - cell growth and DGGE analysis*. National Symposium “Cryosphere 2013” Piatra Neamț, Romania, February 21-24.

#### **E. Premii**

1. ICGEB grant – ICGEB Course „*Fluorescence Microscopy*”, Trieste, Italy, 24.10.2017 – 26.10.2017 (~500 euro)

2. Training fellowship - International course „*Karst Landscape, Geopark, Natural Heritage, Environmental Geology Mapping and Data Mining.*”, Nanning, China, 20.09.2015 - 5.10.2015 (Scholarship 2500 euro)
3. Training fellowship - International course „*Karst Hydrogeological Investigation, Dynamic Monitoring and Application in River Basin*”, Guilin, China, 17.11.2013 - 30.11.2013 Certified: Excellency certificate (UNESCO prize and Scholarship 2500 euro)
4. Poster prize - **Ițcuș, C.**, Hillebrand-Voiculescu, A. Pascu, D., Perșoiu, A., Brad, T., Purcărea, C., (2013). *Microorganisms diversity in Scărișoara Ice Cave*. 53<sup>rd</sup> Annual Scientific Session, Institute of Biology of the Romania Academy, Bucharest, Romania, December 10 (100 RON)
5. Training scholarship - COST Action: ES1103 „*Bioinformatics for microbial community analysis*” University of Liverpool, Centre for Genomic Research, Liverpool, UK, 11.12.2012 - 14.12.2012 (1000 euro)

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Abyzov, S. S. 1993. "Microorganisms in the Antarctic ice in Antarctic Microbiology." Edited by E. I. Friedmann, 265-295. Wiley-Liss, Inc.
2. Abyzov, S., I. N. Mitskevich, and M. N. Poglazova. 1998. "Microflora of the deep glacier horizons of Central Antarctica." *Microbiology* 67: 66-73.
3. Adams, H. E., B. C. Crump, and G. W. Kling. 2014. "Metacommunity dynamics of bacteria in an arctic lake: the impact of species sorting and mass effects on bacterial production and biogeography." *Frontiers in Microbiology* 5: 1-10.
4. Anesio, A. M., and J. Laybourn-Parry. 2012. "Glaciers and ice sheets as a biome." *Trends in Ecology & Evolution* 27: 219-225.
5. Barck, C. 1913. "Caves." *Mazama. Portland* 4: 61-69.
6. Bidle, K. D., S. Lee, D. R. Marchant, and P. G. Falkowski. 2007. "Fossil genes and microbes in the oldest ice on earth." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 13455-13460.
7. Brad, T., C. Ițcuș, M. D. Pascu, A. Perșoiu, A. Hillebrand-Voiculescu, L. Iancu, and C. Purcărea. 2018. "Fungi in perennial ice from Scărișoara Ice Cave (Romania)." *Scientific Reports* 8 (1): 1--9. doi:10.1038/s41598-018-28401-1.
8. Branda, E., B. Turchetti, G. Diolaiuti, M. Pecci, C. Smiraglia, and P. Buzzini. 2010. "Yeast and yeast-like diversity in the southernmost Glacier of Europe (Calderone glacier, Apennines, Italy)." *FEMS Microbiol. Ecol.* 72: 354-369. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00864.x.
9. Butinar, L., I. Spencer-Martins, and N. Gunde-Cimerman. 2007. "Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms." *Antonie Van Leeuwenhoek* 91: 277-289. doi:10.1007/s10482-006-9117-3.
10. Canfield, D. E., E. Kristensen, and B. Thamdrup. 2005. "Aquatic Microgeochemistry." *Adv. Mar. Biol.* 48: 1-599.
11. Caporaso, J. G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. Bushman, E. Costello, N. Fierer, et al. 2010. "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data." *Nature Methods* 7: 335-336.



12. Cavicchioli, R. 2006. "Cold-adapted archaea." *Nat Rev Microbio* 4: 331-343.
13. Christner, B. C., E. Mosley-Thompson, L. G. Thompson, and N. Reeve J. 2003. "Bacterial recovery from ancient glacial ice." *Environ. Microbiol* 5: 433-436. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00422.x.
14. Connell, L., and H. Staudigel. 2013. "Fungal Diversity in a Dark Oligotrophic Volcanic Ecosystem (DOVE) on Mount Erebus, Antarctica." *Biology* 2: 798-809. doi:10.3390/biology2020798.
15. De Hoog, G. S., E. Göttlich, G. Platas, O. Genilloud, G. A. Leotta, and J. Brummelen. 2005. "Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica." *Stud. Mycol.* 51: 33-76.
16. D'Elia, T., R. Veerapaneni, V. Theraisnathan, and S. O. Rogers. 2009. "Isolation of fungi from Lake Vostok accretion ice." *Mycologia* 101: 751-763. doi:10.3852/08-184.
17. Deming, J. W. 2002. "Psychrophiles and Polar regions." *Current Opinion in Microbiology* 5: 301-309.
18. Dieser, M., A. Nocker, J. C. Priscu, and C. M. Foreman. 2010. "Viable microbes in ice: application of molecular assays to McMurdo Dry Valley lake ice communities." *Antarctic Science* 22: 470-476.
19. Diez, B., C. Pedros-Alio, T. L. Marsh, and R. Massana. 2001. "Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques." *Applied Environmental Microbiology* 67: 2942-2951.
20. Felip, M., B. Sattler, R. Psenner, and J. Catalan. 1995. "Highly-active microbial communities in the ice and snow cover of high-mountain lakes." *Applied Environmental Microbiology* 61: 2394-2401.
21. Feurdean, A., A. Perșoiu, A. Pazdur, and B. P. Onac. 2011. "Evaluating the palaeoecological potential of pollen recovered from ice in caves: a case study from Scarisoara Ice Cave, Romania." *Review of Palaeobotany and Palynology* 165: 1-10.
22. Forster, J. 1887. "Ueber einige Eigenschaften leuchtender Bakterien." *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd* 2: 337-340.

23. Fry, J., R. Parkes, B. Cragg, A. Weightman, and G. Webster. 2008. "Prokaryotic biodiversity and activity in the deep seafloor biosphere." *FEMS Microbiol. Ecol* 66: 181-196.
24. Garland, J. L. 1997. "Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology." *FEMS Microbiology Ecology* 24: 289-300.
25. Garland, J. L., and A. L. Mills. 1991. "Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization." *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2351-2359.
26. Gich, F., J. Garcia-Gil, and J. Overmann. 2001. "Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes." *Arch. Microbiol.* 177: 1-10.
27. Gunde-Cimerman, N., D. Wagner, and M. Häggblom. 2012. "Polar and alpine microbiology." *FEMS Microbiology Ecology* 82: 215-216.
28. Helmke, E., and H. Weyland. 1995. "Bacteria in sea ice and underlying water of the eastern Weddell Sea in midwinter." *Mar Ecol Prog Ser* 117: 269-287.
29. Helmke, E., and H. Weyland. 2004. "Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria-occurrence and significance in polar and temperate marine habitats." *Cell Mol Biol* 50: 553-561.
30. Hillebrand-Voiculescu, A., A. Rusu, C. Ițcuș, A. Perșoiu, T. Brad, D. Pascu, I. Ardelean, B. P. Onac, and C. Purcărea. 2013. "Bacterial 16S rRNA gene clone library from recent ice stalagmites of Scarisoara cave." *Romanian Journal of Biochemistry* 50: 109-118.
31. Hillebrand-Voiculescu, A., C. Ițcuș, I. Ardelean, M. D. Pascu, A. Perșoiu, A. Rusu, T. Brad, E. Popa, B. P. Onac, and C. Purcărea. 2014. "Searching for cold-adapted microorganisms in the underground glacier of Scarisoara ice cave, Romania." *Acta Carsologica* 43: 319–329.
32. Holmlund, P., B. P. Onac, M. Hansson, K. Holmgren, M. Morth, M. Nyman, and A. Perșoiu. 2005. "Assessing the paleoclimate potential of cave glaciers: The example of the Scarisoara Ice Cave (Romania)." *Geography Annals* A87: 193-201.

33. Ițcuș, C., M. D. Pascu, T. Brad, A. Perșoiu, and C. Purcărea. 2016. "Diversity of cultured bacteria from the perennial ice block of Scărișoara Ice Cave, Romania." *International Journal of Speology* 45 (1): 89--100.
34. Jakosky, B. M., K. H. Nealson, C. Bakermans, R. E. Ley, and M. T. Mellon. 2003. "Subfreezing activity of microorganisms and the potential habitability of Mars' polar regions." *Astrobiology* 3: 343-350.
35. James, T. Y., P. M. Letcher, J. E. Longcore, S. E. Mozley-Standridge, D. Porter, M. J. Powell, G. W. Griffith, and R. Vilgalys. 2006. "A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota)." *Mycologia*, 860–871.
36. Jungblut, A. D., C. Lovejoy, and W. F. Vincent. 2010. "Global distribution of cyanobacterial ecotypes in the cold biosphere." *ISME Journal* 4: 191-202.
37. Junge, K., H. Eicken, and J.W. Deming. 2004. "Bacterial activity at –2 to –20°C in Arctic Wintertime sea ice." *Appl Environ Microbiol* 70: 550 -- 557.
38. Karl, D.M., D.F. Bird, K. Bjorkman, T. Houlihan, R. Shackelford, and Tupas L. 1999. "Microorganisms in the accreted ice of Lake Vostok, Antarctica." *Science* 286: 2144 -- 2147.
39. Kochkina, G., N. Ivanushkina, S. Ozerskaya, N. Chigineva, O. Vasilenko, S. Firsov, E. Spirina, and D. Gilichinsky. 2012. "Ancient fungi in Antarctic permafrost environments." *FEMS Microbiol. Ecol.* 82: 501-509. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01442.x.
40. Kurosawa, N., S. Sato, Y. Kawarabayasi, S. Imura, and T. Naganuma. 2010. "Archaeal and bacterial community structures in the anoxic sediment of Antarctic meromictic lake Nurume-Ike." *Polar Sci* 4: 421-429.
41. Lanoil, B., M. Skidmore, J. C. Priscu, S. Han, W. Foo, S. W. Vogel, S. Tulaczyk, and H. Engelhardt. 2009. "Bacteria beneath the West Antarctic ice sheet." *Environmental Microbiology* 11: 609-615.
42. Lapanje, A., C. Wimmersberger, G. Furrer, I. Brunner, and B. Frey. 2012. "Pattern of elemental release during the granite dissolution can be changed by aerobic heterotrophic bacterial strains isolated from Damma Glacier (central Alps) deglaciated granite sand." *Microbial Ecology* 63: 865-882.

43. Laucks, M. L., A. Sengupta, K. Junge, E. J. Davis, and B. D. Swanson. 2005. "Comparison of psychroactive Arctic marine bacteria and common mesophilic bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy." *Appl Spectrosc* 10: 1222-1228.
44. Lee, Y. M., S. Y. Kim, J. Jung, E. H. Kim, K. H. Cho, F. Schinner, R. Margesin, S. G. Hong, and H. K. Lee. 2011. "Cultured bacterial diversity and human impact on alpine glacier cryoconite." *Journal of Microbiology* 49: 355-362.
45. Lehman, R. M., F. S. Colwell, D. B. Ringelberg, and D. C. White. 1995. "Combined microbial community level analyses for quality assurance of terrestrial subsurface cores." *Journal of Microbiological Methods* 22: 263-281.
46. Ma, L. J., C. M. Catranis, W. T. Starmer, and S. O. Rogers. 1999. "Revival and characterization of fungi from ancient polar ice." *Mycologist* 13: 70-73. doi:10.1016/S0269-915X(99)80012-3.
47. Manini, E., and R. Danovaro. 2006. "Synoptic determination of living/dead and active/dormant bacterial fractions in marine sediments." *FEMS Microbiol Ecol* 55: 416-423.
48. Margesin, R., and G. Feller. 2010. "Biotechnological applications of psychrophiles." *Environ. Technol.* 31: 835-844. doi:10.1080/09593331003663328.
49. Margesin, R., and V. I. Miteva. 2011. "Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms." *Research in Microbiology* 162: 346-361.
50. Margesin, R., F. Schinner, J. C. Marx, and C. Gerday, . 2008. *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer Berlin/Heidelberg.
51. Margesin, R., P. Schumann, C. Sproer, and A. M. Gounot. 2004. "Arthrobacter psychrophenicus sp. nov., isolated from an alpine ice cave." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2067–2072.
52. McDonald, D., M. Price, J. Goodrich, E. P. Nawrocki, T. Z. DeSantis, A. Probst, G. L. Andersen, R. Knight, and P. Hugenholtz. 2012. "An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea." *ISME J.* 6: 610-618.
53. Mikucki, J. A., S. K. Han, and B. D. Lanoil. 2011. "Ecology of Psychrophiles: Subglacial and Permafrost Environments." In *Extremophiles handbook*, edited by

- G. Antranikaian, A. T. Bull, F. T. Rob and K. O. Stetter, 756-770. Springer: Tokio, Japan.
54. Miteva, V. I., P. P. Sheridan, and J. E. Brenchley. 2004. "Phylogenetic and Physiological Diversity of Microorganisms Isolated from a Deep Greenland Glacier Ice Core." *Applied and Environmental Microbiology* 70: 202–213.
55. Morgan-Kiss, R. M., J. C. Priscu, T. Pockock, L. Gudynaite-Savitch, and N. P. A. Hunter. 2006. "Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 222–252.
56. Muyzer, G., E. C. De Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
57. Namsaraev, Z., M. J. Mano, R. Fernandez, and A. Wilmotte. 2010. "Biogeography of terrestrial cyanobacteria from Antarctic ice-free areas." *Annals of Glaciology* 51: 171-177.
58. Nogi, Y. 2011. "Taxonomy of psychrophiles." In *Extremophiles handbook*, edited by K. Horikoshi, G. Antranikaian, A. T. Bull, F. T. Rob and K. O. Stetter, 778-787. Springer Tokio, Japan.
59. Pessi, I. S., O. Elias Sde, F. L. Simões, J. C. Simões, and A. J. Macedo. 2012. "Functional diversity of microbial communities in soils in the vicinity of Wanda Glacier, Antarctic Peninsula." *Microbes and Environments* 27: 200-203.
60. Price, P. B. 2007. "Microbial life in glacial ice and implications for a cold origin of life." *FEMS Microbiology and Ecology* 59: 217-231.
61. Priscu, J.C., E.E. Adams, W.B. Lyons, M.A. Voytek, D.W. Mogk, R.L. Brown, C.P. McKay, et al. 1999. "Geomicrobiology of subglacial ice above Lake Vostok, Antarctica." *Science* 286: 2141 -- 2144.
62. Rivkina, E., K. Laurinavichius, J. McGrath, J. Tiedje, V. Shcherbakova, and D. Gilichinsky. 2004. "Microbial life in permafrost." *Advances in Space Research* 33: 1215–1221.

63. Rothschild, L. J., and R. L. Mancinelli. 2001. "Life in extreme environments." *Nature* 409: 1092-1101.
64. Scholten, J. C. M., S. B. Joye, J. T. Hollibaugh, and C. Murrell J. 2005. "Molecular analysis of the sulfate reducing and archaeal community in a meromictic soda lake (Mono Lake, California) by targeting 16S rRNA, mcrA, apsA, and dsrAB genes." *Microbial Ecology* 50: 29-39.
65. Segawa, T., K. Ushida, H. Narita, H. Kanda, and S. Kohshima. 2010. "Bacterial communities in two Antarctic ice cores analyzed by 16S rRNA gene sequencing analysis." *Polar Science* 4: 215-227.
66. Sharp, M., J. Parkes, B. Cragg, I.J. Fairchild, H. Lamb, and M. Tranter. 1999. "Widespread bacterial populations at glacier beds and their relationship to rock weathering and carbon cycling." *Geology* 27: 107 -- 110.
67. Skidmore, M. L., J. M. Foght, and M. J. Sharp. 2000. "Microbial Life beneath a High Arctic Glacier." *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3214-3220.
68. Teehera, Kimberly B., Sean P. Jungbluth, Bogdan P. Onac, Tayro E. Acosta-Maeda, Eric Hellebrand, Anupam K. Misra, Andreas Pflitsch, et al. 2017. *Cryogenic minerals in Hawaiian lava tubes: A geochemical and microbiological exploration*. Geomicrobiology Journal. doi:10.1080/01490451.2017.1362079.
69. Varin, T., C. Lovejoy, A. D. Jungblut, W. F. Vincent, and J. Jorbeiladin. 2010. "Metagenomic profiling of Arctic microbial mat communities as nutrient scavenging and recycling systems." *Limnology and Oceanography* 55: 1901-1911.
70. Xiang, S., T. Yao, L. An, B. Xu, and J. Wang. 2005. "16S rRNA sequences and differences in bacteria isolated from the Muztag Ata glacier at increasing depths." *Applied Environmental Microbiology* 71: 4619-4627.
71. Zhou, J., M. A. Bruns, and J. M. Tiedje. 1996. "DNA recovery from soils of diverse composition." *J Appl Envrion Microbiol* 62: 316-322.
72. Zumsteg, A., J. Luster, H. Göransson, R. H. Smittenberg, I. Brunner, S. M. Bernasconi, J. Zeyer, and B. Frey. 2012. "Bacterial, archaeal and fungal succession in the forefield of a receding glacier." *Microbial Ecology* 63: 552-564.



