



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie București

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**DIVERSITATEA, ROLUL ECOLOGIC ȘI POTENȚIALUL
APLICATIV AL MICROORGANISMELOR DIN HABITATE
GLACIARE**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
CSI Dr. Cristina Ligia PURCĂREA

DOCTORAND:
Victoria Ioana PĂUN

2022

CUPRINS

| | |
|--|-----------|
| LISTA ABREVIERILOR | 5 |
| LISTA FIGURILOR | 8 |
| LISTA TABELELOR | 10 |
| 1. INTRODUCERE | 12 |
| 2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII | 16 |
| 2.1 Biologia microorganismelor din habitate extreme | 16 |
| 2.1.1 Microorganismele extremofile | 16 |
| 2.1.2 Microorganismele mediilor reci | 21 |
| 2.1.3 Peștera Ghețarul Scărișoara | 26 |
| 2.2 Caracteristici funcționale ale microorganismelor active la temperaturi scăzute | 29 |
| 2.2.1 Rezistența la antibiotice a bacteriilor din medii reci | 29 |
| 2.2.2 Activitatea antimicrobiană a bacteriilor din habitate reci | 30 |
| 2.2.3 Enzime active la temperaturi scăzute cu potențial aplicativ | 32 |
| 2.3 Descrierea genului bacterian <i>Psychrobacter</i> | 35 |
| CONTRIBUȚII PERSONALE | 39 |
| 3. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI | 39 |
| 4. MATERIALE ȘI METODE | 41 |
| 4.1 Prelevarea probelor de gheață | 41 |
| 4.2 Procesarea probelor de gheață | 42 |
| 4.3 Tehnici independente de cultivare | 43 |
| 4.3.1 Citometrie în flux | 43 |
| 4.3.2 Extracție ADN/ARN total | 44 |
| 4.3.3 Secvențierea Illumina a genelor 16S ARN ribozomal | 44 |
| 4.3.4 Analiza secvențelor | 45 |
| 4.4 Tehnici dependente de cultivare | 47 |
| 4.4.1 Medii de cultivare | 47 |
| 4.4.2 Izolarea tulpinilor bacteriene | 48 |
| 4.4.3 Identificarea tulpinilor bacteriene | 49 |
| 4.4.4 Test de sensibilitate la antibiotice | 51 |
| 4.4.5 Potențialul de activitate antimicrobiană | 52 |
| 4.4.6 Caracterizare biochimică | 53 |
| 5. REZULTATE: BACTERII NECULTIVATE ȘI POTENȚIAL ACTIVE DIN GHEAȚĂ DE PEȘTERĂ VECHE DE 13000 ANI | 56 |
| 5.1 Colecția de gheață și analiza probelor de cronosecveță | 56 |
| 5.2 Geochimia probelor din carota de gheață a Peșterii de Gheață Scărișoara | 57 |
| 5.3 Densitatea celulelor microbiene din cronosecvența de gheață Scărișoara | 61 |
| 5.4 Rata metabolică a bacteriilor potențial active | 65 |
| 5.5 Diversitatea probelor de gheață din Scărișoara | 66 |
| 5.5.1 Indicii statistici ai secvențierii Illumina | 66 |
| 5.5.2 Curba de rarefacție | 68 |
| 5.5.3 Alpha și beta diversitatea | 69 |
| 5.6 Structura comunității procariote din carota de gheață Scărișoara | 70 |
| 5.6.1 Comunitatea bacteriană totală | 70 |
| 5.6.2 Comunitatea bacteriană potențial activă | 79 |
| 5.6.3 Comunitatea de Archaea a cronosecvenței de gheață din Scărișoara | 89 |
| 5.6.4 Dependența de mediul înconjurător | 91 |
| 5.7 Concluzii și discuții | 96 |
| 6. REZULTATE: BACTERII CULTIVATE DIN GHEAȚĂ VECHE DE 13000 ANI DIN PEȘTERA SCĂRIȘOARA | 98 |
| 6.1 Izolarea și identificarea bacteriilor | 98 |
| 6.1.1 Izolarea tulpinilor bacteriene din carota de gheață Scărișoara | 98 |

| | |
|--|------------|
| 6.1.2 Izolarea ADN, amplificarea genelor 16S ARNr și corespondența taxonomică | 99 |
| 6.1.3 Distribuția taxonomică a izolatelor bacteriene de-alungul carotei de gheață de peșteră veche de 13000 ani | 102 |
| 6.1.4 Temperatura de creștere și morfologia tulpinilor bacteriene din Scărișoara | 104 |
| 6.2 Caracterizarea funcțională a tulpinilor bacteriene izolate din gheața din Scărișoara | 111 |
| 6.2.1 Rezistența la antibiotice | 111 |
| 6.2.2 Impactul climatic asupra rezervorului de rezistență la antibiotice a bacteriilor din gheața de peșteră | 116 |
| 6.2.3 Activitatea antimicrobiană | 117 |
| 6.2.4 Caracteristici biochimice | 119 |
| 6.3 Concluzii și discuții | 123 |
| 7. REZULTATE: IZOLAREA, CARACTERIZAREA FUNCȚIONALĂ ȘI SECVENȚIALIZAREA GENOMULUI TULPINII BACTERIENE <i>Psychrobacter sp. SC65A.3</i> | 129 |
| 7.1 Izolarea și identificarea tulpinii <i>Psychrobacter sp. SC65A.3</i> | 129 |
| 7.2 Caracterizarea funcțională a <i>Psychrobacter sp. Strain SC65A.3</i> | 130 |
| 7.2.1 Profilul de rezistență antimicrobiană | 130 |
| 7.2.2 Activitatea antimicrobiană | 131 |
| 7.2.3 Caracterizarea biochimică | 133 |
| 7.3 Secvențializarea și analiza genomului complet | 136 |
| 7.4 Concluzii și discuții | 144 |
| 8. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE | 147 |
| ANEXĂ TABELE SUPLIMENTARE | 151 |
| DISEMINAREA REZULTATELOR | 161 |
| REFERINȚE BIBLIOGRAFICE | 167 |

1. INTRODUCERE

În contextul actual al schimbărilor climatice rapide, suplimentarea cunoștințelor legate de diversitatea, activitatea metabolică și rolul ecologic al microorganismelor din habitate reci este foarte importantă, în special ținând cont că majoritatea biosferei este caracterizată de temperaturi scăzute, 20% din suprafața terestră fiind acoperită de gheață (*Margesin & Miteva, 2011; Yadav et al., 2017*). Mai mult, datorită stabilității și activității la temperaturi scăzute a compușilor moleculari din microorganismele adaptate la aceste temperaturi, acești compuși au un important potențial aplicativ în diversele bionanotehnologii și industrii.

Pentru a înțelege rolul în ciclul biogeochimic al comunităților microbiene ce aparțin habitatelor reci, și pentru descoperirea de noi bacterii cu caracteristici funcționale specifice ce pot fi utilizate ca noi surse îmbunătățite în biotehnologii și medicină, investigarea diversității, mecanismelor de adaptare la rece, impactul climatic și caracteristicile funcționale cu caracter aplicativ al acestor tipuri de comunități microbiene constituie o prioritate a colaborărilor din cercetare.

Până în prezent, studiile asupra microbiomului din peșterile de gheață au fost limitate. Majoritatea datelor obținute s-au axat pe fungi și bacterii necultivabile din gheața acumulată în ultimii 1500 ani (*Hillebrand-Voiculescu et al., 2013; Tebo et al., 2015; Itcus et al., 2018; Brad et al., 2018a*), foarte puține informații oferite despre microorganismele de peșteră cultivabile (*Popa et al., 2012; Hillebrand-Voiculescu et al., 2014; Itcus et al., 2016*). Este astfel importantă realizarea de studii detaliate despre microbiomurile active de peșteră, pentru deslușirea biodiversității și a caracteristicilor funcționale ca răspuns la variațiile climatice și geochimice, cât și pentru obținerea de noi tulpini și biomolecule microbiene cu potențial aplicativ în diversele industrii și în medicină.

Conform Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), rezistența la antibiotice, considerată una dintre primele 10 amenințări globale (*Meng et al., 2022*), este fenomen natural antic, ce datează dinaintea presiunii moderne de selecție produsă de utilizarea necontrolată a antibioticelor în mediul clinic și industrial (*Allen et al., 2010*). Mecanismele de rezistență la antibiotice au fost intens studiate (*Kohanski et al., 2010; Thi et al., 2011*), majoritatea studiilor de rezistență la antibiotice a microorganismelor adaptate la temperaturi scăzute fiind axate în principiu pe habitate reci cunoscute: Antarctica, Arctic, ghețari de la altitudini înalte, peșteri, permafrost (*Byl et al., 2013; Tam et al., 2015; Ambrozic Avgustin et al., 2019; Belov et al., 2020; Mogrovejo et al., 2020; Ali et al., 2021*), dar până în prezent nu

există informații legate de rezistența microorganismelor izolate din peșteri de gheață. Așadar, este cunoscut acum, faptul că microorganismele non-patogene din mediu au potențialul de a fii rezervor de gene de rezistență, transferabile la bacterii patogene.

Tulpinile bacteriene din medii naturale ce se prezintă cu rezistență crescută la compuși antimicrobieni uzuali, constituie o bună sursă de biomolecule cu activitate antimicrobiană împotriva altor bacterii din mediu sau patogene (*Zada et al., 2021; Kochhar et al., 2022*). Microorganismele adaptate la temperaturi scăzute capabile să producă compuși antimicrobieni au fost predominant izolate din solul din regiunile reci (*Belov et al., 2020; Kralova et al., 2021*). În același timp, activitatea antimicrobiană a microorganismelor din probe polare acvatice a fost slab studiată (*Lo Giudice & Fani, 2016*). Mai mult, microorganismele extremofile cu proprietăți metabolice unice și versatile au potențial de aplicație biotehnologică în multe zone industriale, motiv pentru care bacteriile din habitate extreme – temperatură scăzută (capabile să dezvolte biomolecule pentru supraviețuirea în condiții dure) sunt considerate drept sursă de noi bioproduși, inclusiv de noi agenți antimicrobieni (*Siddiqui, 2015; Dasila et al., 2022*).

Studiile asupra microorganismelor cultivabile din peșteri de gheață – habitate unice, izolate, fără lumină și oligotrofe (*Purcarea, 2018*) – pentru obținerea bacteriilor cultivabile din gheața perenă de peșteră, și pentru determinarea caracteristicilor lor metabolice și fenotipice, în particular sensibilitatea la antibiotice și compuși antimicrobieni cunoscuți, sunt importante în contextul actual al schimbărilor climatice, datorită posibilității de transfer, după topirea ghețarilor, a microorganismelor blocate în diversele depozite de gheață, în solul și apa mediului înconjurător, ceea ce poate avea un impact negativ asupra populației umane.

Ținând cont de toate aceste priorități, studiul ce a stat la baza acestei teze de doctorat, constituie prima caracterizare a diversității, structurii și funcției comunității bacteriene totale și potențial active, și cultivarea de tulpini bacteriene din cronosecvența de gheață de 13000 ani din Peștera Ghețarul Scărișoara, România.

Obiectivele principale urmărite:

(1) deslușirea structurii comunității bacteriene totale și potențial active de-a lungul carotei de 13000 ani din Peștera Ghețarul Scărișoara, fiind cel mai vechi microbiom caracterizat din gheață de peșteră;

(2) izolarea și identificarea tulpinilor bacteriene din cronosecvența de gheață veche de 13000 ani;

(3) caracterizarea profilului de rezistență la antibiotice, potențialului de activitate antimicrobian și profilul biochimic al acestor tulpini bacteriene vechi, iubitoare de temperaturi scăzute;

(4) determinarea și analiza secvenței genomice complete a tulpinii bacteriene psihrofile, cu rezistență multiplă la antibiotice *Psychrobacter sp.* SC65A.3 , izolată din stratul de gheață de 5000 ani.

Acest studiu, bazat pe metode dependente și independente de cultivare și analize biochimice, a constat în: (i) prelevarea unei carote de gheață de 25.33 metrii, corespunzând unei cronosecvențe de 13000 ani, din blocul de gheață perenă al Peșterii Scărișoara, România, (ii) secvențierea prin tehnica Illumina a genei 16S ARN ribozomal, pentru obținerea comunităților procariote totale și potențial active prezervate din ultima parte a perioadei glaciare, și analiza corelată a diversității și compoziției taxonomice cu variațiile climatice și geochimice, (iii) izolarea bacteriană, identificarea genetică și caracterizarea funcțională a izolatelor bacteriene de peșteră, și (iv) secvențierea și analiza genomică.

Teza de față, este împărțită în două părți majore. Prima parte este dedicată stadiului actual al cunoașterii al extremofilelor în particular microorganismelor adaptate la temperaturi scăzute, fiind împărțită în 3 subcapitole: (i) biologia microorganismelor din habitate extreme; (ii) caracteristicile funcționale ale microorganismelor active la temperaturi scăzute; și (iii) descrierea genului *Psychrobacter*. Cea de-a doua parte a lucrării reprezintă contribuțiile personale, începând cu scopul și obiectivele tezei de doctorat, și continuând cu un capitol dedicat metodologiei de lucru. Următoarele 3 capitole reprezintă rezultatele experimentelor originale. Teza de doctorat se încheie cu un capitol de concluzii generale și perspective, anexele cu tabele suplimentare utilizate în această lucrare, lista cu publicațiile relevante din subiectul tezei și bibliografia utilizată.

2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

2.1 Biologia microorganismelor din habitate extreme

2.1.1 Extremofilele

Microorganismele extremofile sunt clasificate în funcție de parametrii primari care influențează mediul: acidofile, alcalifile, endoliți, hipoliți, halofile, metalotolerante, oligotrofe, piezofile, radiorezistente, xerofile, toxicotolerante, termofile, hipertermofile, psihrofile (*Horikoshi & Bull, 2011; Rampelotto, 2013; Zgonik et al., 2021*). Microorganismele extremofile se găsesc în general în habitate asociate condițiilor extreme (Polul Nord și Sud, tropice, deșerturi, oceane, vulcani, lacuri sărate etc.), dar și în habitate ”mai puțin” extreme, precum peșteri, peșteri de gheață, ghețari, izvoare termo-minerale naturale (*Zgonik et al., 2021*).

2.1.2 Microorganismele mediilor reci

Psihrofilele sunt definite drept organisme cu o temperatură optimă de creștere de $\leq 15^{\circ}\text{C}$, o temperatură maximă de creștere de aproximativ 20°C și o temperatură minimă de $\leq 0^{\circ}\text{C}$ (*Morita, 1975*), iar termenul de ”psihrofil” este folosit pentru a descrie orice microorganism activ în habitate reci (*Mikucki et al., 2011*). Psihrofilele au distribuție largă, pornind de la habitatele înghețate (permafrost, ghețari, lacuri înghețate perene, banchize, adâncul oceanelor și calote glaciare polare) (*Priscu & Christner, 2004; Margesin & Miteva, 2011; Anesio & Laybourn-Parry, 2012; Yadav et al., 2017*) și până la suprafața și interiorul intestinelor peștilor marini, izvoare, lacuri, râuri și solul din zonele temperate (*Zarnea & Popescu, 2011*).

2.1.3 Peștera Ghețarul Scărișoara

Peștera Ghețarul Scărișoara este localizat în Munții Bihor, Carpații de Est, în partea de Nord-Vest a României, la o altitudine de 1165 m deasupra nivelului mării. Peșteră calcaroasă, cu o lungime de 700 m și 105 m adâncime conține unul dintre cei mai mari ($100,000\text{ m}^3$) și mai vechi ghețari de peșteră din lume, și unul dintre cel mai vechi ghețari localizați într-o zonă cu climă temperată (*Holmlund et al., 2005; Persoiu & Pazdur, 2011; Persoiu et al., 2017*). Peștera Ghețarul Scărișoara poate fi accesată printr-un aven de 60 x 48 metrii, la baza căruia se află intrarea (17 x 24 metrii) în Sala Mare de 3000 m^2 a peșterii, unde se află localizat depozitul subteran de gheață, ce alcătuiește ”podeaua” Peșterii Scărișoara, fiind inconjurat de 3 pasaje parțial neînghețate (*Racovita & Onac, 2000; Brad et al., 2018*).

Peștera Scărișoara este una dintre cele mai explorate peșteri de gheață din lume (Persoiu et al., 2017), fiind studiată de-a lungul ultimului secol pentru deslușirea proceselor climatice și glaciologice asociate (Racovita & Onac, 2000; Persoiu et al., 2011), și pentru reconstrucția schimbărilor climatice și de mediu din regiune (Onac et al., 2007; Feurdean et al., 2011; Persoiu & Pazdur, 2011; Persoiu et al., 2017).

2.2 Caracteristici funcționale ale microorganismelor active la temperaturi scăzute

2.2.1 Rezistența la antibiotice a bacteriilor din medii reci

Rezistența la antibiotice preocupă toate aspectele legate de medicină și sănătate (umane și veterinară), securitatea alimentară și dezvoltarea socială, ceea ce face descoperirea de noi antibiotice să fie crucială pentru controlul bolilor infecțioase și pentru evitarea de pierderi masive economice (Lewis, 2020; Meng et al., 2022). Prospectarea microbiomului habitatelor extreme poate reprezenta o abordare promițătoare atât în vederea descoperirii de compuși antimicrobieni noi (Nunez-Montero & Barrientos, 2018), cât și pentru înțelegerea evoluției rezistenței la antibiotice.

2.2.2 Activitatea antimicrobiană a bacteriilor din habitate reci

Potențialul antimicrobian al bacteriilor adaptate la temperaturi scăzute a fost investigat anterior, în principal datorită capacității acestora de a produce biomolecule cu proprietăți particulare, inclusiv compuși antimicrobieni cu structură și activitate biologică specifică (Hemala et al., 2014). Studiile de screening al activității antimicrobiene s-au axat pe bacterii din solurile polare și antarctice (Nedialkova & Naidenova, 2005; Shekh et al., 2011; Lee et al., 2012a; Pan et al., 2013), lacuri polare (Lo Giudice & Fani, 2016), și habitate marine antarctice și arctice (Lo Giudice et al., 2007a; Yuan et al., 2014). Se crede că, datorită caracteristicilor unice ale peșterilor (întuneric, umiditate crescută, temperaturi scăzute constante, oligotrofism), acestea ar putea fi surse potențiale de microorganisme capabile să producă compuși cu activitate antimicrobiană și anticancerigenă (Zada et al., 2021), dar nu chiar dacă nu au fost studiate în amănunt drept potențială resursă de compuși antimicrobieni noi cu aplicație farmaceutică.

2.2.3 Enzime active la temperaturi scăzute cu potențial aplicativ

În ultimele decenii, multe procese biotehnologice industriale au început să utilizeze biocatalizatori de proveniență microbială, datorită disponibilității și ratei mari de creștere (Keshwani et al., 2015; Khan & Selamoglu, 2020). Biomoleculele de origine mezofilă sunt cele mai uzuale, dar au stabilitatea și eficiența catalitică limitate ca răspuns la diferitele

condiții din procesele catalitice industriale. Din acest motiv, recent, interesul s-a centrat pe microorganismele extremofile, capabile să depășească condițiile de stres din mediile extreme, datorită caracteristicilor unice ale enzimelor produse (Lavin et al., 2016a; Vila et al., 2019). Ținând cont de faptul că temperaturile scăzute reduc reacțiile chimice adiacente nedorite care au loc în timpul proceselor industriale (Siddiqui, 2015), utilizarea enzimelor active la temperaturi scăzute (microorganisme psihrofile) a fost recent extinsă în diverse industrii: industria alimentară și furajeră, farmaceutică, medicală, industria biocombustibililor, producția de energie și altele (Cavicchioli et al., 2011).

2.3 Descrierea genului bacterian *Psychrobacter*

Genul bacterian *Psychrobacter* (familia Moraxellaceae, clasa Gammaproteobacteria) a fost pentru prima dată raportat în 1986, când a fost descrisă specia *Psychrobacter immobilis* (Juni & Heym, 1986). Speciile de *Psychrobacter* sunt caracterizate de colonii crem/albicioase, uniforme, circulare și convexe, cu margini întregi și consistență untoasă, în timp ce unele tulpini se pigmentează roz pal, spre portocaliu (Bowman et al., 1997; Bowman, 2006). În general, celulele sunt Gram-negative, dar au abilitatea de a reține colorantul cristal-violet – se colorează Gram-pozitiv – motiv pentru care genul *Psychrobacter* este considerat Gram-variabil. Stric aerob, crește pe majoritatea mediilor comune și complexe, majoritar psihrotrofe (prosperă la temperaturi scăzute), tolerează un interval larg de concentrații de săruri (Juni, 2005; Bowman, 2006; Welter et al., 2021).

Genul *Psychrobacter* are distribuție extinsă, diferitele specii fiind izolate dintr-o varietate de habitate, majoritatea reci și saline (Rodrigues et al., 2009; Lasa & Romalde, 2017). Până în prezent, doar câteva studii referitoare la rezistența la antibiotice a speciilor de *Psychrobacter* au fost efectuate (Romanenko et al., 2002; Bowman, 2006; Petrova et al., 2009; Dziejewit et al., 2013; Abd-Elnaby et al., 2016). Majoritatea tulpinilor descrise de *Psychrobacter* au drept caracteristică preferința pentru temperaturi scăzute, ceea ce explică interesul industrial și biotehnologic axat pe existența de noi enzime și proteine active la temperaturi scăzute, cu aplicabilitate vastă, din acest gen (Rothschild & Mancinelli, 2001; Bowman, 2006).

CONTRIBUȚII PERSONALE

3. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

În ciuda datelor noi descoperite despre microbiomul diferitelor habitate reci, informațiile legate de comunitatea microbiană totală și potențial activă a peșterilor de gheață perenă sunt limitate (*Purcarea, 2018*). Studiile care alcătuiesc această teză reprezintă o caracterizare structurală și funcțională de pionierat a comunității bacteriene prinse într-o carotă de gheață cu o vechime de 13000 ani din Peștera Ghețarul Scărișoara – habitat de gheață perenă, unic, izolat, lipsit de lumină și cu conținut limitat de nutrienți. Obținerea de informații legate de: caracteristicile structurale și funcționale ale microorganismelor din aceste habitate înghețate, mecanismele de adaptare la condițiile extreme și de variație a temperaturilor, contribuția acestora la biogeochimia ecosistemului, și de potențialul lor aplicativ, este importantă pentru cercetările atât fundamentale cât și aplicative.

Scopul studiului: investigarea comunității bacteriene din cronosecvența de gheață de 13000 ani a Peșterii Scărișoara, utilizând metode microbiene și biochimice dependente și independente de cultură, cu scopul de a scoate în evidență **caracteristicile structurale și funcționale ale comunităților totale și potențial active, ale tulpinilor bacteriene izolate, cât și potențialul lor aplicativ.**

Obiectivele studiului:

1. Determinarea diversității și structura comunității, cât și impactul geochimic și climatic asupra bacteriilor totale și potențial active găsite în cronosecvența de gheață de 0-13000 ani din Peștera de gheață Scărișoara.
2. Izolarea de tulpini bacteriene din cronosecvența de gheață de peșteră veche de 13000 ani.
3. Stabilirea profilului de rezistență la antibiotice, activitatea antibiobiană și profilul biochimic al tulpinilor bacteriene izolate din acest tip de habitat izolat, ca răspuns la variațiile climatice.
4. Determinarea și caracterizarea secvenței genomice complete a unei tulpini bacteriene din Scărișoara psihrofile, cu rezistență multiplă la antibiotice (*Psychrobacter sp. SC65A.3*).

4. MATERIALE ȘI METODE

4.1 Prelevarea probelor de gheață

O carotă de gheață de 25.33 metri a fost prelevată din Sala Mare a Peșterii Ghețarul Scărișoara, prin forare verticală în blocul de gheață perenă cu ajutorul unui foreze electrice PICO modificată (Koci & Kuivinen, 1984). Condiții aseptice de colectare au fost asigurate prin utilizarea de alcool etilic de laborator și flambare. Fragmentele de gheață recuperate au fost transferate în pungi de plastic sterile, și transportate către laborator în recipiente speciale, sub condiții permanente de îngheț, unde au fost depozitate până la procesare la -20°C. Vârsta probelor de gheață a fost determinată prin radiodotare AMS cu ¹⁴C (Persoiu et al., 2017) și extrapolare lineară.

4.2 Procesarea probelor de gheață

Probele de gheață (250-mL) au fost dezghețate la 4°C, iar biomasa microbiană a fost colectată prin filtrare pe membrane MF sterile de 0.22-μm (Merck Millipore, Germany) în condiții aseptice, folosind un sistem de filtrare din oțel inoxidabil cu pompă de vacum (Merck Millipore, Germany).

4.3 Tehnici independente de cultivare

4.3.1 Citometrie în flux

Tehnica de citometrie în flux a fost utilizată pentru măsurarea densității celulelor microbiene din probele de gheață, folosind un sistem BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences, USA). Densitatea celulară a comunității microbiene totale: 1 ml suspensie celulară din fiecare probă topită de gheață, incubată în prezența a 1x SYBR Green I (Lonza Group, Switzerland). Comunitatea potențial activă: 100-μL gheață proaspăt topită, incubată în prezența a 1-μg mL⁻¹ iodură de propidiu (PI) (ThermoFisher Scientific, Germany). Densitatea celulelor viabile a fost calculată prin scăderea numărului de celule marcate cu PI (celule moarte) din numărul de celule marcate cu SYBR Green I (celule totale).

4.3.2 Extracție ADN/ARN total

Din probe selectate de gheață a fost extras ADN și ARN total, urmărind protocolul kitului molecular specific de extracție ADN/ARN, modificat cu o etapă adițională de liză.

4.3.3 Secvențierea Illumina a genelor 16S ARN ribozomal

Profilul procariotic al microbiomului Scărișoara a fost determinat prin secvențierea prin tehnica Illumina a genei 16S ARN ribozomal, folosind regiunea variabilă V3-V4, iar secvențierea ampliconilor marcați s-a realizat utilizând platforma Illumina MiSeq PE300 (McGill University, Génome Québec Innovation Centre, Canada).

4.3.4 Analiza secvențelor

Secvențele Illumina obținute au fost analizate utilizând metode bioinformatică, statistice și filogenetice.

4.4 Tehnici dependente de cultivare

4.4.1 Medii de cultivare

Următoarele medii au fost utilizate în toate metodele dependente de cultivare: R2A, R2B, TSA, TSB, MHA, MHB, NA, LB agar și lichid.

4.4.2 Izolarea tulpinilor bacteriene

28 probe de gheață au fost dezghețate, și 2 mL din fiecare probă au fost inoculați în mediu R2B, la 4°C și 15°C timp de 120 zile. Diluții seriale (10^0 - 10^{-10}) din culturi îmbogățite au fost realizate pentru inoculare în placă, iar colonii diferite morfologic au fost izolate și purificate sub aceleași condiții de cultivare.

Intervalul de temperatură de creștere al izolatelor a fost determinat prin cultivare pe mediul R2A la 4°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C și 37°C pentru 30 zile. Intervalul de salinitate de creștere al bacteriilor izolate din peșteră a fost testat pe mediul LB, la 15°C sub agitare, în prezența a diferite concentrații de NaCl și MgCl₂.

4.4.3 Identificarea tulpinilor bacteriene

Identificarea genică a izolatelor bacteriene a fost realizată prin secvențierea genei 16S ARN ribozomal obținută din ADN genomic, la Macrogen, Olanda.

4.4.4 Test de sensibilitate la antibiotice

Prin metoda Kirby-Bauer (disc difuzimetrică) a fost stabilită sensibilitatea la antibiotice a izolatelor de peșteră, utilizând 28 de discuri impregnate cu diferite antibiotice (OXOID, UK). Profilul de sensibilitate la antibiotice a fost determinat prin prezența (S) sau absența (R) unei zone de inhibiție (*Matuschek et al., 2014*).

4.4.5 Potențialul de activitate antimicrobiană

Activitatea antimicrobiană a izolatelor bacteriene a fost evaluată împotriva a două tulpini patogene de referință și 20 de izolate patogene clinice aparținând Colecției microbiene a Institutului de Cercetare al Universității București. Supernatantul lipsit de celule obținut din izolatele de peșteră a fost testat împotriva patogenilor utilizând o metodă similară tehnicii Kirby-Bauer (*Lavin et al., 2016*).

4.4.6 Caracterizare biochimică

Caracterizarea funcțională a izolatelor de peșteră a fost realizată la 15°C, utilizând protocolul specific sistemelor test API 20NE și API ZYM (BioMérieux, France).

5. REZULTATE: BACTERII NECULTIVATE ȘI POTENȚIAL ACTIVE DIN GHEAȚĂ DE PEȘTERĂ VECHE DE 13000 ANI

5.1 Colecția de gheață și analiza probelor de cronosecveță

Probele de ADN genomic și complementar selectate din carota de gheață de 13000 ani, folosite pentru secvențiere, corespund codurilor SC și SCR. Probele selectate au aparținut unui interval de vârstă de aproximativ 300 ani pentru primul mileniu, și 1000 ani pentru restul de probe. Secvențele genelor 16S ARN ribozomal neprelucrate, ale ambelor tipuri de comunități (ADNg și ADNc), au fost încărcate în baza de date Sequence Read Archive (SRA) cu numărul de acces **SRP157726**.

5.2 Geochimia probelor din carota de gheață a Peșterii de Gheață Scărișoara

Analizele fizicochimice și geochimice pentru 15 probe de gheață topită au fost realizate în cadrul Laboratorului de Hidrogeochimie, Institutul de Speleologie "Emil Racoviță", București România, de către Dr. Constantin Marin și Dr. Alin Tudorache.

Cum era de așteptat pentru o peșteră calcaroasă, calciu (Ca) a fost componenta predominantă, în timp ce carbonul dizolvat organic (COD) și anorganic (CAD), sodiu (Na), potasiu (K), magneziu (Mg), siliciu (Si), și anionii sulfat (SO₄) și clor (Cl) au reprezentat constituenții majori ai probelor de gheață de peșteră. În același timp, manganul (Mn), fierul (Fe), borul (B) și fosforul (P) au apărut în concentrații mult mai mici.

Profilul de concentrație al compușilor chimici majori de la nivelul blocului de gheață a sugerat o distribuție temporală neomogenă, cu fluctuații ale concentrației în funcție de vârsta stratului de gheață. Valori ridicate au fost înregistrate în stratele de gheață depuse în ultimul mileniu, cât și între 4500 și 5000 ani. Concentrații mai mari de COD, Si, Ca, P și Na au fost observate și în stratul de gheață de la 7000 ani, cât și în stratele mai vechi (**Figura V.2**).

5.3 Densitatea celulelor microbiene din cronosecvența de gheață Scărișoara

Densitatea microbiană a variat considerabil de-a lungul carotei de gheață, ambele tipuri de comunități prezentând o creștere generală odată cu vârsta depozitelor perene de gheață, un declin între stratele de gheață de 700 și 5000 ani, o creștere bruscă în stratul de 6000 ani, și mult mai pronunțată în stratele mai vechi de 10000 ani (**Figura V.3**).

5.4 Rata metabolică a bacteriilor potențial active

Ratele metabolice ale microbiomului din gheața de peșteră calculate în baza densității celulare a comunității potențial active și a conținutului de carbon organic dizolvat din fiecare strat de gheață (*Price & Sowers, 2004*), au fost variabile la 0°C, temperatura caracteristică

gheții perene Scărișoara (*Persoiu et al., 2011*). Această variație a corespuns unui metabolism de mentenanță în majoritatea stralelor blocului de gheață, cu excepția probelor de la 400, 5000 și 7000 ani, unde s-a evidențiat un metabolism activ.

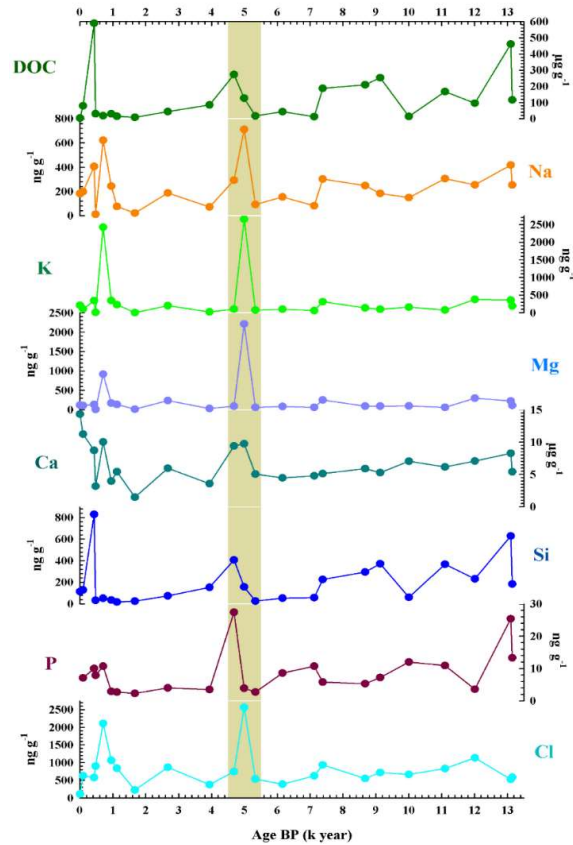


Figura V.2 Profilul de distribuție al compuşilor geochimici de-a lungul carotei de gheață Scărișoara veche de 13000 ani. (*Paun et al., 2019*)

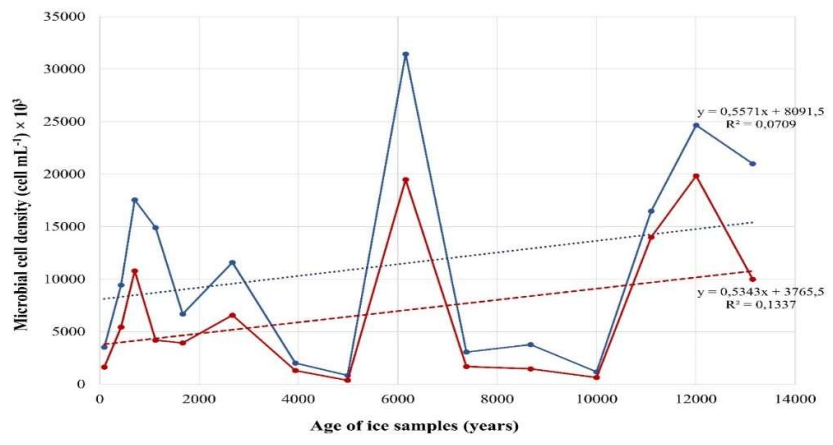


Figura V.3 Profilul variației temporale a densității celulelor microbiene de-a lungul carotei de gheață Scărișoara pentru comunitățile totale (albastru) și viabile (roșu). (*Paun et al., 2019*)

de unitați taxonomice observabile, demonstrând o diversitate neuniformă a bacteriilor potențial active regăsite în carota de gheață din Scărișoara veche de 13000 ani.

Analiza PcoA pentru diferențele unităților taxonomice din cele 15 strate de gheață, a indicat o distincție clară între compoziția bacteriană a comunității totale și cea a comunității potențial active, observabilă prin cele două grupări separate ale unităților taxonomice de ADN genomic și complementar. Nu s-a observat o grupare în funcție de vârsta pentru nici una dintre cele două comunități (**Figura V.6**).

5.6 Structura comunității procariote din carota de gheață Scărișoara

Totalitatea unităților taxonomice a fost de 99.18% din filotipurile bacteriene, în timp ce <0.45% au fost reprezentate de Archaea și 0.819% au fost neatribuite. Au fost identificate 38 filumuri, 103 clase, 137 ordine, 274 familii și 625 genuri pentru comunitatea procariotă totală, și 31 filumuri, 74 clase, 103 ordine, 215 familii și 414 genuri pentru comunitatea bacteriană potențial activă.

5.6.1 Comunitatea bacteriană totală

Distribuția globală a filumurilor bacteriene la nivelul comunității totale, în blocul de gheață de peșteră, a arătat dominanța filumurilor taxonomice Actinobacteria și Proteobacteria (**Figura V.7**).

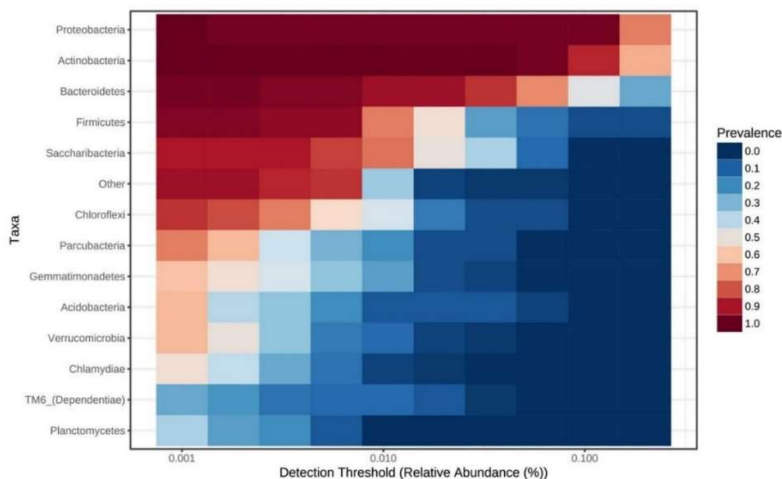


Figura V.7 Compoziția comunității bacteriene totale la nivel taxonomic de filum. Axa Y reprezintă nivelul de prevalență din carotă. (Paun *et al.*, 2019)

De-a lungul cronosecvenței de gheață, filumurile Proteobacteria și Actinobacteria au avut cea mai mare abundență relativă în majoritatea stratelor de gheață, cu excepția probei SC7K unde Firmicutes a fost dominant. La nivel de clasă, Actinobacteria a avut cea mai mare abundență relativă în majoritatea stratelor, în timp de Alpha-, Beta-, Gamma și

Deltaproteobacteria au fost prezente în diferite proporții în blocul de gheață (Paun et al., 2019). Dintre taxonii principali regăsiți în blocul de gheață din Scărișoara, *Cryobacterium* a fost predominant în SC6K, iar *Pedobacter* a avut cea mai mare abundență relativă în stratele vechi de gheață (SC10K, SC13K, SC9K and SC5K). Stratul SC3K a fost abundent în *Aeromicrobium* și *Arthrobacter*, în timp ce taxoni de *Escherichia_Shigella* au avut o prezență ridicată în stratul de 4000 ani.

5.6.2 Comunitatea bacteriană potențial activă

Distribuția globală a filumurilor bacteriene la nivelul comunității potențial active, în blocul de gheață de peșteră, a scos în evidență abundența relativă mare a filumurilor Proteobacteria și Firmicutes (Figura V.13).

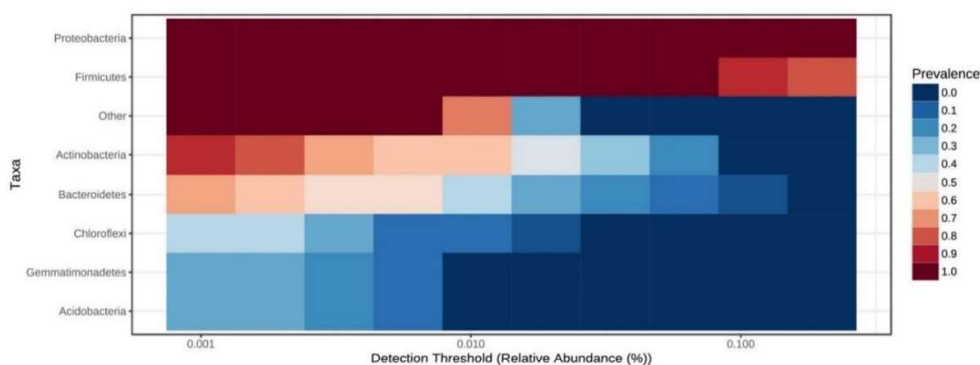


Figura V.13 Compoziția comunității bacteriene potențial active la nivel taxonomic de filum. Axa Y reprezintă nivelul de prevalență din carotă. (Paun et al., 2019)

Profilul de distribuție al bacteriilor potențial active din carota de gheață a scos în evidență distribuția omogenă a filumurilor Proteobacteria și Firmicutes de-a lungul cronosecvenței de gheață, în timp ce filumurile Actinobacteria și Bacteroidetes au fost mult mai slab reprezentate în carotă. În comunitatea bacteriană potențial activă, la nivel taxonomic de clasă, Clostridia (Firmicutes), Beta- și Gammaproteobacteria au avut cea mai crescută abundență relativă din întregul bloc de gheață. Genurile dominante ale comunității potențial active identificate de-a lungul blocului de gheață au avut distribuție uniformă între stratele de gheață, cu genurile *Pseudomonas*, *Clostridium sensu stricto* 9 și 13, *Janthinobacterium* și *Stenotrophomonas* dominând proba de 10000 ani, și fiind prezent și în stratele formate în ultimile 4 milenii.

5.6.3 Comunitatea de Archaea a cronosecvenței de gheață din Scărișoara

Comunitatea de Archaea a reprezentat sub 1% din carota de gheață a Peșterii Scărișoara. În ambele tipuri de comunități au fost observate 2 filumuri, 2 clase, 3 ordine, 4 familii și 4 genuri arheene.

5.6.4 Dependența de mediul înconjurător

Analiza redundanței (RDA) distribuției filumurilor ambelor tipuri de comunități în relație cu parametrii geochimici ai probelor de gheață a fost utilizată pentru a explica variația librăriiilor de ADN genomic și complementar. Axele canonice formate din câțiva parametrii geochimici co-varianți, au scos în evidență corelația neașteptată dintre distribuția filumurilor comunităților procariote totale și potențial active cu chimismul gheții, pentru filumurile Firmicutes, Proteobacteria și Actinobacteria. Modificări la nivelul distribuției filumurilor corelată cu conținutul de CAD/COD observat, a sugerat importanța tipului de carbon (organic/anorganic) în formarea comunității microbiene (Paun et al., 2019) (Figura V.23).

Analiza coordonatelor principale (PCoA) a variabilității unităților operaționale taxonomice din comunitățile procariote de gheață, bazată pe conținutul de carbon organic din fiecare probă, a indicat o grupare restrânsă a taxonilor microbieni totali din stratele de gheață cu conținut ridicat și scăzut de carbon, ceea ce poate însemna că factori de mediu mai complexi sunt implicați în formarea compoziției microbiene din stratele vechi de gheață. În cazul comunității potențial active, o corelație mult mai strânsă a fost observată pentru acești parametrii, sugerând astfel o contribuție importantă a proceselor post-depoziționale în formarea comunității potențial active din probele de gheață SCR4K și SCR7K (Paun et al., 2019).

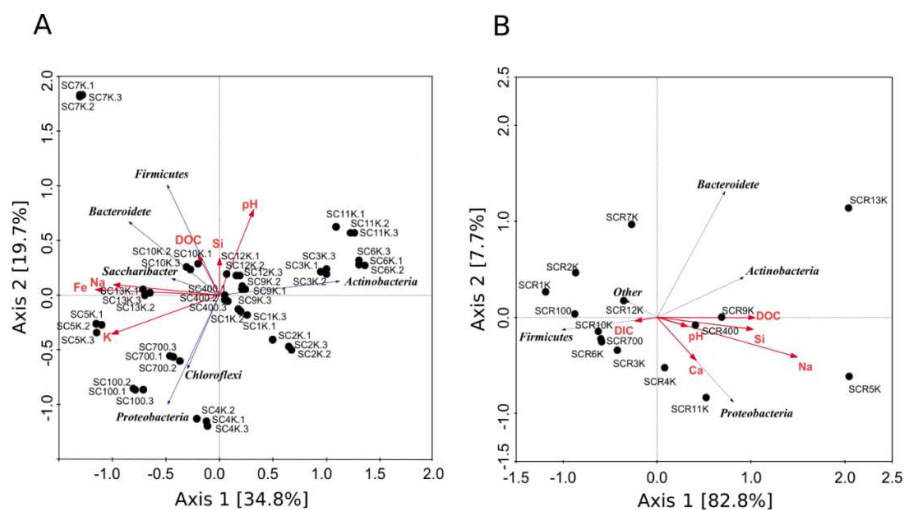


Figura V.23 Grafic RDA pentru dependența filumurilor bacteriene din Scărișoara de parametrii geochimici. Distribuția filumurilor pentru (A) probele triplacat de ADNg și (B) ADNc a fost analizată în relație cu parametrii geochimici relevanți: pH, CAD, COD, Ca, Na, K, Fe, Si. (Paun et al., 2019)

6. REZULTATE: BACTERII CULTIVATE DIN GHEAȚĂ VECHE DE 13000 ANI DIN PEȘTERA SCĂRIȘOARA

6.1 Izolarea și identificarea bacteriilor

6.1.1 Izolarea tulpinilor bacteriene din carota de gheață Scărișoara

Inocularea a 28 probe de gheață topită din Peștera Scărișoara pe mediu R2A la 4°C și 15°C a dus la izolarea și purificarea a 146 colonii bacteriene (Figura VI.1).

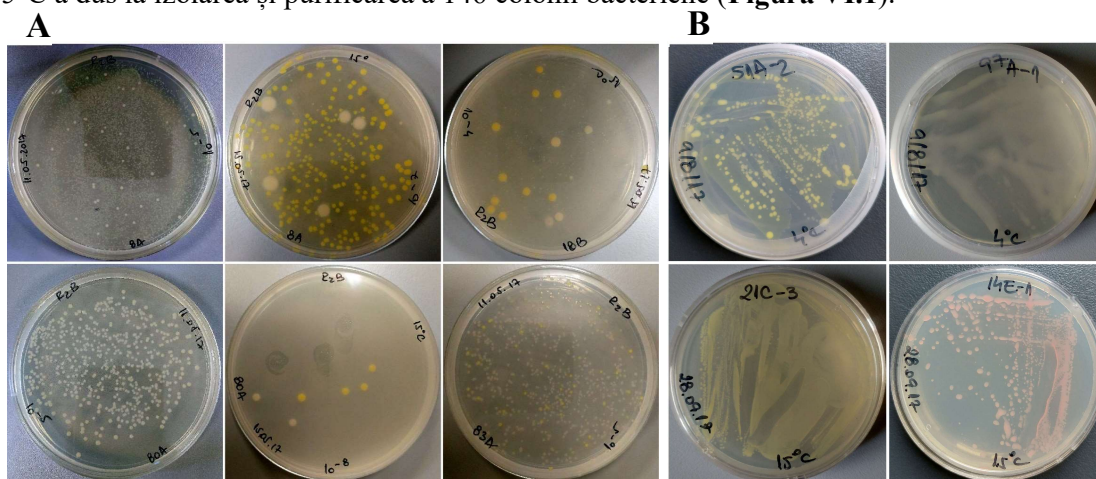


Figura VI.1 (A) Izolarea coloniilor bacteriene și (B) purificarea izolatelor bacteriene obținute pe mediul R2A la 4°C și 15°C.

6.1.2 Izolarea ADN, amplificarea genelor 16S ARNr și corespondența taxonomică

Dintre cele 146 de tulpini, 97 au fost izolate la 15°C și 49 la 4°C. ADN genomic total a fost extras din toate tulpinile de peșteră pentru identificare moleculară, iar pe baza amplificării PCR a genei 16S ARN ribozomal, secvențele nucleotidice au fost desemnate taxonomic cu ajutorul analizei BLAST, rezultând în 4 filumuri, 34 genuri și 56 specii. Din totalul de tulpini bacteriene identificate, în baza secvenței genei 16S ARNr și vârsta stratului de gheață, 70 de izolate au fost selectate pentru caracterizare. Aceste tulpini au fost recuperate din 19 strate diferite de gheață din cronosecvență, la un interval de aproximativ 300 ani.

6.1.3 Distribuția taxonomică a izolatelor bacteriene de-a lungul carotei de gheață de peșteră veche de 13000 ani

Distribuția filumurilor de-a lungul carotei de gheață Scărișoara a indicat prezența Actinobacteria în toate stratele, cu excepția celor de 7000 și 11000 ani, speciile de Proteobacteria s-au regăsit în 12 din 19 strate, în timp ce Firmicutes și Bacteroidetes au fost izolate din doar 6 strate.

6.1.4 Temperatura de creștere și morfologia tulpinilor bacteriene din Scărișoara

Tulpinile bacteriene izolate din Scărișoara au fost inoculate pe 4 medii diferite pentru investigarea potențialelor modificări morfologice ce pot apărea datorită substraturilor diferite de creștere, și pentru a determina preferința pentru mediul de creștere al fiecărui izolat. Variația mediilor de creștere a provocat mici diferențe morfologice pentru majoritatea izolatelor la nivelul pigmentului și formei coloniilor, și un potențial inhibitor în creșterea acestora.

Intervalul de temperatură de creștere al izolatelor bacteriene din Scărișoara a variat între un minim de 4°C (60 tulpini) sau 10°C (10 tulpini), și un maxim de 15°C, 20°C, 25°C, 30°C sau 37°C, o singură tulpină având maximul de creștere la 28°C (**Figura VI.6**). În baza intervalului de creștere descris de Morita în 1975, 5 izolate de peșteră pot fi clasificate ca psihrofile, iar restul de 65 de tulpini drept psihrotolerante. 4 psihrofile și 9 psihrotolerante izolate din gheața de peșteră au avut omologie cu bacterii specifice habitatelor reci.

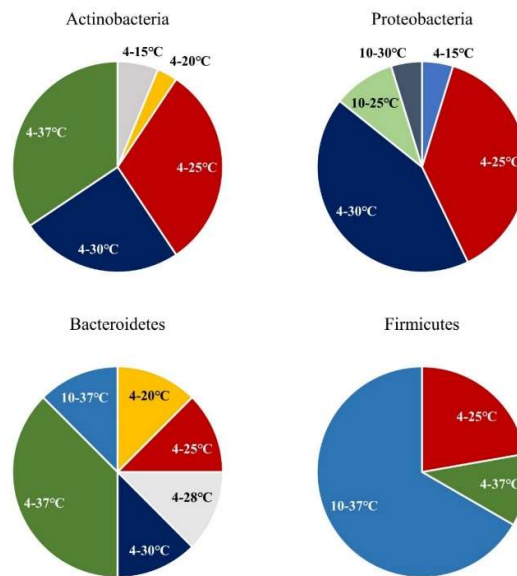


Figura VI.6 Intervalul de temperatură de creștere al filurilor bacteriene din Scărișoara. (Paun et al., 2021)

6.2 Caracterizarea funcțională a tulpinilor bacteriene izolate din gheața din Scărișoara

6.2.1 Rezistența la antibiotice

Profilul de rezistență al izolatelor de peșteră, testat împotriva a 28 antibiotice (17 clase), a scos în evidență 3 fenotipuri: 25 tulpini au avut fenotip multi rezistent la antibiotice (MDR), 8 tulpini au avut fenotip de rezistență extensivă (XDR), și 2 tulpini au prezentat

fenotip pan-rezistent (PDR). Bacteriile Gram-negitive (Proteobacteria și Bacteroidetes) au avut o rezistență mult mai largă împotriva majorității antibioticelor testate, comparat cu rezistența izolatelor Gram-pozitive (Actinobacteria, Firmicutes).

Trei tulpini de Actinobacteria au prezentat fenotip XDR, în timp ce 9 tulpini au avut fenotip MDR, rezistente la 20-25 din 28 antibiotice (**Figura VI.7**). Zece izolate Proteobacteria au avut fenotip MDR, 4 tulpini fenotip XDR iar 2 tulpini au prezentat fenotip PDR (**Figura VI.8**).

Izolatele Bacteroidetes Gram-negitive s-au caracterizat prin rezistență largă la antibiotice, toate tulpinile având rezistență la peste 50% dintre antibiotice. O rezistență la antibiotice mult mai mică a putut fi observată pentru izolatele Gram-pozitive de Firmicutes, o singură tulpină fiind caracterizată prin fenotip MDR (**Figura VI.9**).

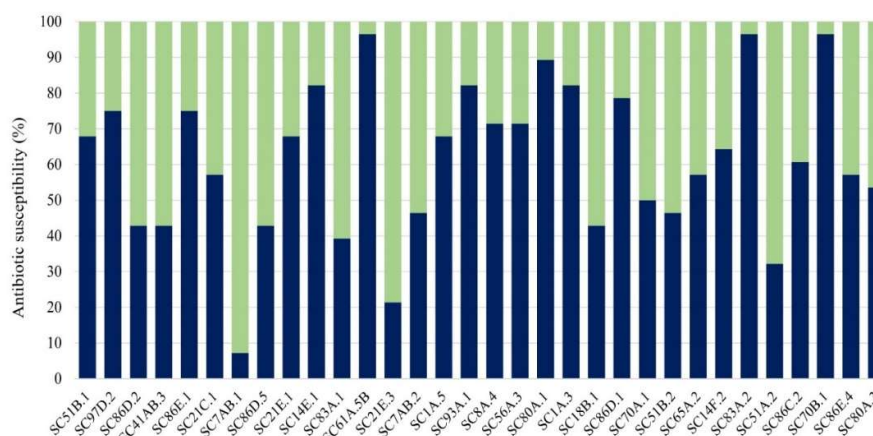


Figura VI.7 Sensibilitatea la antibiotice a izolatelor de peșteră Actinobacteria – % de sensibilitate la doză standard (verde) și de rezistență (albastru) a tulpinilor la 28 antibiotice testate. (Paun et al., 2021)

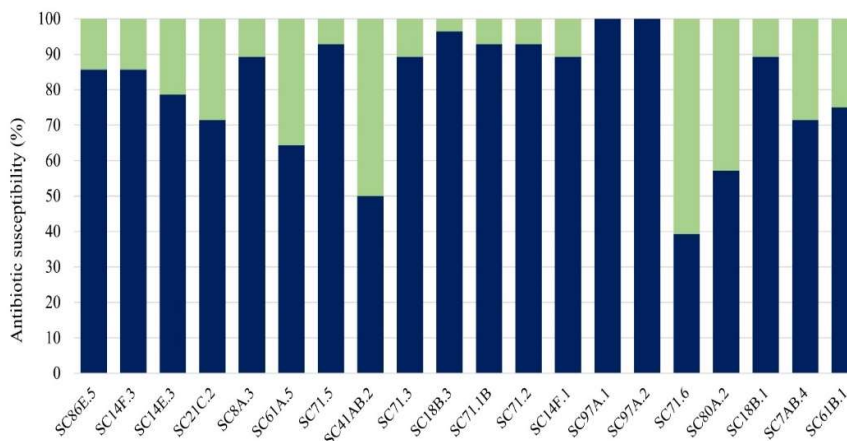


Figura VI.8 Sensibilitatea la antibiotice a izolatelor de peșteră Proteobacteria – % de sensibilitate la doză standard (verde) și de rezistență (albastru) a tulpinilor la 28 antibiotice testate. (Paun et al., 2021)

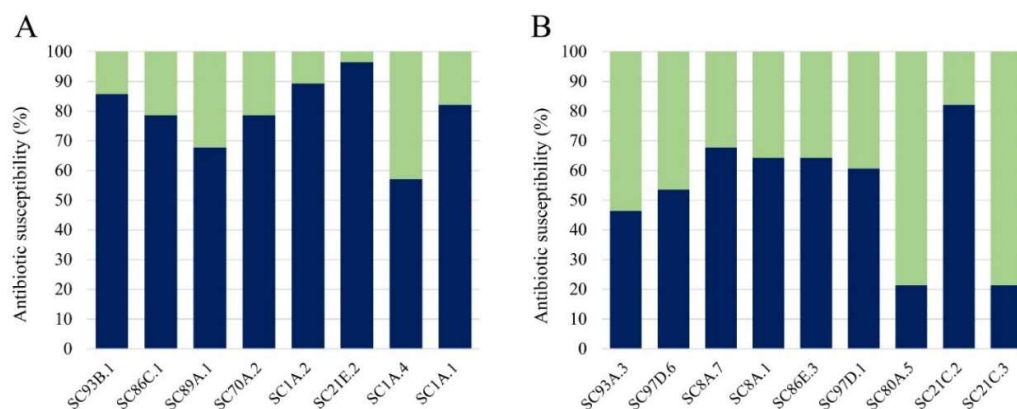


Figure VI.9 Sensibilitatea la antibiotice a izolatelor de peșteră (A) Bacteroidetes și (B) Firmicutes – % de sensibilitate la doză standard (verde) și de rezistență (albastru) a tulpinilor la 28 antibiotice testate. (Paun et al., 2021)

6.2.2 Impactul climatic asupra rezervorului de rezistență la antibiotice a bacteriilor din gheața de peșteră

Analiza rezistenței la antibiotice a tulpinilor de peșteră în relație cu schimbările climatice din timpul procesului de depoziție al gheții, a scos în evidență un profil variabil de rezistență de-a lungul carotei de 13000 ani. Au predominat fenotipuri MDR, XDR și PDR în gheața recentă, în Perioada Caldă Medievală (MWP; 953-1124 ani), Perioada Caldă din Holocen Mijlociu (MHWP; 4751-5335 ani) și în stratul de 7500 ani (Figura VI.10).

Izolatele bacteriene regăsite în gheața acumulată în timpul perioadelor climatice LIA (Mica Glaciațiune), MWP și MHWP, au avut un profil de rezistență divers, bacteriile izolate

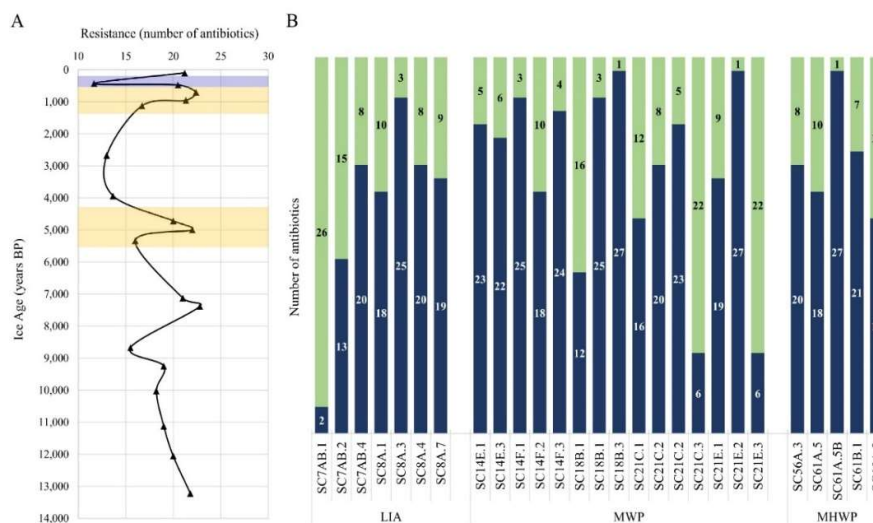


Figura VI.10 Impactul vârstei și climei din timpul procesului de depozitare al gheții asupra rezistenței la antibiotice. (Paun et al., 2021)

din perioadele climatice calde (MWP și MHWP) prezentând o rezistență la antibiotice mai crescută decât cele din perioada climatică rece (LIA) (**Figura VI.10**).

6.2.3 Activitatea antimicrobiană

11 tulpini bacteriene din Scărișoara (5 Actinobacteria, 5 Proteobacteria, 1 Firmicutes) au fost selectate în baza parametrilor de creștere și a profilului de rezistență la antibiotice, în vederea caracterizării lor din punct de vedere al activității antimicrobiene. Toate izolatele selectate au avut activitate antimicrobiană împotriva a 3 tulpini patogene: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* CN11 și MRSA 19081 F1.

În mod notabil, a fost tulpina izolată de la 13000 ani de *P. grimontii* SC97A.2, care a avut activitate antimicrobiană împotriva a 14 patogeni testați, în timp ce cea mai mică activitate a fost înregistrată pentru tulpinile din Scărișoara *B. toyonensis* SC86E.3 și *Pseudarthrobacter sp.* SC86E.4, având efect inhibitor doar împotriva a 6 patogeni fiecare. Suplimentar, 8 tulpini patogene testate au avut rezistență completă.

6.2.4 Caracteristici biochimice

Cele 11 tulpini bacteriene selectate au fost caracterizate biochimic prin determinarea profilului de activitate enzimatică folosind sistemul test API (Analytical Profile Index) ZYM (Gruner et al., 1992) și prin stabilirea substratelor asimilate utilizând sistemul API 20NE.

Caracteristicile funcționale obținute în baza testelor API ZYM au scos în evidență un profil enzimatic distinct al tulpinilor bacteriene de peșteră, nici una dintre acestea având capacitatea de a metaboliza substratele α -chimotripsină și α -fucosidză. Toate tulpinile izolate au avut activitate enzimatică crescută pentru Leucin arilamidază (4-5) și pentru Naftol-AS-BI-fosfohidrolază (3-5).

Mai mult, sistemul test API 20NE a scos în evidență profilul distinct de utilizare a substratelor, 11 izolate fiind capabile să hidrolizeze β -glucosidase, în timp ce toate izolatele nu au putut reduce nitrații la nitrogen și au testat negativ pentru producerea de indol, fermentarea glucozei și dihidroliza argininei. Aceste izolate bacteriene din peșteră au scos în evidență un model variabil de asimilare a substratelor, toate tulpinile fiind capabile să asimileze malatul, iar 10 tulpini au putut folosi glucoza drept substrat nutritiv.

7. REZULTATE: IZOLAREA, CARACTERIZAREA FUNCȚIONALĂ ȘI SECVENȚIAREA GENOMULUI TULPINII BACTERIENE

Psychrobacter sp. SC65A.3

7.1 Isolation and identification of *Psychrobacter* sp. SC65A.3

O colonie pigmentată roz/portocaliu a fost izolată la 4°C din proba de gheață de 5335 ± 54 de ani. Această tulpină bacteriană (SC65A.3) s-ar putea dezvolta atât pe mediul R2A, cât și pe TSA într-un interval de temperatură de 4°C - 15°C, fiind clasificată ca psihrofilă conform lui Morita (1975). Identificarea taxonomică a SC65A.3 a fost realizată prin amplificarea PCR a genei 16S ARNr și secvențierea nucleotidelor, iar analiza BLAST a arătat o identitate de 97% cu o tulpină omoloagă de *Psychrobacter* izolată din medii reci.

7.2 Caracterizarea funcțională a *Psychrobacter* sp. SC65A.3

7.2.1 Profil de rezistență la antibiotice

Această tulpină bacteriană a prezentat o rezistență ridicată la toate antibioticele cu spectru îngust, la metronidazol și la 12 din 21 dintre antibioticele cu spectru larg utilizate. Având în vedere rezistența observată la 19 din 28 de antibiotice, *Psychrobacter* sp. SC65A.3 ar putea prezenta un fenotip de rezistență la mai multe medicamente (**Figura VII.2**).

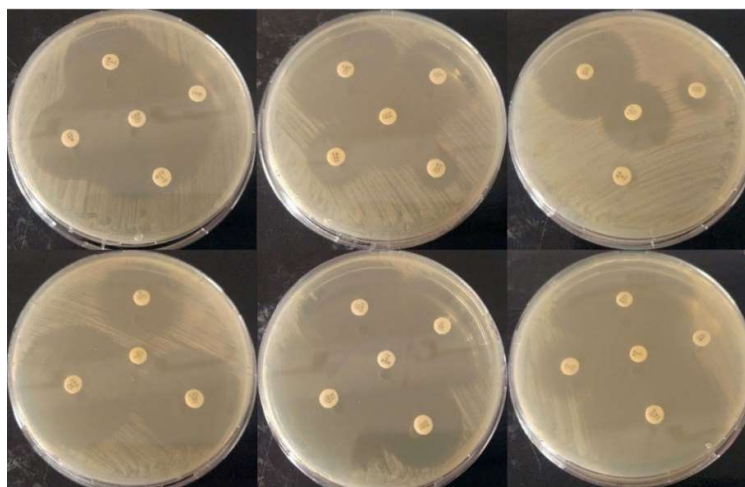


Figura VII.2 Evaluarea rezistenței la antibiotic a tulpinii SC65A.3 din Scărișoara.

7.2.2 Activitate antimicrobiană

Activitatea antimicrobiană a SC65A.3 a arătat inhibarea atât împotriva tulpinilor de colectare ATCC de *S. aureus*, cât și de *E. coli* și a 12 din cei 20 de agenți patogeni clinici testați. Cel mai important, SC65A.3 a prezentat o activitate antimicrobiană împotriva

agenților patogeni Gram-negativi aparținând genurilor *Enterobacter* (2 tulpini) și câte 3 atât din *Pseudomonas* (3 tulpini) cât și *Klebsiella* (3 tulpini) și *E. coli* (Tabel VII.2) .

Tabel VII.2 Activitatea antimicrobiană a *Psychrobacter sp.* SC65A.3.

| Test patogen | Activitate antimicrobiană a <i>Psychrobacter sp.</i> SC65A.3 (+/-) |
|--|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | + |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | + |
| <i>Enterobacter asburiae</i> 19069 ONE1 | - |
| <i>Enterobacter cloacae</i> 19069 ONE2 | + |
| <i>Enterobacter cloacae</i> 19069 ONE3 | + |
| <i>Pseudomonas</i> CN11 | + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 19053 CNE5 | + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 19053 CNE6 | + |
| MRSA 19081 F1 | + |
| MRSA 19081 S1 | - |
| MRSA 388 | - |
| <i>Klebsiella</i> 8 | - |
| <i>Klebsiella</i> 19094 CK1 | + |
| <i>Klebsiella</i> 19094 CK2 | + |
| <i>Klebsiella</i> 19094 CK3 | + |
| <i>Acinetobacter</i> 19047 ENE4 | - |
| <i>Acinetobacter</i> 19047 CNE5 | - |
| <i>Acinetobacter</i> 19047 CNE3 | - |
| <i>Acinetobacter</i> 18032 C3 | - |
| <i>Enterococcus faecium</i> 19040 E1 | + |
| <i>Enterococcus faecium</i> 19040 E2 | + |
| <i>Enterococcus faecium</i> 19040 E3 | + |
| Total | 14 |

7.2.3 Caracterizarea biochimică

Screening-ul activităților enzimactice ale SC65A.3 folosind sistemul de testare API ZYM a evidențiat o serie de activități enzimactice ridicate, cum ar fi lipaza (C14), fosfataza alcalină, esteraza (C 4), esteraza lipaza (C 8) și naftol-AS-BI- fosfohidrolaza (**Tabel VII.3**).

Profilul de utilizare a substratului tulpinii Scărișoara, determinat folosind sistemul de testare API 20NE, a aratat capacitatea de a reduce nitrații la nitriți, de a metaboliza ureea și de a avea o activitate pozitivă de hidroliză a esculinei și a citocrom oxidazei (**Figura VII.5**).



Figura VII.5 Sistemul API 20NE pentru tulpina din Scărișoara *Psychrobacter sp.* SC65A.3.

Tabel VII.3 Evaluarea activității enzimatică a *Psychrobacter sp.* SC65A.3 cu API ZYM

| No. | Activitate enzimatică | Potențial aplicativ | Rezultate |
|-----|------------------------------------|--|-----------|
| 1 | Control | | 0 |
| 2 | Fosfatază alcalină | Diagnostic clinic; teste cromogene; industria laptelui | 3 |
| 3 | Esterază (C 4) | Prelucrare alimentară; industriile băuturilor, parfumurilor, farmaceutice și chimice; agricultură și degradarea materialelor sintetice | 3 |
| 4 | Esterază Lipaza (C 8) | | 3 |
| 5 | Lipază(C 14) | Industria detergenților; industria farmaceutică; biocombustibili; industria de prelucrare a alimentelor | 4 |
| 6 | Leucin arilamidază | Industria alimentară | 3 |
| 7 | Valin arilamidază | | 2 |
| 8 | Cistin arilamidază | | 2 |
| 9 | Tripsină | Industria de prelucrare a alimentelor | 1 |
| 10 | α -chimotripsină | | 1 |
| 11 | Fosfataza acidă | | 0 |
| 12 | Naftol-AS-BI-fosfohidrolază | Markeri clinici pentru diferite boli | 3 |
| 13 | α -galactozidază | | 0 |
| 14 | β -galactozidază | | 0 |
| 15 | β -galactozidază | | 0 |
| 16 | α -glucosidază | Producerea de microorganisme indigene cu activitate prebiotică; industria biocombustibililor; biosenzori medicali | 1 |
| 17 | β -glucosidază | | 0 |
| 18 | N-acetil- β -glucozaminidază | Aplicații clinice | 1 |
| 19 | α -manozidază | | 0 |
| 20 | α -fucosidază | | 0 |

Intervalul de salinitate pentru creșterea tulpinii SC65A.3 a fost de 0 M – 1,9 M NaCl și 0M – 0,9 M MgCl₂, cultivat la 15°C în mediu LB timp de 7 zile.

7.3 Secvențierea și analiza întregului genom

Întregul genom al tulpinii SC65A.3 a fost secvențiat în vederea identificării elementelor structurale asociate cu rezistența naturală la antibiotice a acestei tulpini captive în gheață pentru ultimele 5 milenii și pentru eventuale studii viitoare care investighează noi enzime și molecule active la temperaturi scăzute.

Ansamblul genomului *de novo* a generat un contig circular unic de 3046103 baze lungime, cu un conținut de GC de 42,52%. Analiza BLAST a arătat cel mai mare scor de omologie cu *Psychrobacter cryohalolentis* [CP022043.2]. Analiza genomului SC65A.3 asamblat a arătat prezența a 2602 gene (**Tabelul VII.7**). Adnotarea funcțională folosind baza de date EggNOG a identificat un număr de 2536 de regiuni de codificare (CDS), din care 29

de loci/gene au fost asociate cu rezistența la antibiotice, majoritatea aparținând categoriei mecanismului de apărare cu notația EggNOG „V”.

Table VII.7 Adnotarea genomului pentru tulpina din Scărișoara SC65A.3

| Contig name | Length | Number of genes | CDS | tRNA | rRNA |
|-------------|-----------|-----------------|-------|------|------|
| SC65A.3 | 3,046,103 | 2,602 | 2,536 | 50 | 15 |

A fost efectuată o analiză filogenetică cu probabilitate maximă (secvența genei 16S ARNr) pentru a arăta relația dintre tulpina SC65A.3 *Psychrobacter* și cele mai apropiate 17 specii de referință (**Figura VII.9**). Analiza a indicat o afiliere strânsă cu tulpinile de *Psychrobacter* psihrotolerante și psicrofile, grupându-se cu 5 specii de *Psychrobacter* psicrofile: *P. adeliensis*, *P. okhotskensis*, *P. urativorans*, *P. glacicola* și *P. cryohalolentis*. (**Figura VII.9**).

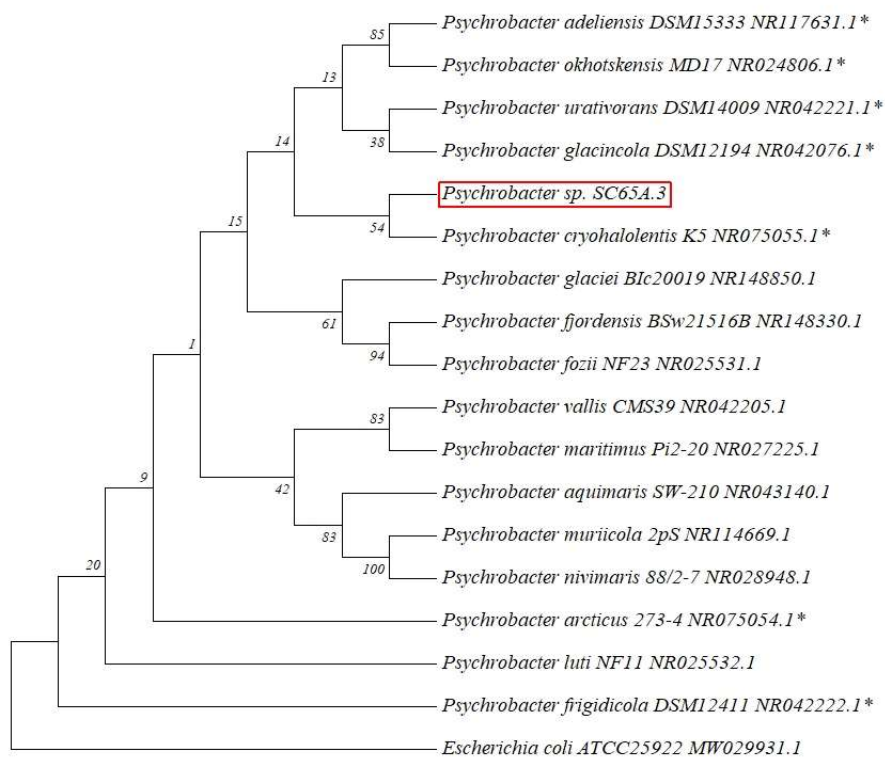


Figura VII.9 Analiză filogenetică cu probabilitate maximă între tulpina SC65A.3 (roșu) și cele mai apropiate 17 specii de referință (* = psychrophilic *Psychrobacter* species).

8. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE

Acest studiu raportează investigarea microbiomului din Scărișoara din cea mai veche gheață acumulată în peșteri și s-a concentrat pe identificarea și caracterizarea structurii și funcției comunității bacteriene pornind de la prelevarea unei cronosecvențe de gheață veche de 13000 de ani din Peștera de Gheață Scărișoara, România.

Au fost investigate atât comunitățile bacteriene totale, cât și cele potențial active, precum și tulpinile bacteriene izolate, pentru a extinde cunoștințele despre acest microbiom special de mediu rece și pentru a evidenția potențialul său aplicativ. În plus, a fost obținut și caracterizat pentru prima dată întreg genomul unei tulpini izolate din gheața de peșteră veche de 5.335 ± 54 ani din Scărișoara.

Diferiți taxoni bacterieni comuni habitatelor reci au dominat ambele tipuri de comunități, dezvăluind un model distinct de abundență relativă a bacteriilor totale și potențial active în cronosecvența de gheață.

Comunitatea bacteriană necultivată (probe de ADNg) a fost dominată în majoritatea stratelor de gheață de Actinobacteria și Proteobacteria, cu excepția stratului de gheață vechi de 7.000 de ani, unde Firmicutes a fost cel mai dominant filum.

În comunitatea potențial activă (ADNc), cronosecvența a fost dominată de Proteobacteria și Firmicutes, cu o distribuție omogenă. OTU-urile aparținând Bacteroidetes au fost găsite în toate stratele de gheață, din ambele tipuri de comunități, dar mai puțin reprezentate decât celelalte trei filumuri proeminente.

Aceste date se corelează și cu numărul scăzut de tulpini izolate de Bacteroidetes găsite în gheața de la Scărișoara. Chiar dacă Firmicutes a fost unul dintre filumurile dominante ale comunității potențial active, un număr destul de mic de tulpini bacteriene din gheața de la Scărișoara au fost izolate și caracterizate.

Densitatea globală a celulelor microbiene determinată în blocul de gheață Scărișoara este destul de scăzută, evidențiindu-se valori crescute în stratul vechi de 6000 de ani. Corelarea densității celulelor microbiene cu conținutul de carbon organic dizolvat (COD) și concentrațiile de siliciu a relevat contribuția majoră a proceselor de depunere în modelarea abundenței microbiomului în blocul de gheață din peșteră.

A fost observat un microbiom mai activ, capabil să crească în stratele de gheață asociat cu o comunitate mai abundentă și un conținut mai mare de COD, făcând conținutul de carbon organic al probelor carotate din Scărișoara să fie potențial responsabil pentru modelarea compoziției comunității bacteriene din acest bloc de gheață peren.

Au fost izolate 70 de tulpini distincte active la temperaturi scăzute, identificate prin secvențierea genei 16S ARNr și caracterizate în ceea ce privește temperatura de creștere, rezistența la antibiotice, profilurile de activitate enzimatică și antimicrobiană. Aceste tulpini reprezintă primele bacterii izolate din gheața perenă din peșteră, acumulată în ultimii 13.000 de ani, oferind, de asemenea, prima dovadă bazată pe cultivare a unui rezistom din acest tip de mediu.

Izolatele bacteriene din gheața Scarisoara au fost repartizate în 4 filumuri, 34 de genuri și 56 de specii, predominând Actinobacteria, urmate de Proteobacteria, Firmicutes și Bacteroidetes. Procentajul scăzut de identitate a genei ARNr 16S (<97%) cu omologii bazei de date omoloage în cazul a 18 dintre tulpini ar putea corespunde unor presupuse noi specii de peșteri de gheață.

Pe baza profilului temperaturii de creștere, au fost identificate 5 psihrofile, în timp ce restul au fost bacterii psihrotolerante. 13 dintre izolatele din Scărișoara au fost omoloage cu tulpini raportate în alte medii reci, dintre care 11 au fost caracterizate ca fiind psihrotrofe.

Profilul de susceptibilitate la antibiotice al tuturor izolatelor bacteriene din Scărișoara a relevat faptul ca tulpinile Gram-negative au fost mai rezistente la majoritatea antibioticelor testate în comparație cu cele Gram-pozitive. 35 de tulpini din Scărișoara au prezentat fenotipuri MDR, XDR și PDR.

Prevalența fenotipurilor de rezistență la medicamente în gheața perenă de la Scărișoara a fost coroborată cu rezistența multiplă a probelor vechi de gheață din permafrost, sol arctic și probe dintr-o peșteră izolată de la suprafață de peste 4 milioane (D'Costa și colab., 2011; Perron. și colab., 2015), arătând existența unui rezistom divers, în care rezistența este corelată cu mecanismele de adaptare la frig, precum și cu HGT a genelor de rezistență antimicrobiană asociate integronilor dintre comunitățile bacteriene locale (Miller et al., 2014).

Datorită profilului de rezistență extins și a activității antimicrobiene a tuturor izolatelor, în special împotriva agenților patogeni Gram negativi, aceste tulpini de bacterii din peșteră, extrase din cronosecvența de gheață veche de 13000 de ani ar putea oferi răspunsuri importante care ar putea ajuta la deslușirea evoluției rezistenței naturale și clinice la antibiotice (Paun și colab., 2021).

Profilul activității enzimaticice ale izolatelor adaptate la temperaturi scăzute selectate din Scărișoara a indicat potențialul lor ca o sursă valoroasă de noi catalizatori pentru diverse industrii, inclusiv biomarkeri clinici și diagnosticare, industria alimentară și a produselor

lactate, producția de biocombustibili, industria prebiotică și biosensing medical, farmaceutic, producția de cosmetice și detergenți.

Întreaga secvență a genomului unei tulpini izolate din Scărișoara a fost determinată și caracterizată pentru prima dată. Secvența genei 16S ARNr a tulpinii psihrofile din Scărișoara SC65A.3 a fost omoloagă în proporție de 97% cu o tulpină arctică de *Psychrobacter glaciei* (Zeng și colab., 2016), prezentând rezistență la 19 din 28 de antibiotice și având activitate antimicrobiană împotriva a 14 patogeni testați. Pe baza profilului biochimic al SC65A.3, această tulpină bacteriană are potențialul de a fi explorată în continuare pentru a obține biocatalizatori performanți activi la temperaturi scăzute utilizat în diferite industrii (Gheorghita et al., 2021).

Pe lângă activități enzimactice promițătoare cu potențial aplicativ industrial, datele raportate reprezintă prima caracterizare a rezistenței la antibiotice și a activității antimicrobiene a unei tulpini bacteriene izolate din gheața perenă din Peștera Scărișoara.

Întreaga secvență a genomului acestei tulpini va fi explorată în continuare pentru a elucida baza moleculară a rezistomului natural al tulpinii SC65A.3, pentru a identifica noi molecule pentru combaterea rezistenței vaste la antibiotice și presupusi noi biocatalizatori de înaltă stabilitate, activi la temperaturi scăzute.

Genomul SC65A.3 reprezintă un contig unic circular de 3.046.103 baze omoloage (identitate 97%) cu o tulpină de *Psychrobacter cryohalolentis* provenită din permafrostul siberian (Bakermans și colab., 2006) care conține 2602 gene, 2536 gene CDS, 50 de gene care codifică ARNt și 15 gene care codifică ARNr. Dintre acestea, au fost evidențiate un număr de 29 de gene presupuse a fi implicate în rezistența la antibiotice.

Studiile ulterioare vor face obiectul unei investigații aprofundate a diferitelor căi metabolice și gene funcționale ale acestei tulpini izolate din Peștera Scărișoara exploatănd informațiile secvenței genomului prin analiză structurală, precum și structura funcțională prin RT-PCR și clonarea genelor pentru obținerea și caracterizarea de noi biocatalizatori recombinanți activi la temperaturi scăzute.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Articole publicate din subiectul tezei

1. **V.I. Paun**, G. Icaza, P. Lavin, C. Marin, A. Tudorache, A. Persoiu, C. Dorador, C. Purcarea (2019) *Total and potentially active bacterial communities from a Late Glacial through Holocene ice core of Scarisoara Ice Cave, Romania*. **Front. Microbiol.** 10:1193. doi: 10.3389/fmicb.2019.01193 (Q1)
2. **V.I. Paun**, P. Lavin, M.C. Chifiriuc, C. Purcarea (2021) *First report on antibiotic resistance and antimicrobial activity of bacterial isolates from 13,000-year old cave ice core*. **Sci. Rep.** 11:514. doi: 10.1038/s41598-020-79754-5 (Q1)
3. Gheorghita G.R., **Paun V.I.**, Neagu S., Maria G.-M., Enache M., Purcarea C., Parvulescu V.I., Tudorache M. (2021) *Cold-Active Lipase-Based Biocatalysts for Silymarin Valorization through Biocatalytic Acylation of Silybin*. **Catalysts.** 11:1390. doi: 10.3390/catal11111390 (Q2)

Alte articole publicate

1. Iancu L., Angelescu I.R., **Paun V.I.**, Henríquez-Castillo C., Lavin P., Purcarea C. (2021) *Microbiome pattern of *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) and feeding substrate in the presence of the foodborne pathogen *Salmonella enterica**. **Sci. Rep.** 11:15296. doi: 10.1038/s41598-021-94761-w (Q1)
2. Necula-Petrareanu G, Lavin P, **Paun VI**, Gheorghita GR, Vasilescu A, Purcarea C. (2022) *Highly Stable, Cold-Active Aldehyde Dehydrogenase from the Marine Antarctic *Flavobacterium* sp. PL002*. **Fermentation.** 8(1):7. doi: 10.3390/fermentation8010007 (Q1)
3. Mondini A., **Paun V.**, Necula-Petrareanu G., Iancu L., Purcarea C., 2019, *Cold adaptation mechanisms of aspartate transcarbamoylase from *Glaciibacter superstes*, an Arctic psychrophilic bacterium*, Romanian Journal of Biology, 64, 19 – 30. (BDI)
4. **Victoria I. Paun**, Georgiana Necula-Petrareanu, Antonio Mondini, Cristina Purcărea. 2018. “*Aspartate transcarbamoylase obtained from a psychrophilic bacterium (*Rugamonas* sp.) isolated from an Antarctic lake*”. In: The novel results of the Institute of Biology Bucharest into fields of Ecology, Microbiology and Citobiology, Ed. Ars Docendi, Bucuresti. ISBN 978-606-998-044-6 (Book chapter)

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
2. Anesio, A.M., Laybourn-Parry, J., 2012. Glaciers and ice sheets as a biome. *Trends Ecol. Evol.* 27, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.09.012>
3. Bakermans, C., Ayala-del-Río, H.L., Ponder, M.A., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M.F., Tiedje, J.M., 2006. *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1285–1291. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64043-0>
4. Belov, A.A., Cheptsov, V.S., Manucharova, N.A., Ezhelev, Z.S., 2020. Bacterial Communities of Novaya Zemlya Archipelago Ice and Permafrost. *Geosciences* 10, 67. <https://doi.org/10.3390/geosciences10020067>
5. Borchert, E., Jackson, S.A., O’Gara, F., Dobson, A.D.W., 2017. Psychrophiles as a Source of Novel Antimicrobials, in: Margesin, R. (Ed.), *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 527–540. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0_22
6. Bowman, J.P., 2006. The Genus *Psychrobacter*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp. 920–930. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_35
7. Bowman, J.P., Nichols, D.S., McMeekin, T.A., 1997. *Psychrobacter glacincola* sp. nov., a Halotolerant, Psychrophilic Bacterium Isolated from Antarctic Sea Ice. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 209–215. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80067-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80067-7)
8. Brad, T., Bădăluță, C.-A., Persoiu, A., 2018. Ice Caves in Romania, in: *Ice Caves*. Elsevier, pp. 511–528. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811739-2.00025-5>
9. Brad, T., Iteus, C., Pascu, M.-D., Persoiu, A., Hillebrand-Voiculescu, A., Iancu, L., Purcarea, C., 2018a. Fungi in perennial ice from Scărișoara Ice Cave (Romania). *Sci. Rep.* 8, 10096. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28401-1>
10. Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M., 2000. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 573–606. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.573-606.2000>
11. Cavicchioli, R., Charlton, T., Ertan, H., Omar, S.M., Siddiqui, K.S., Williams, T.J., 2011. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles: Enzymes from psychrophiles. *Microb. Biotechnol.* 4, 449–460. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00258.x>
12. Dasila, H., Maithani, D., Suyal, D.C., Debbarma, P., 2022. Cold-Adapted Microorganisms: Survival Strategies and Biotechnological Significance, in: Goel, R., Soni, R., Suyal, D.C., Khan, M. (Eds.), *Survival Strategies in Cold-Adapted Microorganisms*. Springer Singapore, Singapore, pp. 357–378. https://doi.org/10.1007/978-981-16-2625-8_16
13. D’Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D., 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
14. Feurdean, A., Persoiu, A., Pazdur, A., Onac, B.P., 2011. Evaluating the palaeoecological potential of pollen recovered from ice in caves: A case study from Scărișoara Ice Cave, Romania. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 165, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2011.01.007>

15. Gesheva, V., 2010. Production of antibiotics and enzymes by soil microorganisms from the windmill islands region, Wilkes Land, East Antarctica. *Polar Biol.* 33, 1351–1357. <https://doi.org/10.1007/s00300-010-0824-x>
16. Gheorghita, G.R., Paun, V.I., Neagu, S., Maria, G.-M., Enache, M., Purcarea, C., Parvulescu, V.I., Tudorache, M., 2021. Cold-Active Lipase-Based Biocatalysts for Silymarin Valorization through Biocatalytic Acylation of Silybin. *Catalysts* 11, 1390. <https://doi.org/10.3390/catal11111390>
17. Gruner, E., von Graevenitz, A., Altwegg, M., 1992. The API ZYM system: a tabulated review from 1977 to date. *J. Microbiol. Methods* 16, 101–118. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(92\)90030-8](https://doi.org/10.1016/0167-7012(92)90030-8)
18. Hemala, L., Zhang, D., Margesin, R., 2014. Cold-active antibacterial and antifungal activities and antibiotic resistance of bacteria isolated from an alpine hydrocarbon-contaminated industrial site. *Res. Microbiol.* 165, 447–456. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.05.035>
19. Hillebrand-Voiculescu, A., Itcus, C., Ardelean, I., Pascu, D., Persoiu, A., Rusu, A., Brad, T., Popa, E., Onac, B.P., Purcarea, C., 2014. Searching for cold-adapted microorganisms in the underground glacier of Scarisoara Ice Cave, Romania. *Acta Carsologica* 43. <https://doi.org/10.3986/ac.v43i2-3.604>
20. Hillebrand-Voiculescu, A., Rusu, A., Itcus, C., Persoiu, A., Brad, T., Pascu, M.D., Ardelean, I., Onac, B.P., Purcarea, C., 2013. Bacterial 16S-rRNA gene clone library from recent ice stalagmites of Scărișoara cave. *Romanian J. Biochem.* 109–118.
21. Holmlund, P., Onac, B.P., Hansson, M., Holmgren, K., Mörth, M., Nyman, M., Persoiu, A., 2005. Assessing the palaeoclimate potential of cave glaciers: the example of the scărișoara ice cave (romania). *Geogr. Ann. Ser. Phys. Geogr.* 87, 193–201. <https://doi.org/10.1111/j.0435-3676.2005.00252.x>
22. Horikoshi, K., Bull, A.T., 2011. Prologue: Definition, Categories, Distribution, Origin and Evolution, Pioneering Studies, and Emerging Fields of Extremophiles, in: Horikoshi, K. (Ed.), *Extremophiles Handbook*. Springer Japan, Tokyo, pp. 3–15. https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_1
23. Itcus, C., Pascu, M.-D., Brad, T., Persoiu, A., Purcarea, C., 2016. Diversity of cultured bacteria from the perennial ice block of Scarisoara Ice Cave, Romania. *Int. J. Speleol.* 45, 89–100. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.45.1.1948>
24. Itcus, C., Pascu, M.D., Lavin, P., Persoiu, A., Iancu, L., Purcarea, C., 2018. Bacterial and archaeal community structures in perennial cave ice. *Sci. Rep.* 8, 15671. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34106-2>
25. Juni, E., 2005. Genus III. Psychrobacter, in: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M., Boone, D.R., De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. (Eds.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7>
26. Juni, E., Heym, G.A., 1986. Psychrobacter immobilis gen. nov., sp. nov.: Genospecies Composed of Gram-Negative, Aerobic, Oxidase-Positive Coccobacilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 388–391. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-3-388>
27. Khan, U., Selamoglu, Z., 2020. Use of Enzymes in Dairy Industry: A Review of Current Progress. *Arch. Razi Inst.* 75, 131–136. <https://doi.org/10.22092/ari.2019.126286.1341>
28. Kochhar, N., I.K, K., Shrivastava, S., Ghosh, A., Rawat, V.S., Sodhi, K.K., Kumar, M., 2022. Perspectives on the microorganism of extreme environments and their applications. *Curr. Res. Microb. Sci.* 3, 100134. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100134>

29. Koci, B.R., Kuivinen, K.C., 1984. The Pico Lightweight Coring Auger. *J. Glaciol.* 30, 244–245. <https://doi.org/10.1017/S002214300006018>
30. Kohanski, M.A., DePristo, M.A., Collins, J.J., 2010. Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. *Mol. Cell* 37, 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.003>
31. Kralova, S., Busse, H.-J., Bezdíček, M., Sandoval-Powers, M., Nykrýnová, M., Staňková, E., Krsek, D., Sedláček, I., 2021. *Flavobacterium flabelliforme* sp. nov. and *Flavobacterium geliluteum* sp. nov., Two Multidrug-Resistant Psychrotrophic Species Isolated From Antarctica. *Front. Microbiol.* 12, 729977. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.729977>
32. Lasa, A., Romalde, J.L., 2017. Genome sequence of three *Psychrobacter* sp. strains with potential applications in bioremediation. *Genomics Data* 12, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2017.01.005>
33. Lavin, P., Atala, C., Gallardo-Cerda, J., Gonzalez-Aravena, M., De La Iglesia, R., Osés, R., Torres-Díaz, C., Trefault, N., Molina-Montenegro, M.A., Laughinghouse IV, H.D., 2016a. Isolation and characterization of an Antarctic *Flavobacterium* strain with agarase and alginate lyase activities. *Pol. Polar Res.* 37, 403–419. <https://doi.org/10.1515/popore-2016-0021>
34. Lavin, P.L., Yong, S.T., Wong, C.M.V.L., De Stefano, M., 2016. Isolation and characterization of Antarctic psychrotroph *Streptomyces* sp. strain INACH3013. *Antarct. Sci.* 28, 433–442. <https://doi.org/10.1017/S0954102016000250>
35. Lee, L.-H., Cheah, Y.-K., Mohd Sidik, S., Ab Mutalib, N.-S., Tang, Y.-L., Lin, H.-P., Hong, K., 2012a. Molecular characterization of Antarctic actinobacteria and screening for antimicrobial metabolite production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2125–2137. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1018-1>
36. Lewis, K., 2020. The Science of Antibiotic Discovery. *Cell* 181, 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056>
37. Lo Giudice, A., Bruni, V., Michaud, L., 2007a. Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms. *J. Basic Microbiol.* 47, 496–505. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700227>
38. Lo Giudice, A., Fani, R., 2016. Antimicrobial Potential of Cold-Adapted Bacteria and Fungi from Polar Regions, in: Rampelotto, P.H. (Ed.), *Biotechnology of Extremophiles: Grand Challenges in Biology and Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 83–115. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2_3
39. Margesin, R., Miteva, V., 2011. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res. Microbiol.* 162, 346–361. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.12.004>
40. Matuschek, E., Brown, D.F.J., Kahlmeter, G., 2014. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O255–O266. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>
41. Meng, M., Li, Y., Yao, H., 2022. Plasmid-Mediated Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Soil. *Antibiotics* 11, 525. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040525>
42. Mikucki, J.A., Han, S.K., Lanoil, B.D., 2011. Ecology of Psychrophiles: Subglacial and Permafrost Environments, in: Horikoshi, K. (Ed.), *Extremophiles Handbook*. Springer Japan, Tokyo, pp. 755–775. https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_37
43. Miller, J.H., Novak, J.T., Knocke, W.R., Pruden, A., 2014. Elevation of antibiotic resistance genes at cold temperatures: implications for winter storage of sludge and biosolids. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 587–593. <https://doi.org/10.1111/lam.12325>

44. Morita, R.Y., 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39, 144–167. <https://doi.org/10.1128/br.39.2.144-167.1975>
45. Morozova, O.V., Andreeva, I.S., Zhirakovskiy, V.Y., Pechurkina, N.I., Puchkova, L.I., Saranina, I.V., Emelyanova, E.K., Kamynina, T.P., 2022. Antibiotic resistance and cold-adaptive enzymes of antarctic culturable bacteria from King George Island. *Polar Sci.* 31, 100756. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2021.100756>
46. Nedialkova, D., Naidenova, M., 2005. Screening the Antimicrobial activity of Actinomycetes strains isolated from Antarctica. *J. Cult. Collect.* 4, 29–35.
47. Nunez-Montero, K., Barrientos, L., 2018. Advances in Antarctic Research for Antimicrobial Discovery: A Comprehensive Narrative Review of Bacteria from Antarctic Environments as Potential Sources of Novel Antibiotic Compounds Against Human Pathogens and Microorganisms of Industrial Importance. *Antibiotics* 7, 90. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040090>
48. Onac, B.P., Persoiu, A., Racovita, G., Tamas, T., Viehmann, I., 2007. Scarisoara. Geology Faculty Publications, Cluj-Napoca.
49. Pan, S., Tan, G., Convey, P., Pearce, D., Tan, I., 2013. Diversity and bioactivity of actinomycetes from Signy Is-land terrestrial soils, maritime Antarctic. *Adv. Polar Sci.* 24, 208. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1085.2013.00208>
50. Paun, V.I., Icaza, G., Lavin, P., Marin, C., Tudorache, A., Perşoiu, A., Dorador, C., 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01193>
51. Paun, V.I., Lavin, P., Chifiriuc, M.C., Purcarea, C., 2021. First report on antibiotic resistance and antimicrobial activity of bacterial isolates from 13,000-year old cave ice core. *Sci. Rep.* 11, 514. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79754-5>
52. Perron, G.G., Whyte, L., Turnbaugh, P.J., Goordial, J., Hanage, W.P., Dantas, G., Desai, M.M., 2015. Functional Characterization of Bacteria Isolated from Ancient Arctic Soil Exposes Diverse Resistance Mechanisms to Modern Antibiotics. *PLOS ONE* 10, e0069533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069533>
53. Persoiu, A., Onac, B.P., Wynn, J.G., Blaauw, M., Ionita, M., Hansson, M., 2017. Holocene winter climate variability in Central and Eastern Europe. *Sci. Rep.* 7, 1196. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01397-w>
54. Persoiu, A., Onac, B.P., Wynn, J.G., Bojar, A.-V., Holmgren, K., 2011. Stable isotope behavior during cave ice formation by water freezing in Scărişoara Ice Cave, Romania. *J. Geophys. Res.* 116, D02111. <https://doi.org/10.1029/2010JD014477>
55. Persoiu, A., Pazdur, A., 2011. Ice genesis and its long-term mass balance and dynamics in Scărişoara Ice Cave, Romania. *The Cryosphere* 5, 45–53. <https://doi.org/10.5194/tc-5-45-2011>
56. Popa, Radu, Smith, A.R., Popa, Rodica, Boone, J., Fisk, M., 2012. Olivine-Respiring Bacteria Isolated from the Rock-Ice Interface in a Lava-Tube Cave, a Mars Analog Environment. *Astrobiology* 12, 9–18. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0639>
57. Price, P.B., Sowers, T., 2004. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 4631–4636. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400522101>
58. Priscu, J.C., Christner, B.C., 2004. Earth's Icy Biosphere, in: Bull, A.T. (Ed.), *Microbial Diversity and Bioprospecting*. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 130–145. <https://doi.org/10.1128/9781555817770.ch13>
59. Purcarea, C., 2018. Microbial Life in Ice Caves, in: *Ice Caves*. Elsevier, pp. 173–187. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811739-2.00008-5>

60. Racovita, G., Onac, B.P., 2000. Scărișoara glacier cave: monographic study. Ed. Carpatica, Cluj-Napoca.
61. Rampelotto, P., 2013. Extremophiles and Extreme Environments. *Life* 3, 482–485. <https://doi.org/10.3390/life3030482>
62. Rodrigues, D.F., da C Jesus, E., Ayala-del-Río, H.L., Pellizari, V.H., Gilichinsky, D., Sepulveda-Torres, L., Tiedje, J.M., 2009. Biogeography of two cold-adapted genera: *Psychrobacter* and *Exiguobacterium*. *ISME J.* 3, 658–665. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.25>
63. Rothschild, L.J., Mancinelli, R.L., 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>
64. Siddiqui, K.S., 2015. Some like it hot, some like it cold: Temperature dependent biotechnological applications and improvements in extremophilic enzymes. *Biotechnol. Adv.* 33, 1912–1922. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.11.001>
65. Tebo, B.M., Davis, R.E., Anitori, R.P., Connell, L.B., Schiffman, P., Staudigel, H., 2015. Microbial communities in dark oligotrophic volcanic ice cave ecosystems of Mt. Erebus, Antarctica. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00179>
66. Thi, T.D., Lopez, E., Rodriguez-Rojas, A., Rodriguez-Beltran, J., Couce, A., Guelfo, J.R., Castaneda-Garcia, A., Blazquez, J., 2011. Effect of *recA* inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 531–538. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq496>
67. Vila, E., Hornero-Méndez, D., Azziz, G., Lareo, C., Saravia, V., 2019. Carotenoids from heterotrophic bacteria isolated from Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Biotechnol. Rep.* 21, e00306. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00306>
68. Welter, D.K., Ruaud, A., Henseler, Z.M., De Jong, H.N., van Coeverden de Groot, P., Michaux, J., Gormezano, L., Waters, J.L., Youngblut, N.D., Ley, R.E., 2021. Free-Living, Psychrotrophic Bacteria of the Genus *Psychrobacter* Are Descendants of Pathobionts. *mSystems* 6, e00258-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00258-21>
69. Wietz, M., Månsson, M., Bowman, J.S., Blom, N., Ng, Y., Gram, L., 2012. Wide Distribution of Closely Related, Antibiotic-Producing *Arthrobacter* Strains throughout the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2039–2042. <https://doi.org/10.1128/AEM.07096-11>
70. Williams, T.J., Wilkins, D., Long, E., Evans, F., DeMaere, M.Z., Raftery, M.J., Cavicchioli, R., 2013. The role of planktonic Flavobacteria in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. *Environ. Microbiol.* 15, 1302–1317. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12017>
71. Yadav, A.N., Verma, P., Kumar, V., Sachan, S., Saxena, A., 2017. Extreme Cold Environments: A Suitable Niche for Selection of Novel Psychrotrophic Microbes for Biotechnological Applications. *Adv. Biotechnol. Microbiol.* 2. <https://doi.org/10.19080/AIBM.2017.02.555584>
72. Yuan, M., Yu, Y., Li, H.-R., Dong, N., Zhang, X.-H., 2014. Phylogenetic Diversity and Biological Activity of Actinobacteria Isolated from the Chukchi Shelf Marine Sediments in the Arctic Ocean. *Mar. Drugs* 12, 1281–1297. <https://doi.org/10.3390/md12031281>
73. Zada, S., Sajjad, W., Rafiq, M., Ali, S., Hu, Z., Wang, H., Cai, R., 2021. Cave Microbes as a Potential Source of Drugs Development in the Modern Era. *Microb. Ecol.* <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01889-3>
74. Zarnea, G., Popescu, O., 2011. Dictionar de microbiologie generala si biologie moleculara. Editura Academiei Romane, Bucuresti.

75. Zeng, Y.-X., Yu, Y., Liu, Y., Li, H.-R., 2016. *Psychrobacter glaciei* sp. nov., isolated from the ice core of an Arctic glacier. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1792–1798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000939>
76. Zgonik, V., Mulec, J., Eleršek, T., Ogrinc, N., Jamnik, P., Ulrih, N.P., 2021. Extremophilic Microorganisms in Central Europe. *Microorganisms* 9, 2326. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112326>