

**ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI**

**TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMAT**

**”Mecanisme de adaptare la temperaturi scăzute în
microorganisme psihrofile”**

Scientific Coordinator:

Senior researcher Dr. CRISTINA LIGIA PURCĂREA

PhD Student:

ANTONIO MONDINI

Bucharest 2019

Cuprins

1. EXTREMOFILE	4
2. MICROORGANISMELE PSIHROFILE	8
3. MICROORGANISMELE DIN MEDII RECI	9
4. BIOSINTEZA PIRIMIDINELOR	16
5. MICROORGANISMELE INVESTIGATE	23
SCOPUL CERCETĂRILOR	25
CAPITOLUL I: MECANISME MOLECULARE DE ADAPTARE LA TEMPERATURI SCĂZUTE	28
1.1 INTRODUCERE	28
1.2 MATERIALE ȘI METODE	29
1.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII	41
1.4 CONCLUZII	61
CAPITOLUL II: RĂSPUNSUL LA ȘOCUL TERMIC AL COMUNITĂȚILOR MICROBIENE DIN MEDII RECI ȘI MODELUL DE BACTERIE PSIHROFILĂ	63
2.1 INTRODUCERE	63
2.2 MATERIALE ȘI METODE	64
2.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII	69
2.4 CONCLUZII	79
CAPITOLUL III: IMPACTUL STRESULUI DE ȘOC TERMIC ASUPRA DIVERSITĂȚII STRUCTURALE ȘI FUNCȚIONALE A MICROBIOMURILOR TOTALE ȘI ACTIVE ÎNGLOBATE ÎN GHEAȚĂ	80
3.1 INTRODUCERE	80
3.2 MATERIALE ȘI METODE	81
3.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII	85
3.4 CONCLUZII	101
CAPITOLUL IV: IMPACTUL CLIMATIC ȘI GEOCHIMIC ASUPRA COMUNITĂȚILOR DE FUNGI ÎNGLOBATE ÎN GHEAȚĂ	103
4.1 INTRODUCERE	103
4.2 MATERIALE ȘI METODE	104
4.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII	109
4.4 CONCLUZII	122
CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE	123
PUBLICAȚII ȘI DISEMINAREA REZULTATELOR	129
BIBLIOGRAFIE	131

Introducere

O mare parte a biosferei este expusă la temperaturi persistente sau sezoniere sub 5°C (Margesin și colab., 2007). Aceste medii reci caracterizate prin prezența unor mase extinse de gheață cuprind mările adânci (90% din oceane prezintă temperaturi <5°C), deșerturile reci și habitatele glaciare (Margesin și Miteva, 2011). Deși mediile acoperite cu gheață au fost considerate anterior abiotice sau ca un potențial depozit creat prin transport stocastic de către vânt (Cowan și Tow 2004), s-a descoperit că adăpostesc o varietate surprinzătoare de microorganisme care au fost detectate și recuperate prin tehnici de cultivare (Van de Vossenberg și colab., 1998). Cu toate că în mediile reci, deficitul de apă reprezintă o provocare, cercetătorii au demonstrat prin studii de încorporare a izotopilor (Christner, 2002; Junge și colab., 2004) și prin vizualizarea microscopică (Bakermans și colab., 2003) că celulele bacteriene sunt metabolic active și capabile de proliferare. În prezent, mediile reci sunt cele mai puțin cercetate de pe Pământ (Buzzini et al., 2012).

S-a constatat că o multitudine de medii reci de pe planeta noastră, definite ca alcătuind împreună criosfera, găzduiesc microorganisme aparținând celor trei domenii ale vieții (Feller, 2013) Bacteria (Morita, 1975), Archaea (Cavicchioli, 2006) și Eukarya, inclusiv algele (Morgan-Kiss și colab., 2006) și fungii (Buzzini și colab., 2012). Habitatele glaciare includ zăpada (Maccario și colab., 2019), gheața glaciară (Miteva, 2008), crioconitele supraglaciare (Edwards și colab., 2014) și sedimentele subglaciare (Hamilton și colab., 2013), gheața de mare (Bowman și colab., 2011), apa de mare (Han și colab., 2014) și permafrostul (Mackelprang et al., 2011). Temperatura scăzută, corelată cu deficitul de apă, a activat un proces deosebit de selecție naturală, care a favorizat speciile cele mai rezistente și a avut ca și consecință modelarea atipică a comunității microbiene adaptate la rece (Anesio și Bellas, 2011).

Obiective și contribuție

Această teză își propune să contribuie la înțelegerea mecanismelor de adaptare la temperaturi scăzute a microorganismelor din habitate înghețate la diferite niveluri de organizare, dezvăluind o serie de adaptări structurale ale aspartat transcarbamoylazei (ATC-ază), enzima cheie a biosintezei nucleotidelor pirimidinice, din bacteriile psihrofile *Glaciibacter superstes* și *Rugamonas sp.*, alături de răspunsurile termice ale celulelor bacteriene și ale microbiomului din gheață în cazul schimbării habitatului ca o consecință a retragerii ghețarilor. Datele coroborate cu privire la dependența de temperatură a microbiomurilor totale și active din gheață, expresia diferențială a genelor de șoc termic și a celor legate de sinteza ADN și proprietățile structurale ale extremozimelor au contribuit la

descifrarea rezistenței microbiene și a mecanismelor răspunsului la variații bruște de temperatură pentru a face față condițiilor extreme și variațiilor climatice în contextul încălzirii globale.

Gheața glaciară acoperă o zonă semnificativă a planetei și se confruntă în prezent cu o viteză accelerată de topire, combinată cu o potențială remodelare a compoziției microbiene, ca urmare a expunerii la o variație de temperatură la trecerea spre solul adiacent. În acest context, prezenta lucrare s-a concentrat pe investigarea mecanismelor de adaptare termică a microorganismelor psihrofile și impactul șocului termic asupra microbiomurilor din mediile înghețate la nivel comunitar, celular și molecular în contextul impactului schimbărilor climatice asupra microbiomurilor din gheață asociate topirii ghețarilor (Figura 1).

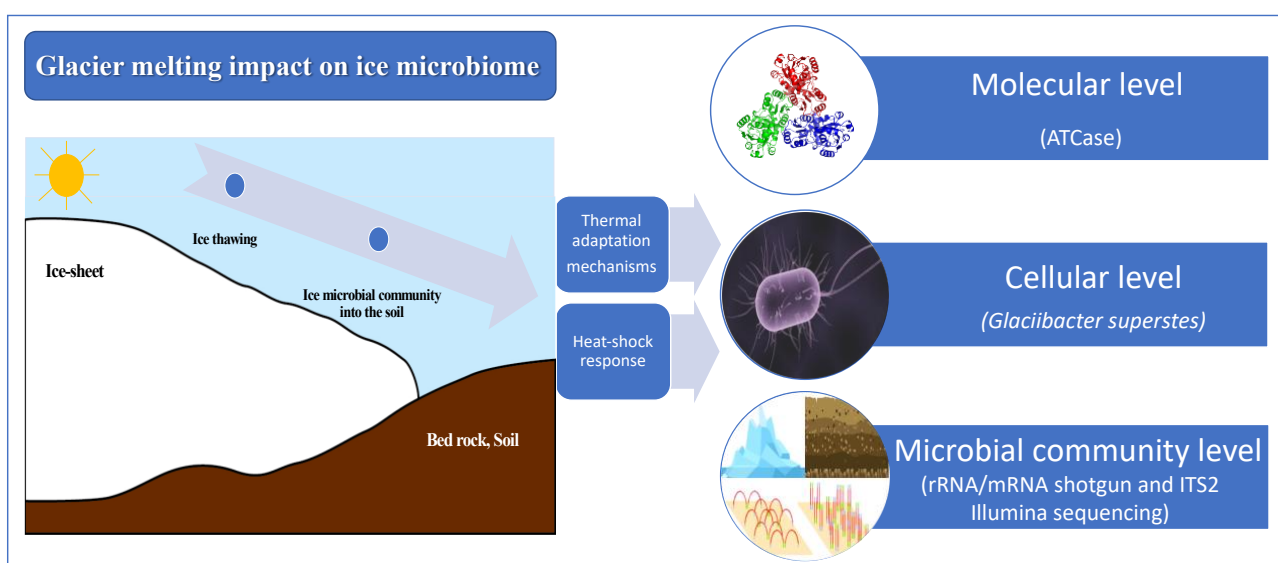


Figura 1. Modelul conceptual al răspunsului celular la încălzire

Investigarea dependenței de temperatură a microbiomului din gheață, a expresiei genice diferențiale și a proprietăților structurale / funcționale ale enzimei cheie care catalizează *de novo* a nucleotidelor pirimidinice în bacteriile psihrofile a contribuit la descifrarea mecanismelor de adaptare microbială la mediile înghețate și la variații bruște de temperatură pentru a face față condițiilor extreme și variațiilor climatice.

Capitolul I: Mecanisme de adaptare la rece

Psihrofilele au evoluat producând enzime active la rece, capabile să facă față reducerii ratelor de reacție chimică induse de temperaturi scăzute și trebuie să se bazeze pe o rețea eficientă și complexă de mecanisme pentru a reduce daunele folosind o strategie adaptivă cheie care modifică structura și funcționalitatea propriilor enzime. Pentru a descoperi mecanismele de adaptare termică a sintezei de ADN în bacteriile psihrofile, au fost investigate proprietățile structurale ale enzimei cheie care catalizează primii pași ai biosintezei pirimidinice, aspartat transcarbamoilaza (ATC-aza) de la *Rugamonas sp.*, tulpina izolată dintr-un lac cu apă dulce din Antarctica, și *Glaciibacter superstes* izolat dintr-o pană de gheață din Alaska. Structura primară, secundară și terțiară, precum și distribuția clusterilor hidrofobi în ambele enzime active la temperaturi scăzute au fost analizate în comparație cu alte enzime omoloage psihrofile, mezofile și hipertermofile, pentru a descoperi caracteristicile structurale de adaptare la rece și adaptări structurale particulare la mediile reci ale acestei enzime cheie a biosintezei nucleotidelor pirimidinice legate de funcția lor la temperaturi scăzute.

Aspartat transcarbamoilaza (ATC-aza EC: 2.1.3.2) este o enzimă citosolică implicată în prima etapă a biosintezei *de novo* a pirimidinei (Berg și colab., 2002). Această enzimă este capabilă să efectueze condensarea L-aspartatului și carbamoil fosfatului (CP) pentru a produce N-carbamoil-L-aspartatul (CAA) cu obținerea finală de CTP (Lipscomb și Kantrowitz, 2011). Holoenzima este formată din două subunități catalitice trimerice (c3)₂ (34 kDa fiecare) și trei subunități dimerice reglatoare (r2)₃ (17 kDa fiecare) care se combină pentru a forma un complex dodecameric (310 kDa) cu următoarea compoziție a subunităților 2(c3):3(r2) (De Vos și colab., 2004). Structura activă dodecamerică prezintă un comportament alosteric (Macol și colab., 2001) și a fost studiată pe larg folosind enzima de la *E. coli* ca model (Helmstaedt și colab., 2001).

Acest studiu cuprinde analiza structurală a ATC-azei din bacteriile psihrofile *Glaciibacter superstes* aparținând familiei microbacteriaceelor și izolate din pană de gheață din Alaska, și *Rugamonas sp.* aparținând familiei pseudomandaceelor și prelevate dintr-un lac cu apă dulce situat pe Insula King George (nord-vestul Antarcticii) în comparație cu alte enzime omologe psihrofile, mezofile și hipertermofile. Gena *pyrB* care codifică lanțul catalitic al ATC-azei de la *G. superstes* a fost clonată și exprimată în *E. coli*. În cazul *Rugamonas sp.*, enzima recombinantă a fost purificată prin cromatografie de afinitate din proteina de fuziune exprimată heterolog în *E. coli*.

Scopul acestui studiu este de a determina modificările structurale la nivel molecular ale enzimei cheie a căii de biosinteză *de novo* a nucleotidelor pirimidinice în cazul bacteriilor adaptate la rece, pentru a

înțelege mecanismele de adaptare la condițiile extreme de mediu ale acestei clase de enzime esențiale pentru sinteza ADN în celulă.

Concluzii

Acest studiu a oferit o analiză structurală comparativă a ATC-azelor din specii de *Rugamonas sp.* și *G. superstes* prin evaluarea adaptărilor structurale la temperaturi scăzute corelate cu enzimele omologe de la specii mezofile, psihrofile și hipertermofile. Evaluarea omologiei structurii primare a relevat o conservare completă a resturilor situsului activ în toate ATC-azele de la procariote investigate, în conformitate cu ubicuitatea și reacția comună catalizată de această enzimă în toate organismele, în sprijinul conservării căii de biosinteză a pirimidinei, în timpul proceselor evolutive. O deosebire remarcabilă în compoziția aminoacizilor acestora constă în absența cisteinei, conținutul redus de resturi de acid glutamic atât pentru *Rugamonas sp.* cât și pentru *G. superstes* și conținutul crescut de histidine și proline în ATC-aza de la *Rugamonas sp.* în comparație cu omologii mezofili și hipertermofili.

Absența resturilor de cisteină și numărul mic estimat de interacțiuni ionice din enzima ATCază ce aparține bacteriilor psihrofile *Rugamonas* și *Glaciibacter* indică atât lipsa punților disulfidice cât și un conținut mai mic de punți de sare de la nivelul lanțului catalitic al ATCazei, ceea ce sugerează o flexibilitate crescută a enzimelor active la temperaturi scăzute.

Modelul structurii secundare al enzimelor psihrofile a evidențiat un număr mai mare de spirale, în special în cazul ATCazei din *G. superstes*, ceea ce sugerează interacțiuni îmbunătățite între subunitățile catalitice ce prezintă o flexibilitate crescută la nivelul zonei catalitice.

ATCazele psihrofile analizate au evidențiat numărul și mărimea redusă a grupurilor hidrofobe și o distribuție specifică de-a lungul lanțului PyrB, favorizând o flexibilitate crescută a acestei clase de proteine adaptate la rece.

Modelul 3D al ATCazelor din *Rugamonas sp.* și *G. superstes* a evidențiat existența unor modificări la interfața subunităților în comparație cu enzimele din *E. coli* și *P. abyssi* care ar putea afecta stabilitatea trimerului și o orientare spațială diferită a resturilor de la nivelul situsului catalitic.

ATCaza recombinantă din *Rugamonas sp.* a fost cu succes exprimată în *E. coli* și purificată prin cromatografie de afinitate.

Spre deosebire de enzimele omologe mezofile și heterofile, modificările observate la nivelul structurilor primare, secundare și terțiare ale ATCazelor psihrofile par să favorizeze procesul catalitic datorită unei flexibilități sporite atât a domeniilor enzimactice care adăpostesc situsul activ cât și a

subunităților de la nivelul de interacțiune al trimerului. Plasticitatea crescută stabilită pentru enzimele din mediul rece ar putea permite enzimei psihrofile să își mențină activitatea la temperaturi foarte scăzute și ar putea scădea ΔG de activare prin reducerea distanței dintre resturile situsului de legare la substrat.

Cercetarea actuală a structurii ATC-azei de la ambele bacterii psihrofile a contribuit la înțelegerea mecanismelor de adaptare la rece, subliniind o serie de caracteristici moleculare care favorizează cataliza la temperaturi scăzute într-una dintre enzimele cheie implicate în sinteza ADN și responsabilă de rezistența bacteriilor care se dezvoltă în mediile înghețate. Investigații suplimentare privind caracteristicile funcționale și structura cristalină a ATC-azei psihrofile vor corobora ipoteza noastră și vor extinde evaluarea adaptărilor termice specifice ale enzimei active la temperaturi scăzute. Rezolvarea structurii cristalografice cu raze X a acestei ATC-aze va contribui la relevarea unor adaptări moleculare suplimentare ale acestei enzime la temperaturi scăzute, în comparație cu omologii mezofili și (hiper) termofili, pentru a extinde înțelegerea generală a strategiilor structurale ale catalizatorilor cheie de la extremofilele adaptate la medii reci.

Capitolul II: Răspunsul la șocul termic al comunităților microbiene din medii reci și modelul de bacterie psihrofilă

Topirea ghețarilor presupune transferul comunităților microbiene din gheață către noi tipuri de habitate precum solul adiacent, și o posibilă expunere la variațiile ridicate de temperatură în timpul ritmului circadian. Răspunsul termic microbial a fost investigat printr-un experiment ciclic de căldură/îngheț timp de 7 zile, examinând modificările modelului expresiei genice la nivelul microbiomului unui miez de gheață din peștera de gheață Scărișoara, din solul subglacial islandez și în tulpina bacteriană psihrofilă *Glaciibacter superstes*, pentru a determina un biomarker enzimatic pentru rezistența microbiomului la tratamentul de șoc termic.

Modelul de expresie genică care codifică pentru enzima cheie biosinteza nucleotidelor pirimidinice - aspartat transcarbamoilaza (ATC) și a familiei *dnaK* (HSP70) a fost determinat prin qPCR, făcându-se comparație între bacteria psihrofilă model și cele două tipuri de habitate reci din punct de vedere al răspunsului la ciclul termic zilnic și al viabilității celulare, cu scopul de a evalua un biomarker enzimatic pentru răspunsul comunității microbiene la variațiile de temperatură ce au loc în timpul modificărilor habitatelor din cauza retragerii ghețarului.

Impactul antropic asupra climei are un efect negativ remarcabil asupra ecosistemului, declanșând o scădere a biodiversității (Cavicchioli și colab., 2019). Cu toate că speciile macroscopice aflate pe cale de dispariție au dobândit interes în ultimii ani, până în prezent nu a fost efectuată nici o evaluare a impactului schimbărilor climatice asupra „lumii microscopice” referitoare la influența modificării structurii microbiomurilor asupra ciclurilor de nutrienți și a carbonului. În ultimele decenii, încălzirea globală a produs o creștere a topirii ghețarilor (Weller și colab., 2005), provocând o pierdere mai mare de gheață odată cu transferul comunității înglobate în gheață în solul vecin. Odată ce comunitatea microbială ajunge în sol, aceasta este expusă la temperaturi mai ridicate și la lumina directă a soarelui. Viteza crescută de topire ar putea duce la modificări ale microcosmosului microbial și la o revizuire a modelului de expresie a genelor. Studiile au demonstrat efectul încălzirii asupra schimbării comunității microbiene din sol (Frey și colab., 2008). Temperatura este fără îndoială unul dintre cei mai mari factori de stres care aduce provocări pentru creșterea microbială. Prin urmare, înțelegerea strategiilor de termotoleranță microbială ce conduc la reziliență și adaptare la medii extreme (Deegenaars și Watson, 1998) ar putea fi crucială pentru a evalua supraviețuirea și modelarea structurală a microbiomilor.

Pentru a înțelege răspunsul comunității microbiene din habitate reci la variațiile de temperatură ale mediului, a fost investigat efectul tratamentului de șoc termic asupra modelului de expresie genică al diferitelor microbiomuri din habitate reci. Experimentul a constat în aplicarea unui ciclu de șoc termic zilnic urmat de incubare la temperatura constantă de 4°C, timp de 1 săptămână, pe gheața din peștera Scărișoara și solul subglacial islandez, în timp ce cultura de *Glaciibacter superstes*, după șocul termic zilnic, a fost alternativ incubată atât la 4°C cât și la -18 °C temperatură constantă. Evaluarea modificărilor expresiei genice apărute în urma tratamentului termic al microbiomurilor și modelului bacterian a fost cuantificată prin RT-PCR folosind biblioteca construită de ADN complementar. Genele selectate au fost *pyrB*, ce codifică pentru aspartat transcarbamoilază (ATC), enzima cheie pentru biosinteza nucleotidelor pirimidine și *dnaK* ce codifică pentru proteina de șoc termic Hsp70 aflată în legătură cu mecanismele de apărare împotriva stresului termic (Richter și colab., 2010). Modificările genelor codificatoare pentru ATC și Hsp70 au fost corelate cu viabilitatea probelor tratate termic în baza evaluării conținutului de celule vii/moarte după fiecare etapă de șoc termic.

Cuantificarea comparativă a expresiei acestor gene la cicluri repetate de șoc termic a evidențiat răspunsurile microbiene pe termen lung și scurt la variațiile de temperatură legate de sinteza ADN-ului și strategiile specifice de apărare termică în funcție de habitatul microbiomului (gheață și sol) cât și într-un model de bacterie psihrofilă.

Concluzii

Răspunsul termic după ciclurile de 7 zile de șoc termic aplicate pe solul ghețarului din Islanda, nucleul de gheață al peșterii Scărișoara și modelul bacteriilor psihrofile *Glaciibacter superstes*, a relevat profiluri complementare de expresie pentru genele care codifică pentru aspartat transcarbamoilaza (ATC), enzimă cheie în biosinteza de novo a nucleotidelor pirimidinice, și pentru familia proteinelor de șoc termic Hsp70, în funcție de tipul de habitat (sol versus gheață) și de complexitatea microbiană (cultură versus microbiom).

Comunitățile microbiene supuse șocului termic au arătat o creștere a transcrierii genelor în comparație cu probele netratate termic. Investigarea răspunsului termic prin metoda RT-PCR a genei care codifică pentru familia HSP70 a dezvăluit un reglaj în sus atât în cazul culturii de *G. superstes* cât și în cazul comunității microbiene din gheață, indicând astfel un proces de adaptare pe termen scurt. Răspunsul microbiomului de gheață la stresul termic a dezvăluit o reglare în sensul creșterii genelor implicate în procesele de protecție celulară, cum ar fi HSP70 și un reglaj negativ (down-regulation) al genei *pyrB* implicate în procesele de duplicare celulară. Spre deosebire de microbiomul de gheață, comunitățile microbiene din sol au fost mai puțin sensibile la aplicarea șocului termic probabil

datorită preadaptării termice în conformitate cu proveniența lor din gheață înainte de topirea acesteia. Evaluarea viabilității celulare a furnizat o indicație a modului în care expresia crescută a genei *pyrB* ar putea fi corelată cu duplicarea celulară. Răspunsul la șocul termic al expresiei genei *pyrB* a definit ATCaza drept potențial biomarker enzimatic al impactului temperaturii din mediu asupra comunităților microbiene din gheață și sol, oferind un posibil instrument pentru a evalua rezistența microbiomului atunci când este expus la variații de temperatură.

Analizele comparative ale variațiilor în profilul de expresie al genelor ATC și HSP70 după șapte zile de tratament de șoc termic au contribuit la înțelegerea echilibrului dintre strategiile pe termen scurt și pe termen lung pentru supraviețuirea celulelor microbiene după tulburări de mediu în funcție de tipul de habitat.

Coroborarea modelului de expresie a genelor modificate și a proprietăților structurale/funcționale ale enzimei cheie a sintezei de novo a nucleotidelor pirimidine din bacteriile adaptate la rece vor furniza cunoștințele noastre despre mecanismele de adaptare la condiții extreme de mediu atunci când se schimbă habitatele din cauza topirii ghețarilor.

Capitolul III: Impactul stresului de șoc termic asupra diversității structurale și funcționale a microbiomurilor totale și active înglobate în gheață.

Pentru a descoperi impactul variației termice a mediului asupra microbiomului din gheață atât la nivel taxonomic, cât și metabolic, s-a efectuat o analiză metatranscriptomică a ARNr total extras din depozite de gheață veche de 900 de ani, din Peștera „Ghețarul de la Scărișoara”. Extracția ARN a fost realizată pe baza unui protocol dezvoltat specific în această teză, iar bibliotecile de ADNc pentru fiecare etapă au fost secvențializate folosind o platformă Illumina NextSeq. Metatranscriptomica Shotgun a microbiomului din gheață în vârstă de un mileniu de la Peștera Scărișoara, supusă unui tratament de șoc termic ciclic timp de 3 zile, a constituit prima caracterizare a comunității microbiene active din acest tip de habitat. Au fost astfel obținute informații taxonomice și funcționale asupra variației bacteriilor potențial active, speciilor de Archaea și Eukaria, și asupra căilor metabolice și genelor bazate pe analize de ARN ribozomal și mesager.

Prin acest experiment se dorește completarea informațiilor referitoare la procesele microbiene necunoscute ce au loc după dezghețul stratului superior de gheață din acest habitat interesant și izolat, oferind o primă viziune asupra distribuției post-perturbare a microbiomului din gheață, expresiei genelor și a proceselor de prădare ce au loc în vederea obținerii în final a unei comunități stabile.

Gheața poate fi considerată o matrice de stocare a microorganismelor, reprezentând o sursă de diversitate genomică și un rezervor de noi specii microbiene (Ma și colab., 2000). Recent, au fost efectuate investigații asupra comunităților microbiene dintr-o serie de medii înghețate, inclusiv permafrost (Schostag și colab., 2019), straturi de gheață antarctice (Abyzov și colab., 2005), gheață polară (Ma și colab., 1999), gheață de mare (Nichols și colab., 2005) și, de asemenea, lacuri subglaciare (Rogers și colab., 2013). Printre aceste habitate, peșterile de gheață furnizează informații limitate cu privire la microbiomul din depozitele subterane de gheață perenă acumulate în aceste habitate izolate (Purcarea, 2018). Prezența microorganismelor în gheața din peștera Scărișoara a fost menționată pentru prima dată în stalagmitele de gheață formate în zona Mica Rezervație (Hillebrand-Voiculescu și colab., 2013), urmate de studii asupra comunităților microbiene cultivabile/necultivabile din blocul de gheață perenă (Hillebrand-Voiculescu și colab., 2014), și asupra distribuției cronologice a bacteriilor cultivate în straturile de gheață vechi de până la 900 de ani (Ițcus și colab., 2016). Cu toate că metoda de cultivare a oferit un pas înainte în screeningul microbial, cercetătorii au conștientizat limitările tehnicilor dependente de cultură, datorate problemelor de necultivabilitate în descrierea diversității microbiomurilor (Hug și colab., 2016). Pentru a depăși

această problemă, au fost realizate studii utilizând electroforeza cu gel de denaturare (DGGE) pentru a descoperi diversitatea fungică (Brad și colab., 2018), în timp ce o identificare mai avansată a secvențelor a fost obținută cu ajutorul tehnicilor moleculare, incluzând 454-pirosecvențializarea comunității procariote (Ițcus și colab., 2018) și secvențializarea de ultimă generație (NGS) a comunităților fungice din straturi de gheață veche de până la 1500 de ani, pe baza secvențializării Illumina a genei ITS2 (Mondini și colab., 2019).

Toate aceste rapoarte bazate pe secvențializarea ADN oferă informații despre comunitățile microbiene totale, în timp ce până în prezent nu au fost furnizate date legate de microbiomul activ din punct de vedere metabolic din acest habitat. Recent, comunitățile bacteriene totale și potențial active dintr-un nucleu de gheață cu o vechime de până la 13.000 de ani din peștera Scărișoara au fost determinate prin secvențializarea genei 16S rRNA cu ajutorul platformei Illumina (Paun și colab., 2019), sugerând existența unei comunități microbiene active la nivelul acestui habitat. În acest context, unul dintre studiile dezvoltate în această teză s-a concentrat pe investigarea microbiomului activ din gheața perenă din peștera Scărișoara, folosind secvențializare Illumina shotgun a ARN și reconstituirea metatranscriptomică a comunităților microbiene procariote și eucariote totale și active. Proba de gheață 900-O a fost aleasă în baza determinărilor anterioare ale diversității mari a procariotelor (Ițcus și colab., 2018) și fungilor (Mondini și colab., 2019). Complexitatea microbiomului din proba 900-O poate fi atribuită climatului cald și umed specific formării stratului de gheață caracteristic Perioadei Medievale Calde (MWP), ceea ce ar fi putut duce la o acumulare mai accentuată de sedimente și materie organică cauzată de ploile abundente (Persoiu și colab., 2017).

Deși rapoartele despre metatranscriptomii din habitatele înghețate au indicat prezența în gheață a microorganismelor active (Rogers și colab., 2013), acesta este primul studiu care dezvăluie comunitățile microbiene procariote și eucariote active din gheața perenă a unei peșteri, în baza secvențializării Illumina a metagenomurilor ARN ribozomal și mesager. Mai mult, datele din această teză raportează schimbările ce au loc la nivel taxonomic și metabolic în comunitățile microbiene totale și active, ca răspuns la un tratament de șoc termic de 3 zile, urmat de o etapă de incubare la 4°C timp de 14 zile, pentru a înțelege impactul pe care topirea ghețarului îl are asupra microbiomului înglobat în gheață.

Concluzii

Până în prezent, aceasta este prima dovadă a unui microbiom activ în gheața perenă din peșteri și a efectului pe care un tratament termic îl are asupra microbiomurilor totale și active din gheață. Este cunoscut faptul că schimbările de temperatură perturbă homeostazia microbiană alături de o distribuție modificată a taxonilor, în timp ce prea puțin este cunoscut referitor la răspunsul genelor. Această caracterizare a modificărilor structurale și funcționale ale unei comunități microbiene generate de o creștere a temperaturii și de o perioadă de incubare prelungită poate ajuta la sporirea înțelegerii habitatelor aflate în curs de schimbare și al impactului ecologic al acestora, datorat topirii ghețarilor.

Studiul actual asupra microbiomului prezent în depozitele de gheață din peștera Scărișoara a relevat o comunitate potențial activă complexă (ARN_r) în acest habitat și a confirmat prezența microorganismelor active (ARN_m) în straturile de gheață de 900 de ani vechime. Microbiomul potențial activ din acest habitat înghețat a scos la iveală o comunitate complexă, având o compoziția distinctă ce susține rezistența la șocul termic și răspunsul funcțional specific în cazul variației termice ciclice între 4°C-25°C. Comunitate microbiană presupusă a fi potențial activă a fost dominată de taxoni copiotrofi capabili să utilizeze rapid sursa de carbon eliberată prin topirea gheții. Filumurile Proteobacteria și Bacteroidetes au dominat comunitatea, indicând astfel o rezistență sporită la în cazul stresului termic, spre deosebire de filumurile Firmicutes și Actinobacteria care au prezentat o scădere a abundenței relative și, prin urmare, o capacitate redusă de a face față creșterilor de temperatură. Archaea, caracterizată în principal prin clasa Methanomicrobia ce aparține filumului Euryarchaeota, a avut o prezență slabă în T0, fiind foarte afectată de șocul termic, fără a prezenta o creștere a abundenței relative chiar și după o incubare prelungită. Comunitatea fungică a fost aparent cea mai afectată de șocul termic, cel mai mare număr de citiri fiind alocat filumurilor Blastocladiomycota și Chytridiomycota adaptate la habitatele acvatice, în timp ce filumurile Basidiomycota și Ascomycota au prezentat o scădere a abundenței lor relative, ceea ce indică o rezistență scăzută la șocul termic. Microeucariotele, deși afectate de creșterea temperaturii, au prezentat (după incubare prelungită) o creștere a abundenței lor relative. Flagelatele heterotrofe precum Stramenopiles, au prezentat cea mai crescută prezență după o săptămână și au atins maximum după 14 zile. Proliferarea acestui grup de protozoare a desemnat un proces de prădare ridicat bacteriilor, fiind favorizat de dimensiunile reduse (comparativ cu alte protozoare), grăbind timpul de duplicare.

Analiza modelului diferențial de expresie a genelor a ajutat la descoperirea factorilor de rezistență implicați în mecanismul de adaptare al microorganismelor. Tratamentul cu șoc termic a determinat activarea transcripției genelor care codifică proteinele chaperon (familia HSP60), superoxid

dismutazele și factorul SigmaE alternativ al activității polimerazei, conferind celulelor microbiene o rezistență suplimentară la stresul termic. În conformitate cu prezența dominantă a claselor de bacterii prevăzute cu un mod de viață copiotrof, a fost observată o ușoară creștere a genelor asociate ciclului Acidului Tricarboxilic (ciclul TCA) urmată de o ușoară reducere după 14 zile. Expresia genelor care codifică pentru Polihidroxiacaloați (PHA) a fost crescută în cazul tuturor probelor, indicând astfel o activitate crescută în stocarea energiei. Reglaj genetic suplimentar a fost observat în cazul genelor implicate în reglarea carbonului și a nitrogenului, și a motilității celulare ținând cont de mediul apos. Incubarea prelungită (T14) a arătat o creștere a transcrierii pentru activarea mecanismului de apărare, sugerând începerea competiției pentru sursele nutritive similare.

Capitolul IV: Impactul climatic și geochemic asupra comunităților fungice încorporate în gheață

Investigația noastră furnizează prima secvențializare a genei ITS2 prin Illumina MiSeq a microbiomului din gheață veche de 1500 de ani din Peștera de Gheață Scărișoara, pentru a determina distribuția temporală a comunităților fungice din depozitele de gheață ale peșterii în raport cu variația climatică în timpul depunerii perene de gheață și cu configurația geochemică. Distribuția taxonilor în straturile de gheață formate în perioade mai calde (perioada caldă medievală) și perioadele mai reci (mica epocă de gheață) a fost analizată în vederea identificării biomarkerilor fungici pentru variațiile climatice din această peșteră de gheață perenă, consolidând relațiile dintre populația microbiană și caracteristicile mediului. Corelarea distribuției taxonilor fungici în blocul de gheață al peșterii cu parametrii geochemici ai gheții a fost, de asemenea, realizată pentru a evalua impactul compoziției chimice a substratului asupra structurii comunității fungice. Această lucrare abordează lipsa de informații referitoare la distribuția microcosmosului înglobat în depunerile perene de gheață ale peșterii, permițând determinarea rolului fungic în acest habitat înghețat și oferind un potențial biomarker fungic pentru a înțelege climatul local și efectul substratului geochemic asupra compoziției microbiene în habitatele înghețate.

Interesul crescut din ultimele două decenii asupra habitatelor înghețate a condus la investigarea comunităților microbiene din gheață (Brinkmeyer et al., 2003) și la determinarea distribuției spațiale și temporale a acestora (Itcus et al., 2016) în diverse habitate înghețate.

Spre deosebire de mediile glaciare expuse terestre și marine, peșterile de gheață sunt printre cele mai slab explorate habitate reci (Kern și Perșoiu, 2013), motiv pentru care, până în prezent se cunosc foarte puține informații legate de comunitățile microbiene aferente acestora (Purcarea, 2018). În urma unor studii recente, bazate pe gena 18S ARNr efectuate pe probe din Peștera de Gheață Scărișoara, Romania, a fost raportată prezența eucariotelor microbiene aparținând speciilor heterotrofe și fototrofe (Hillebrand-Voiculescu și colab., 2014).

Interesul pentru aceste nișe cu gheață izolate și foarte bine conservate, se bazează pe potențialul de reconstituire paleoclimatică a straturilor de gheață acumulate (Perșoiu și colab., 2017). Diferitele studii geologice (Racoviță și Onac, 2000) și paleoclimatice (Perșoiu și colab., 2017) realizate în ultimele decenii pe depozitele de gheață din Scărișoara, au furnizat informații climatice și geochemice asociate cu formarea straturilor de gheață ale peșterii, utilizate ulterior în studiul impactului acestor parametri asupra diversității și structurii comunităților microbiene corespunzătoare fiecărui strat de gheață studiat (Purcarea, 2018). Aceste studii au relevat variațiile climatice care au avut loc în ultimul

mileniu, precum alternanța perioadelor reci și uscate din timpul Epocii mici de gheață (LIA; 1250-1860 AD) și a Perioada Întunecată Rece (DACP; 400-800 AD), cu intervalele calde și umede din timpul Perioadei Calde Medievale (MWP; 800-1250 AD) (Perșoiu și colab., 2017). Recent, în urma cercetărilor realizate pe diversitatea microbiană de-a lungul blocului de gheață perenă din peștera Scărișoara, a fost descoperită prezența bacteriilor necultivabile (Hillebrand-Voiculescu et al., 2014; Iteus și colab., 2018; Paun și colab., 2019), a bacteriilor (Iteus și colab., 2016) și fungilor (Brad și colab., 2018) cultivabili. Deși fungii își păstrează viabilitatea în straturile de gheață pentru cel puțin 1000 de ani (Abyzov, 1993; Ma și colab., 1999), tehnicile dependente de cultivare nu au reușit să identifice o diversitate crescută de taxoni fungici (Kochkina și colab., 2012). În acest sens, utilizarea tehnicilor moleculare a permis identificarea acestor tipuri de microorganisme la nivel de gen și specie (Ghosh, 2017).

Lucrarea de față abordează lipsa de informații referitoare la compoziția comunității fungice necultivabile din blocul de gheață al peșterii Scărișoara din straturile de gheață vechi de până la 1500 de ani, în baza secvențializării prin Illumina MiSeq a regiunii ITS2 (internal transcribed spacer 2) de la nivelul genelor ARNr, în raport cu diferitele configurații geochimice determinate în cursul anterioarelor înregistrări climatice. Din câte știm, acesta este primul raport referitor la distribuția diversității fungice necultivabile dintr-o peșteră de gheață perenă, utilizând secvențializarea de înaltă fidelitate.

Concluzii

În acest studiu s-a realizat pentru prima dată o secvențializare profundă a unei crono-secvențe de gheață cu o vechime de 1500 de ani, relevând o diversitate fungică extensivă în gheața din Scărișoara. În urma secvențializării prin Illumina MiSeq a genei ITS2 care a vizat comunitatea fungică înglobată în gheața din peșteră izolată, a fost obținut un număr total de 1751957 secvențe, care au corespuns la 182 unități taxonomice operaționale fungice. Aceste date sugerează atât o distribuție influențată de climă și factori geochimici de-a lungul acumulărilor de gheață perenă, cât și o diversitate în scădere direct corelată cu vârsta gheții, datorată unui proces de degradare a ADN-ului. La nivel de filum, Ascomycota a fost prezentă în toate straturile de gheață, dominând în straturile de gheață depuse în timpul Epocii mici de gheață (LIA) și a Perioadei Întunecate Reci. În același timp, filumul Basidiomycota a fost predominant în straturile de gheață de 900 de ani vechime, acumulate în cursul Perioadei Medievale Calde (MWP). După cunoștințele noastre, acesta este primul studiu unde a fost raportată prezența filumului Chytridiomycota într-un habitat înghețat. Atribuirea la nivel de gen a relevat prezența tulpinii fungice *Cryptococcus victoriae* în toate straturile de gheață analizate, ceea

ce sugerează o capacitate de adaptare și o reziliență puternice atribuite acestui ordin taxonomic. Mai mult, concentrația de Carbon Organic Dizolvat (DOC) a părut că are un rol important în distribuția taxonilor Basidiomycota, prezenți în abundență în straturile de gheață caracterizate printr-un conținut scăzut de DOC, fiind în același timp depășiți numeric de către speciile saprofite în gheața bogată în materie organică.

Acest raport a ajutat la deslușirea efectului climatic global asupra distribuției fungilor în habitatele înghețate, oferind o primă dovadă a identificării unui potențial biomarker fungic pentru variațiile climatice, corelând modificările la nivelul biodiversității cu evenimentele istorice de mediu în fiecare punct temporal analizat.

Concluzii generale și perspective

Adaptare structurală a enzimelor la temperaturi scăzute

Caracterizarea structurală și compararea ATCazelor recombinante din bacteriile psihrofile *Glaciibacter superstes* și tulpina de *Rugamonas sp.* cu cele ale bacteriilor mezofile *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa* și hipertermofile *Pyrococcus abyssi* și *Aquifex aeolicus* a evidențiat modificări specifice ale structurilor primare, secundare și terțiare, ale reziduurilor care formează interfețe de subunitate și domeniu, precum și a distribuției grupurilor hidrofobe ce contribuie la o stabilitate crescută și o structură mai flexibilă în vederea realizării reacției enzimatică la temperaturi scăzute.

Principalele rezultate privind analiza structurală a ATCazelor din *Glaciibacter superstes* și *Rugamonas sp.* sunt:

- Toate resturile de la nivelul situsului activ al ATCazei din tulpinile psihrofile, mezofile și hipertermofile analizate sunt conservate, în sprijinul reacției comune catalizate în toate organismele, independent de temperatura mediului.
- În comparație cu omologii mezofili și termofili, structura primară a ATCazei din *Glaciibacter superstes*, cât și din *Rugamonas sp.* a prezentat o absență completă a resturilor de cisteină (Cys), ceea ce duce la o structură mai flexibilă datorită lipsei punților disulfidice.
- Ambele ATCaze psihrofile au prezentat un conținut redus de acid glutamic (Glu) sugerând astfel un număr redus de punți de sare, ceea ce conferă o flexibilitate enzimatică crescută.
- ATCaza din *Rugamonas sp.* prezintă un conținut crescut de histidină (His) care ar putea fi responsabil de stabilizarea structurii datorită interacțiunilor ionice.
- Conținutul ridicat de resturi de Prolină (Pro) în ATCaza din *Rugamonas sp.* ar putea facilita plierea proteinei.
- Numărul crescut de spirale de la nivelul structurii secundare a ATCazei din *G. superstes* și poziția dezvăluită de modelul 3D ar putea favoriza interacțiunea dintre subunitățile catalitice pentru a favoriza cataliza la temperaturi scăzute și pentru a duce la creșterea interacțiunilor cu solventul.
- Prezența clusterelor hidrofobe reduse la nivelul interfaței domeniilor CP-ASP ar putea contribui la plasticitatea îmbunătățită a lanțului în momentul închiderii domeniilor în timpul catalizei.

- Clonarea și expresia heterologă în *E. coli* a genei *pyrB* recombinante din *G. superstes* și purificarea ATCazei recombinante de *Rugamonas sp.* au fost realizate cu succes în vederea caracterizării funcționale suplimentare.

Răspunsul celular bacterian la șocul termic

Rezistența celulară legată de sinteza nucleotidelor pirimidine și răspunsul proteinelor de șoc termic la tratamentul de șoc termic al bacteriei psihrofile *G. superstes* a fost evaluată prin cuantificarea prin RT-PCR a genelor care codifică pentru ATCază și pentru HSP70. În urma comparației modelelor de expresie ale celor 2 proteine timp de 7 cicluri zilnice de șoc termic, ATCaza a fost stabilită drept marker promițător al adaptărilor celulare la stresu termic din mediu.

- Modificările modelului de expresie genică microbiană au depins de starea de îngheț/non-îngheț a celulelor în timpul ciclurilor termice pentru expresia ATCazei, în timp ce expresia genei HSP70 a fost independentă de intervalul de temperatură (30°C/4°C sau 30°C/-18°C) al șocului termic
- Schimbarea temperaturii de răcire de la 4°C la -18°C după șocul de căldură a indus o creștere de 1,5 ori mai mare în expresia genei *pyrB*, ceea ce sugerează un răspuns îmbunătățit al sintezei ADN-ului în celulă pentru o adaptare mai rapidă la schimbările de mediu
- *G. superstele* dispune aparent de o strategie de adaptare pe termen scurt, exprimând un nivel mai ridicat al genelor care codifică pentru familia HSP70 după șocul termic, urmat de o stabilizare după 5 zile.
- Răspunsul opus al expresiei genelor pentru ATCază și HSP70 a fost observat independent față de intervalul de variație a temperaturii. Cea mai accentuată inducție a genei pentru HSP70 a avut loc după cicluri de șoc termic de 48 și 96 de ore, în timp ce expresia genei pentru ATCază a scăzut în primele 48 de ore și a atins pragul maxim după 72 și 120 de ore, ceea ce sugerează un răspuns complementar al celulei care duce la o protecție celulară eficientă în prima etapă urmată de sinteza crescută a ADN-ului pentru duplicarea celulară.
- Cuantificarea ATCazei a evidențiat o legătură directă cu viabilitatea celulară în timpul tratamentului termic, evidențiind această enzimă ca un potențial marker al răspunsului celular la stresul de mediu.

Adaptarea termică și răspunsul la șoc termic al microbiomurilor habitatelor reci

Studiul actual privind structura comunității microbiene din habitatele înghețate în raport cu geochimia și variațiile climatice din timpul depunerilor de gheață, și răspunsul comunității la tratamentul de șoc

termic a furnizat noi date despre impactul temperaturii mediului asupra diversității și rezistenței comunității fungice din gheața perenă acumulată în ultimii 1500 de ani în peștera Scărișoara, și despre răspunsurile taxonomice, metabolice și moleculare ale microbiomurilor totale și active din gheață și din sol la creșterea temperaturii și, respectiv, incubatie prelungită.

Screening-ul distribuției fungice în cronosecvența de gheață din peștera de gheață Scărișoara, bazată pe secvențializarea ITS2 Illumina a evidențiat relația dintre distribuția geochimică și climatică a taxonilor fungici, oferind dovezi pentru identificarea unui potențial biomarker fungic pentru variațiile climatice. Principale rezultate sunt:

- Taxonul Basidiomycota predomină în straturile de gheață caracterizate prin concentrații scăzute de carbon organic dizolvat (DOC), datorită capacității de a degrada resursele de carbon complexe din habitatele cu deficiențe nutritive.
- Conținutul ridicat de DOC a favorizat prezența Ascomycota, ceea ce sugerează că prezența taxonilor copiotrofi depășește număr de specii oligotrofe.
- Filotipul *Cryptococcus victoriae* a fost găsit în toate straturile de gheață analizate, sugerând versatilitatea metabolică ridicată a acestei specii fungice în diversele condiții geochimice și climatice.
- Filumul Basidiomycota a fost mai abundent în straturile de gheață formate în perioadele mai calde și mai umede (Perioada Medievală Caldă) asociată cu apariția acelor de *Picea abies* care ar fi putut să creeze un mediu acid mai ridicat, potrivit pentru versatilitatea ridicată a acestui filum.
- Filumul Ascomycota a dominat gheața depusă în timpul Epocii mici de gheață, mai rece și uscată, probabil asociată cu o dispersie mai ridicată a sporilor, din cauza precipitațiilor reduse și a ventilației crescute în peșteră din zonele înconjurătoare.
- Aceasta este prima raportare a filumului Chytridiomycota în habitate înghețate.
- Acest studiu a furnizat dovezi privind identificarea unui potențial biomarker fungic pentru variațiile climatice din acest habitat.

Răspunsul la tratamentul de șoc termic al microbiomurilor din gheațarul de peșteră și din pământul glaciatic din Islanda, evaluat prin expresia diferențială a genelor pentru ATCase și pentru familia HSP70 a scos la iveală un model de transcriere complex și complementar al acestor gene care variază în funcție de tipul de habitat.

- Comunitatea microbială din sol a prezentat o rezistență sporită la șocul termic datorită preadaptării la temperaturi crescute după topirea gheții, ca urmare a transcrierii reduse a genei

HSP70 în timpul tratamentului de șoc termic datorită prezenței moleculelor chaperon în celule.

- Comunitatea microbiană din gheață a dezvăluit o expresie a genei pentru HSP70 mai ridicată în primele 4 zile de tratament termic, urmată de o reducere a expresiei după o săptămână, ceea ce sugerează o adaptare mai lentă la șocul termic.
- Evaluarea perturbării microbiene generale bazată pe raportul dintre expresia genelor care codifică pentru ATCază și pentru HSP70 a arătat un model similar cu cel observat în cazul celulelor *G. superstes*, indicând o expresie genică complementară la nivel de microbiom a celor două tipuri de gene.
- ATCaza constituie un potențial biomarker enzimatic al rezistenței comunității microbiene, ca răspuns la variații extreme de temperatură, cuplate direct cu o viabilitate celulară ridicată.

Metatranscriptomica Shotgun realizată pe microbiomul din gheață veche de 900 de ani din Peștera de gheață Scărișoara, ce a fost supus unui tratament ciclic de șoc termic (4-25°C) de trei zile și o incubare suplimentară la 4°C timp de 11 zile a constituit prima caracterizare a comunității microbiene active din acest tip de habitat. Atât datele de ARNr cât și ARNm au relevat o variație majoră a structurii microbiene imediat după aplicarea șocului termic, cele mai afectate fiind comunitățile fungice și microeucariotele. Analiza metatranscriptomicii shotgun, atât pe datele de ARNr, cât și pe cele de ARNm, a evidențiat o variație majoră a structurii microbiene imediat după tratamentul de șoc termic, indicând prezența taxonilor microbieni cu o rezistență diferită la creșterea temperaturii și un proces de adaptare diferit, așa cum s-a dovedit prin transcrierea diferitelor gene.

- Comunitatea microbiană potențial activă a fost dominată de taxoni bacterieni cu un metabolism de tip copiotrof, precum Proteobacteria și Bacteroidetes, ce au capacitatea să crească și să utilizeze rapid sursa de carbon existentă și, prin urmare, să depășească taxonii oligotrofi.
- Dintre taxonii bacterieni, Firmicutes, Actinobacteria și Chlorobi au prezentat o scădere a abundenței relative cuprinsă între 5-5,5 și 19 ori, cu cel mai mare răspuns după un tratament de 3 zile de șoc termic observat la Proteobacteria și Bacteroidetes cu 1,5- respectiv 2,5 ori.
- Comunitatea de eucariote a fost cea mai afectată de creșterea temperaturii, cu o reducere de 8 ori în timpul ciclurilor de șoc termic și 10,5 ori de recuperare după 14 zile.
- Archaea a fost foarte slab prezentă în toate probele (<0,2%), reprezentată de filumul Euryarchaeota care arată o reducere de 9 ori a abundenței lor relative după ciclurile de șoc termic.

- Microeucariotele au evidențiat o abundență ridicată în heterotrofi flagelați, cum ar fi Stramenopile după incubare prelungită, ceea ce sugerează capacitatea lor de a se recupera după un șoc termic. O ipoteză pentru această recuperare relativă a abundenței se bazează pe natura prădătoare a protozoarelor asupra bacteriilor, subliniind rolul lor în controlul mediului natural.
- Abundența crescută de până la 2 ori a transcripților pentru protecția celulară împotriva stresului de temperatură, cu prezența genelor care codifică moleculele cu activitate de chaperone în plierea corectă a proteinei și enzime cu capacitatea de a reduce efectul negativ al speciilor de oxigen reactiv (ROS).
- Abundență mai mare până la de 4 ori a factorului alternativ sigma pentru polimerază, indicând un răspuns direct la stres termic.
- Expresii crescute de până la 2,8 ori ale genelor implicate în ciclul Acidului Tricarboxilic (TCA) care demonstrează prezența ridicată a microorganismelor cu metabolismul copiotrof.
- Reglarea pozitivă a genelor implicate în motilitatea celulară de până la 2 ori, luând în considerare mediul acvatic.
- Expresii mai mari de până la 1,3 ori a genelor implicate în reglarea carbonului și azotului ce favorizează procesele de eliberare a substraturilor.
- Incubarea timp de 11 zile după tratamentul de șoc termic a arătat o creștere de 2,5 ori a expresiei genelor care codifică pentru mecanismele de apărare împotriva metaboliților secundari, ceea ce sugerează începutul competiției pentru a depăși taxonii ce folosesc surse similare ca substrat.

Eforturile viitoare ar trebui să fie îndreptate înspre caracterizarea funcțională a ATCasei active la temperaturi scăzute și determinarea prin cristalografie cu raze X a acestei enzime din aceste bacterii psihrofile, în vederea aprofundării înțelegerii relației structură-funcție din această clasă de enzime adaptate pentru catalizarea la temperaturi scăzute a sintezei metaboliților cheie. Analiza genelor specifice și a variației de expresie a căilor metabolice ca răspuns la șocul termic, bazată pe datele metatranscriptomice din gheța de peșteră obținută din diferite medii reci va contribui la înțelegerea impactului asupra microbiomurilor active cauzat de topirea ghețurilor și a modificărilor biosferei.

Bibliografie

1. Abyzov SS, Poglazova MN, Mitskevich JN, Ivanov MV (2005) Common features of microorganisms in ancient layers of the Antarctic ice sheet. In: Castello JD and Rogers SO editors. *Life in Ancient Ice*. Princeton University Press. Princeton, NJ, USA: pp. 240–250
2. Abyzov SSG (1993) Microorganisms in the Antarctic ice, in *Antarctic Microbiology* (ed. E. I. Friedman), pp.265-295. New York: John Wiley & Sons, Inc
3. Anesio AM and Bellas CM (2011) Are low temperature habitats hot spots of microbial evolution driven by viruses? *Trends Microbiol.* 19, 52–57
4. Bakermans C, Tsapin AI, Souza-Egipsy V, Gilichinsky DA and Nealson KH (2003) Reproduction and metabolism at -10°C of bacteria isolated from Siberian permafrost. *Environ Microbiol* 5(4):321–326
5. Berg JM, Tymoczko JL and Stryer L *Biochemistry* (2002) Aspartate Transcarbamoylase Is Allosterically Inhibited by the End Product of Its Pathway 5th edition. New York: W H Freeman; Section 10.1. Doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22460/>
6. Bowman JS, Rasmussen S, Blom N, Deming JW, Rysgaard S and Sicheritz-Ponten T (2011) Microbial community structure of Arctic multiyear sea ice and surface seawater by 454 sequencing of the 16S RNA gene. *The ISME Journal*, 6(1), 11–20. Doi:10.1038/ismej.2011.76
7. Brad T, Itcus C, Pascu MD, Perşoiu A, Hillebrand-Voiculescu A, Iancu L, Purcarea C (2018) Fungi in perennial ice from Scărişoara Ice Cave (Romania) *Scientific RePoRTs* 8:10096 Doi:10.1038/s41598-018-28401-1
8. Brinkmeyer R, Knittel K, Jürgens J, Weyland H, Amann R, Helmke E (2003) Diversity and Structure of Bacterial Communities in Arctic versus Antarctic Pack Ice. *Applied and Environmental Microbiology* 69(11):6610-6619 Doi:10.1128/AEM.69.11.6610-6619.2003
9. Buzzini P, Branda E, Goretti M and Turchetti B (2012) Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Ecol* 1–25, Doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01348.x
10. Cavicchioli R, Ripple WJ, Timmis KN, Azam M, Bakken LR, Baylis M, Behrenfeld MJ, Boetius A, Boyd PW, Classen AT, Crowther TW, Danovaro R, Foreman CM, Huisman J, Hutchins DA, Jansson JK, Karl DM, Koskella B, Welch DBM, Martiny JBH, Moran MA, Orphan VJ, Reay DS, Remais JV, Rich VI, Singh BK, Stein LY, Stewart FJ, Sullivan MB, van Oppen MJH, Weaver SC, Webb EA and Webster NS (2019) Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature reviews | Microbiology*. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>
11. Cavicchioli R (2006) Cold-adapted archaea. *Nat Rev Microbiol.* 2006 May;4(5):331-43. Doi:10.1038/nrmicro1390
12. Christner BC (2002) Incorporation of DNA and protein precursors into macromolecules by bacteria at -15°C . *Appl Environ Microbiol* 68:6435–6438

13. Cowan DA and Tow LA (2004) Endangered antarctic environments. *Annu Rev Microbiol.* 58:649-90, Doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090811
14. Deegenars ML and Watson K (1998) Heat shock response in psychrophilic and psychrotrophic yeast from Antarctica. *Extremophiles*, 2(1):41-9
15. Edwards A, Mur LA, Girdwood SE, Anesio AM, Stibal M, Rassner SM, Hell K, Pachebat JA, Post B, Bussell JS, Cameron SJ, Griffith GW, Hodson AJ and Sattler B (2014) Coupled cryoconite ecosystem structure-function relationships are revealed by comparing bacterial communities in alpine and Arctic glaciers. *FEMS Microbiol. Ecol.* 89, 222–237. Doi: 10.1111/1574-6941.12283
16. Feller G (2013) Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology. *Scientifica*, 2013, 1–28. Doi:10.1155/2013/512840
17. Frey SD, Drijber R, Smith H and Melillo J (2008) Microbial biomass, functional capacity, and community structure after 12 years of soil warming. *Soil Biology & Biochemistry* 40:2904–2907. Doi: 10.1016/j.soilbio.2008.07.020
18. Ghosh S, Paine E, Wall R, Kam G, Lauriente T, Sa-ngarmangkang PC, Horne D and Cheeptham N (2017) In Situ Cultured Bacterial Diversity from Iron Curtain Cave, Chilliwack, British Columbia, Canada. *Diversity* 9: 36 Doi:10.3390/d9030036
19. Hamilton TL, Peters JW, Skidmore ML and Boyd ES (2013) Molecular evidence for an active endogenous microbiome beneath glacial ice. *ISME J.* 7, 1402–1412. Doi: 10.1038/ismej.2013.31
20. Han D, Kang I, Ha HK, Kim HC, Kim OS, Lee BY, Cho JC, Hur HG and Lee YK (2014) Bacterial Communities of Surface Mixed Layer in the Pacific Sector of the Western Arctic Ocean during Sea-Ice Melting. *PLoS ONE*, 9(1), e86887. Doi:10.1371/journal.pone.0086887
21. Helmstaedt K, Krappmann S and Braus GH (2001) Allosteric Regulation of Catalytic Activity: *Escherichia coli* Aspartate Transcarbamoylase versus Yeast Chorismate Mutase. *Microbiology and molecular biology reviews*, p. 404–421 Vol. 65, No. 3 1092-2172/01/04.000 Doi: 10.1128/MMBR.65.3.404–421.2001
22. Hillebrand-Voiculescu A, Iteus C, Ardelean I, Pascu D, Persoiu A, Rusu A, Brad T, Popa E, Onac BP and Purcarea C (2014). Searching for cold-adapted microorganisms in the underground glacier of Scarisoara ice cave, Romania. *Acta Carsol.* 43, 319–329. Doi: 10.3986/ac.v43i2- 3.604
23. Hillebrand-Voiculescu A, Rusu A, Iteus C, Persoiu A, Brad T, Pascu MD, Ardelean I, Onac BP and Purcarea C (2013) Bacterial 16S-rRNA gene clone library from recent ice stalagmites of Scarisoara cave. *Rom. J. Biochem.* 50, 109–118
24. Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ, Butterfield CN, Hermsdorf AW, Amano Y, Ise K, Suzuki Y, Dudek N, Relman DA, Finstad KM, Amundson R, Thomas BC and Banfield JF (2016). A new view of the tree of life. *Nat. Microbiol.* 1:16048. Doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.48

25. Itcuş C, Pascu MD, Lavin P, Persoiu A, Iancu L and Purcarea C (2018) Bacterial and archaeal community structures in perennial cave ice. *Sci. Rep.*, 8, 15671 Doi: 10.1038/s41598-018-34106-2
26. Itcuş C, Pascu MD, Brad T, Persoiu A and Purcarea C (2016) Diversity of cultured bacteria from the perennial ice block of cultured bacteria from the perennial ice block of Scărișoara Ice Cave, Romania. *International Journal of Speleology*, 45 (1): 89-100 Doi.org/10.5038/1827-806X.45.1.1948
27. Junge K, Eicken H, Deming JW (2004) Bacterial activity at -2 to -20°C in Arctic Wintertime sea ice. *Appl Environ Microbiol* 70:550–557
28. Kern Z and Persoiu A (2013) Cave ice e the imminent loss of untapped mid-latitude cryospheric palaeoenvironmental archives. *Quaternary Science Reviews* Doi:10.1016/j.quascirev.2013.01.008
29. Kochkina G, Ivanushkina N, Ozerskaya S, Chigineva N, Vasilenko O, Firsov S, Spirina E and Gilichinsky D (2012) Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. *FEMS Microbiol Ecol* 82(2): 501–509 Doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01442.x
30. Lipscomb WN and Kantrowitz ER (2011) Structure and mechanisms of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Acc Chem Res* 45: 444-453
31. Ma LJ, Rogers SO, Catranis CM (2000) Detection and characterization of ancient fungi entrapped in glacial ice. *Mycologia*, 92(2), pp. 286-295 Doi: 10.2307/3761562
32. Ma LJ, Catranis C, Starmer WT, Rogers SO (1999) Revival and characterization of fungi from ancient polar ice. *Mycologist*. 13:70–73. Doi: 10.1016/S0269-915X(99)80012-3
33. Maccario L, Sanguino L, Vogel TM and Larose C (2019) Snow and ice ecosystems: not so extreme. *Research in Microbiology*, 166(10), 782–795. Doi:10.1016/j.resmic.2015.09.002
34. Mackelprang R, Waldrop MP, DeAngelis KM, David MM, Chavarria KL, Blazewicz SJ, Rubin EM and Jansson JK (2011) Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. *Nature*, 480(7377), 368–371. Doi:10.1038/nature10576
35. Macol CP, Tsuruta H, Stec B and Kantrowitz ER (2001) Direct structural evidence for a concerted allosteric transition in *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Nature Structural Biology* volume 8, pages 423–426. Doi: <https://doi.org/10.1038/87582>
36. Morgan-Kiss RM, Priscu JC, Pockock T, Gudynaite-Savitch L and Huner NPA (2006) “Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 70, no. 1, pp. 222–252
37. Margesin R and Miteva V (2010) Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*. Volume 162, Issue 3, Pages 346-361, ISSN 0923-2508, Doi: doi.org/10.1016/j.resmic.2010.12.004
38. Miteva V (2008) Bacteria in snow and glacier ice. *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, Springer-Verlag. pp. 31-50, R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, C. G (Eds.) Doi: 10.1007/978-3-540-74335-4_3

39. Mondini A, Donhauser J, Itçuş C, Marin C, Persoiu A, Lavin P, Frey B and Purcarea C (2019) High-throughput sequencing of fungal communities across the perennial ice block of Scărișoara Ice Cave. *Annals of Glaciology* 59(77) 2018. Doi: 10.1017/aog.2019.6
40. Morita RY (1975) “Psychrophilic bacteria,” *Bacteriological reviews*, vol. 39, no. 2, pp. 144–167
41. Nichols DS (2005) The growth of prokaryotes in Antarctic sea ice: Implications for ancient ice communities. In: Castello JD and Rogers SO editors. *Life in Ancient Ice*. Princeton University Press; Princeton, NJ, USA: 2005. pp. 50–68
42. Paun VI, Icaza G, Lavin P, Marin C, Tudorache A, Persoiu A, Dorador C and Purcarea C (2019) Total and Potentially Active Bacterial Communities Entrapped in a Late Glacial Through Holocene Ice Core From Scarisoara Ice Cave, Romania. *Front. Microbiol.* 10:1193. Doi: 10.3389/fmicb.2019.01193
43. Persoiu A, Onac BP, Wynn JG, Blaauw M, Ionita M and Hansson M (2017) Holocene winter climate variability in Central and Eastern Europe. *Sci. Rep.* 7:1196. Doi: 10.1038/s41598-017-01397-w
44. Purcarea C (2018) “Microbial life in ice caves,” in *Ice Caves*, eds A. Perçoiu and S. E. Lauritzen (Atlanta, GA: Elsevier Inc), 173–187. Doi: 10.1016/b978- 0- 12- 811739- 2.00008- 5
45. Racoviță G and Onac BP (2000) *Scărișoara Glacier Cave. Monographic study*. Ed. Carpatica, Cluj-Napoca, Romania. 140 p ISBN 973-98752-1-1
46. Richter K, Haslbeck M and Buchner J (2010) The heat shock response: Life on the verge of death. *Molecular Cell* 22;40(2):253-66, Elsevier. Doi:10.1016/j.molcel.2010.10.006
47. Rogers SO, Shtarkman YM, Koçer ZA, Edgar R, Veerapaneni R and D’Elia T (2013) Ecology of Subglacial Lake Vostok (Antarctica), Based on Metagenomic/Metatranscriptomic Analyses of Accretion Ice. *Biology*, 2, 629-650 Doi:10.3390/biology2020629
48. Schostag M, Priemé A, Jacquiod S, Russel J, Ekelund F and Jacobsen CS (2019) Bacterial and protozoan dynamics upon thawing and freezing of an active layer permafrost soil. *The ISME Journal*. Doi:10.1038/s41396-019-0351-x
49. Van de Vossenberg JL, Driessen AJ and Konings WN (1998) The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* 2, 163-170
50. Weller G, Symon C, Arris L and Hill B (2005) *Summary and Synthesis of the ACIA*