

**UNIVERSITATEA BABEȘ–BOLYAI**  
**FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ**

**Teză de doctorat**

**COMUNITĂȚI MICROBIENE TERMOFILE DIN MEDII  
GEOTERMALE LOCALIZATE ÎN CÂMPIA DE VEST A  
ROMANIEI**

**- Rezumat -**

**Conducător științific**

**PROF. DR. NICOLAIE DRAGOȘ**

**Doctorand**

**CHIRIAC MARIA CECILIA**

**CLUJ-NAPOCA**

**2018**

## Cuprins

|  |    |
|--|----|
| Lista abrevierilor.....  | 6  |
| Mulțumiri.....   | 7  |
| I. Ecologia organismelor termofile și potențialul lor biotehnologic.....                         | 8  |
| I.1 De ce sunt organismele termofile importante? .....   | 8  |
| I.1.1 Originea și limitele fiziologice ale vieții .....  | 8  |
| I.1.2 Aplicațiile termofilelor în biotehnologii.....   | 9  |
| I.2 Mecanisme de adaptare la temperaturi ridicate.....   | 11 |
| I.3 Biodiversitatea în medii geotermale.....   | 13 |
| I.3.1 Zonele geotermale.....   | 14 |
| I.3.2 Biogeografia speciilor termofile .....   | 16 |
| I.4 Biodiversitatea în biosfera continentală de mare adâncime .....                              | 20 |
| I.4.1 SLiMEs - Ecosisteme microbiene subterane litoautotrofe.....                                | 22 |
| I.4.2 Diversitatea procariotelor în biosfera continentală de mare adâncime .....                 | 22 |
| I.5 Comunitățile microbiene sedimentare și microbialitele.....                                   | 23 |
| I.5.1 Dovezile geologice privind vârsta microbialitelor .....                                    | 24 |
| I.5.2 Litificarea comunităților microbiene sedimentare .....                                     | 27 |
| I.5.3 Compoziția comunităților microbiene sedimentare în relație cu procesul de litificare ..... | 28 |
| I.6 Metode de studiu a biodiversității în medii termale .....                                    | 35 |
| I.6.1 Metode dependente de culturi și microscopie .....  | 35 |
| I.6.2 Metode tradiționale independente de culturi.....   | 36 |
| I.6.3 Secvențializarea parțială a genei pentru ARNr 16S prin NGS .....                           | 39 |
| I.6.4 Era ‘-omică’ .....   | 40 |
| I.6.5 Perspective în studiul organismelor termofile .....  | 42 |
| I.7 Concluzii.....   | 43 |
| II. Scopul tezei.....  | 44 |
| III. Materiale și metode.....  | 45 |
| III.1 Materiale și metode folosite pentru apele geotermale de mare adâncime.....                 | 45 |
| III.1.1 Colectarea probelor.....   | 45 |
| III.1.2 Extracția ADN .....  | 46 |
| III.1.3 PCR cantitativ (qPCR) .....  | 47 |
| III.1.4 Analiza diversității microbiene .....  | 48 |
| III.1.5 Analiza ampliconilor .....   | 48 |
| III.1.6 Analiza statistică a datelor.....  | 49 |
| III.1.7 Predicția potențialului funcțional .....   | 49 |

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>III.2</b> | <b>Materiale și metode folosite pentru investigarea microbialitelor .....</b>   | <b>51</b> |
| III.2.1      | Descrierea depozitelor de carbonat și colectarea probelor.....  | 51        |
| III.2.2      | Microscopia cu lumină polarizată și Microscopia electronică de baleiaj (SEM).....   | 51        |
| III.2.3      | Analiza mineralogică prin difracție în raze X (XRD) .....   | 51        |
| III.2.4      | Extracția ADN .....   | 53        |
| III.2.5      | PCR cantitativ (RT-qPCR) și analiza datelor.....  | 53        |
| III.2.6      | Secvențializarea, filtrarea calitativă și analiza datelor de secvențializare Illumina.....  | 54        |
| III.2.7      | Analiza filogenetică .....  | 56        |
| <b>III.3</b> | <b>Materiale și metode folosite pentru investigarea probelor de comunități microbiene sedimentare din mediile termale.....</b>    | <b>57</b> |
| III.3.1      | Colectarea probelor.....  | 57        |
| III.3.2      | Extracția acizilor nucleici .....   | 59        |
| III.3.3      | Purificarea ARN și sinteza de ADNc .....  | 60        |
| III.3.4      | Cuantificarea abundenței celulelor procariote prin qPCR .....   | 61        |
| III.3.5      | Prepararea bibliotecilor de secvențializare.....  | 61        |
| III.3.6      | Analiza ampliconilor .....  | 61        |
| III.3.7      | Analiza statistică.....   | 62        |
| III.3.8      | Predicția diversității funcționale.....   | 62        |
| <b>III.4</b> | <b>Materiale suplimentare.....</b>  | <b>63</b> |
| III.4.1      | Purificarea de ADN cu kitul ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™ (ZymoResearch) .....  | 63        |
| III.4.2      | Îndepărtarea urmelor de ADN din probele de ARN cu kitul TURBO DNA-free™ (Thermo Fisher Scientific).....                           | 63        |
| III.4.3      | Sinteza de ADNc cu kitul First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific).....  | 64        |
| III.4.4      | Purificarea ampliconilor PCR din gelul de agaroză cu kitul GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) .....            | 64        |
| III.4.5      | Clonarea ampliconilor PCR (gena pentru ARNr 16S) utilizând kitul InsTAclone PCR (Thermo Fisher Scientific).....                   | 65        |
| III.4.6      | Prepararea celulelor competente <i>Escherichia coli</i> JM109 (Promega).....  | 65        |
| III.4.7      | Transformarea și cultivarea celulelor competente <i>Escherichia coli</i> JM109 (Promega)..  | 65        |
| III.4.8      | Purificarea plasmidelor cu kitul GeneJET plasmid miniprep (Thermo Fisher Scientific) .....  | 66        |
| III.4.9      | Cuantificarea ADN cu kiturile Qubit® dsDNA BR (Broad Range) și Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) (Thermo Fisher Scientific)..... | 66        |
| III.4.10     | Cuantificarea ARN cu kitul Qubit® RNA BR (Broad Range) (Thermo Fisher Scientific) .....   | 67        |
| III.4.11     | Purificarea ampliconilor PCR cu kitul QIAquick PCR (Qiagen).....  | 68        |

|  |            |
|--|------------|
| III.4.12 Cuantificarea bibliotecii de secvențializare cu kitul PerfeCTa® NGS Library<br>Quantification Kit for Illumina® Sequencing Platforms (Quanta Biosciences) ..... | 68         |
| <b>IV. Rezultate și discuții.....</b>  | <b>70</b>  |
| <b>IV.1 Acviferele de mare adâncime: Panonian și Triasic .....</b>   | <b>70</b>  |
| IV.1.1 Descrierea acviferelor.....   | 70         |
| IV.1.2 Abundența genelor bacteriene pentru ARNr 16S.....   | 71         |
| IV.1.3 Structura comunității procariotice .....  | 72         |
| IV.1.4 Diversitatea procariotelor .....  | 77         |
| IV.1.5 Predicția diversității funcționale .....  | 81         |
| IV.1.6 Concluzii .....   | 83         |
| <b>IV.2 Structura, mineralogia și diversitatea microbială în microbialitele dezvoltate în apropierea<br/>    forajului geotermal de la Ciocaia .....</b>                 | <b>84</b>  |
| IV.2.1 Condițiile geologice și mineralogia depozitelor de carbonat .....   | 84         |
| IV.2.2 Interacțiunile dintre cristalele de carbonat și comunitatea microbială.....   | 86         |
| IV.2.3 Abundența și diversitatea microbială.....   | 87         |
| IV.2.4 Abundența microbială în depozitele de carbonat .....  | 88         |
| IV.2.5 Diversitatea domeniului Archaea în probele de carbonat .....  | 89         |
| IV.2.6 Diversitatea microbială și structura comunității bacteriene .....   | 91         |
| IV.2.7 Grupuri bacteriene specifice și nespecifice pentru microbialite observate în depozitele<br>de la Ciocaia.....   | 94         |
| IV.2.8 Predicția diversității funcționale și posibile mecanisme implicate în formarea<br>depozitelor de carbonat .....   | 95         |
| IV.2.9 Concluzii .....   | 99         |
| <b>IV.3 Diversitatea microbială din comunitățile microbiene sedimentare nemineralizate și factorii<br/>    care o influențează .....</b>                                 | <b>100</b> |
| IV.3.1 Abundența genelor și a produșilor de transcriere pentru ARNr 16S.....   | 100        |
| IV.3.2 Comunitatea microbială relevată prin secvențializarea genei pentru ARNr 16S .....   | 101        |
| IV.3.3 Specii indicatoare în comunitățile microbiene sedimentare nemineralizate .....  | 106        |
| IV.3.4 Compararea bibliotecilor de ADN vs. ADNc și predicția funcțională .....   | 107        |
| IV.3.5 Alpha- și beta-diversitatea .....   | 111        |
| IV.3.6 Concluzii.....  | 117        |
| <b>V. Concluzii generale.....</b>  | <b>119</b> |
| <b>VI. Perspective.....</b>  | <b>121</b> |
| <b>Bibliografie.....</b>   | <b>122</b> |
| <b>Lista lucrărilor științifice incluse în teză.....</b>   | <b>145</b> |
| <b>Lista lucrărilor științifice neincluse în teză.....</b>   | <b>146</b> |
| <b>Lista participărilor la conferințe.....</b>   | <b>147</b> |

## **Lista abrevierilor**

ATP - Adenozin trifostat

BAC - Cromosom bacterian artificial

ADNc - ADN complementar

cDPG - 2,3-difosfoglicerat ciclic

CoA - Coenzima A

CRISPR - ” *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*”

dNTP / ddNTP - Deoxinucleotide / Dideoxinucleotide

EPS - Substanțe polimerice extracelulare

GC-MS - Cromatograf de gaze cuplat cu spectrometru de masă

HGT – Transfer orizontal de gene

HSP - Proteine de șoc termic

MDA - ” *Multiple strand displacement amplification*”

NAD(P) - Nicotinamid adenin dinucleotid fosfat

NGS - Secvențializarea de nouă generație

OGT - Temperatura optimă de creștere

OLC - ” *Overlap layout consensus*”

OTU - Unitate taxonomică operațională

pb / Mpb - Perechi de baze / Mega perechi de baze

PCR - Reacția în lanț a polimerazei

SEM - Microscopie electronică de baleiaj

SOB - Bacterii sulf-oxidative

SRB - Bacterii sulfat-reducătoare

Transportori ABC – Transportori cu casete de legare a ATP

XRD - Difracție în raze X

YNP - Parcul Național Yellowstone

## **Cuvinte cheie**

Organisme termofile, acvifere hipertermale, diversitate microbiană, pattern de diversitate, microbialite, comunități bacteriene sedimentare.

## I. De ce sunt importante organismele termofile?

Organismele termofile și hipertermofile sunt acele organisme care cresc la temperaturi mai mari de 55 °C și respectiv 80 °C (Urbieta și colab., 2015). Ele atrag atenția oamenilor de știință în principiu din două motive: i) pentru că oferă informații despre începutul vieții pe Pământ și ii) pentru că pot fi folositoare în diverse biotehnologii (Ferrera și Reysenbach, 2007; Urbieta și colab., 2015). În această teză a fost folosită secvențializarea de nouă generație (NGS) pentru a se caracteriza prin metabarcoding diversitatea microbiană din două acvifere hipertermale din Câmpia de Vest a României, precum și biodiversitatea microbialitelor și a comunităților microbiene sedimentare nemineralizate ce s-au dezvoltat în preajma unor foraje termale.

### I.1.1 Originea și limitele fiziologice ale vieții

În cea mai mare parte a istoriei Pământului, condițiile de pe el au fost foarte diferite față de ce observăm în prezent. Se consideră că în primele 200 de milioane de ani temperaturile de la suprafața Pământului depășeau 100°C, ceea ce făcea imposibilă acumularea apei lichide. Viața a început să se dezvolte când temperaturile au început să scadă, dar aceasta s-a întâmplat tot la temperaturi ridicate (Djokic și colab., 2017). Ca urmare, primele organisme au fost cel mai probabil termofile sau cel puțin termotolerante (Stan-Lotter, 2017). Această ipoteză e validată de arborele filogenetic universal, contruit pe baza secvenței genei ce codifică subunitatea mică ribosomală, în care organismele termofile au fost plasate la baza arborelui (Stetter, 2006). Pe lângă aceasta, organismele termofile sunt în mare parte anaerobe și pot crește prin chemolitotrofie, caracteristici care le fac buni candidați pentru viața pe o planetă a cărei atmosferă e lipsită de oxigen iar activitatea vulcanică e intensă (Ferrera și Reysenbach, 2007). În prezent, pe Pământ sunt rar întâlnite medii cu temperaturi mai mari de 55 °C, iar acestea sunt în general asociate activităților geotermale. Astfel, a fost definită o limită a termofilicității între 55 - 60 °C, limită peste care cresc organismele termofile (Brock, 1986). În urmă cu doar câteva decenii se credea că viața la temperaturi mai mari de 100 °C este imposibilă. Totuși, atunci când astfel de temperaturi sunt însoțite și de presiuni ridicate, viața dependentă de apa lichidă poate fi întâlnită și la 122 °C, precum în cazul speciei *Methanopyrus kandleri* (Takai și colab., 2008). Chiar dacă unele termozime purificate și-au păstrat activitatea la 130 °C, nu s-a identificat încă vreun organism care să crească la această temperatură (Lévêque et al., 2000). O posibilă explicație poate fi aceea că la 130 °C, anumiți compuși cu masa moleculară mică, precum ATP și

NAD, sunt rapid hidrolizați, iar unii aminoacizi termolabili, ca glutamatul și cisteina, sunt descompuși (Stetter, 1999).

### **II.1.2 Aplicații biotehnologice ale organismelor termofile**

Aplicațiile termofilelor pot fi clasificate în aplicații ale culturilor de celule și aplicații ale macromoleculilor sau ale unor metaboliți sintetizați de acestea. Multe procese tehnologice au loc la temperaturi ridicate, iar utilizarea termofilelor și a termozimelor prezintă câteva avantaje, precum: 1) funcționarea la rate ridicate de producție; 2) eliminarea pașilor de răcire; 3) realizarea reacțiilor la aceeași temperatură la care substraturile sunt solubile; 4) eliminarea/limitarea contaminării cu specii mezofile (Ferrera și Reysenbach, 2007; Urbietta și colab., 2015). Câteva domenii în care organismele termofile sunt importante ar fi producerea de biocombustibili, biomineritul, bioremedierea și sinteza termozimelor (Urbietta și colab., 2015).

### **II. Adaptările organismelor la temperaturi ridicate**

Viața presupune reacții metabolice complexe între macromoleculile și produși intermediari, de aceea adaptarea la temperaturi ridicate nu poate fi datorată unei singure trăsături fiziologice sau moleculare (Urbietta și colab., 2015). În ce privește mărimea genomurilor, s-a observat că speciile termofile au în general spații intergenice mai mici, și deci genomuri mai compacte (Sabath și colab., 2013). O altă strategie ar putea consta într-o proporție mai mare de baze azotate GC în genom, ceea ce le-ar conferi o mai bună termostabilitate (Urbietta și colab., 2015). Chiar dacă această situație a fost observată în cazul speciei *Methanopyrus kandleri* (Ferrera și Reysenbach, 2007), nu este o soluție general aplicată. Spre exemplu, *Candidia* spp. și *Methanotorris* spp., două organisme termofile, au un conținut GC de 30% și respectiv 32%, pe când *Escherichia coli* are o proporție GC de 50.7% (Trivedi și colab., 2005). Totuși, conținutul de GC al genelor esențiale pentru supraviețuire, cum ar fi cele ce codifică ARNr 16S și diferite ARNt, este un bun indicator al termofilicității (Ferrera și Reysenbach, 2007; Urbietta și colab., 2015). Apoi, structura ADN și a proteinelor poate fi stabilizată prin acumularea unor compuși, precum cDPG, trehaloza (Martins și colab., 1997), HSPs, șaperoane și șaperonine, aglutine, spermidine etc. (Urbietta și colab., 2015). Nu s-a observat niciun mecanism universal aplicat în ce privește creșterea termostabilității proteinelor, dar un număr crescut de aminoacizi hidrofobi sau cu grupări polare, reducerea buclelor exterioare și un număr ridicat de proteine intracelulare cu punți disulfidice au fost raportate (Beeby și colab., 2005). Mai mult, temperaturile mari afectează fluiditatea membranelor, iar speciile termofile își modifică compoziția lipidică a membranelor

pentru a le menține permeabilitatea și potențialul membranar. Ele au în compoziție mai mulți acizi grași saturați decât speciile mezofile sau psihrofile, ceea ce le conferă o hidrofobicitate ridicată care le stabilizează membrana la temperaturi ridicate. În plus, membrana plasmatică e adesea sub forma unui singur strat, ceea ce le crește stabilitatea și protejează împotriva hidrolizei la temperaturi mari.

## **II.3 Biodiversitatea în medii geotermale**

### **II.3.1 Zone geotermale**

Zonele geotermale sunt rare și pot fi văzute ca niște "insule" separate de distanțe geografice mari. Ele sunt în general asociate cu activitatea vulcanică de-a lungul marginilor plăcilor tectonice, arii în care plăcile tectonice se ciocnesc și se transformă (Hreggvidson și colab., 2017). Zonele geotermale variază din punct de vedere geochemic, dar sunt adesea clasificate în funcție de pH lor, în medii acide și neutru-alkaline, aceasta depinzând de sursa de căldură (Hreggvidson și colab., 2017; Kristjanssos și Hreggvidson, 1995). Cele cu pH scăzut sunt asociate cu activitatea vulcanică, unde gazele vulcanice sunt în general alcătuite din  $N_2$ ,  $CO_2$  și  $H_2S$ . Când  $H_2S$  e un component major, sulfatul și sulfitul se dizolvă în apa termală. În subteran, pH fluxului gazos este aproximativ neutru, dar cu cât se apropie de suprafață, este chimic sau biologic oxidat, rezultând în formarea acidului sulfuric. La punctul de ieșire la suprafață, temperaturile sunt foarte ridicate, ceea ce rezultă în evaporarea apei și acumularea acidului sulfuric în nămoluri și soluri sulfatice cu un pH între 2 - 2.5 (Hreggvidson și colab., 2017). În asemenea condiții, disponibilitatea sulfitului, sulfurii și  $H_2$  susțin creșterea organismelor autotrofe ce produc materia organică pentru heterotrofe termoacidofile (Stetter, 1986).

Izvoarele termale alcaline și gheizerele sunt situate în afara zonelor cu vulcani activi. Acestea sunt geologic mai stabile iar sursa constantă și abundentă de apă conține minerale ( $SiO_2$ ) și gaze dizolvate ( $HCO_3^- / CO_3^{2-}$ ).  $H_2S$  este în general în cantități reduse, iar pH este între 7 - 10. Radiar în jurul izvoarelor se crează gradient de temperatură, pH, surse de electroni etc., generându-se nișe pentru o varietate de organisme (Hreggvidsson și colab., 2017; Kristjanssos și Hreggvidsson, 1995). La temperaturi mai mici de  $74^\circ C$  se pot dezvolta comunități fototrofe dense (Ward și Castenholz, 2000), ale căror biomasă reprezintă o sursă bogată de nutrienți pentru alte termofile heterotrofe. Mai multe detalii referitoare la formarea și dezvoltarea unor



comunități microbiene sedimentare mineralizate și nemineralizate se vor prezenta în următoarele secțiuni.

### **II.3.2 Biogeografia speciilor termofile**

Se consideră că diversitatea microbiană din zonele termale este influențată de gradientele de temperatură, pH, disponibilitatea diferitelor specii de donori și acceptori de electroni, și că comunitățile din diferite zone geografice ar fi similare dacă și parametrii fizico-chimici sunt similari (Menzel și colab., 2015; Inskeep și colab., 2010). Multe specii termofile și hipertermofile au o distribuție largă, precum cele din genurile *Thermus*, *Thermoplasma*, *Bacillus* sau *Hydrogenobacter*. Totuși, alte specii sunt endemice sau ecotipuri diferite populează zone distincte de pe Glob. Un astfel de exemplu este specia sulfat-reducătoare *Sulfolobus islandicus*, care trăiește în izvoare sulfatarice cu un pH de 3 și o temperatură de 80°C în toată emisfera nordică (Whitaker și colab., 2003). S-au izolat reprezentanți ai acestei specii din Rusia, SUA și Islanda, secvențializându-se 9 gene din fiecare izolat. Pe seama acestor secvențe s-a construit un arbore filogenetic din care s-a observat că izolarea geografică este principalul factor responsabil de patternul de distribuție al speciei.

#### **II.3.2.1 Dispersia speciilor termofile**

Pentru că distanțele dintre zonele geotermale sunt în general mari, migrarea dintr-o zonă în alta e puțin probabilă. Condițiile din jurul ariilor geotermale sunt diferite mai ales din punct de vedere termic, și pot fi nefavorabile organismelor termofile, acționând ca o barieră pentru dispersia speciilor. Dispersia pe calea aerului e facilitată de abilitatea termofilelor de a rezista desicării sau de a forma spori de rezistență. *Geobacillus*, un grup de termofile formatoare de spori, are o distribuție globală, spre deosebire de speciile genului *Synochococcus* care e endemic pentru anumite zone. Acesta din urmă este sensibil la variația condițiilor de mediu, probabil ca un compromis pentru adaptarea la temperaturi ridicate (Hreggvidsson și colab., 2017; Miller și Castenholz, 2000).

### **II.4 Biodiversitatea în biosfera continentală de mare adâncime**

Dacă se ține cont de gradientul geotermic (8 - 30°C/km), viața ar trebui să fie posibilă până la adâncimi cuprinse între 2 - 12 km sub suprafața terestră. Multe dintre studiile realizate până în prezent au fost axate pe izvoarele hidrotermale de mare adâncime (din engl. *hydrothermal vents*) ce sunt dominate de organisme chemolitotrofe, sau pe sedimente marine ale căror ecosisteme se bazează pe substanțele organice rezultate prin fotosinteză. Prin

contrast, relativ puține studii au raportat biodiversitatea din acvifere continentale de mare adâncime, dar acestea includ acvifere din Scandinavia (Itävaara și colab., 2011; Pedersen, 2000; Hubalek și colab., 2016; Purkamo și colab., 2016), Bazinul Witwatersrand din Africa de Sud (Onstott și colab., 2006) sau acviferul bazaltic Columbia River (Stevens și McKinley, 1995).

#### **II.4.1 SLiMEs - Ecosisteme microbiene subterane litoautotrofe**

Organismele ce trăiesc în biosfera de mare adâncime, la temperaturi ridicate, pot deseori să folosească  $H_2$  ca sursă de energie (Nealson și colab., 2005). În unele studii s-a arătat că procariotele chemolitoautotrofe pot îndeplini rolul de producători primari în ecosisteme precum fânza freatică ce alimentează izvorul termal Liddy, SUA (Chapelle și colab., 2002) sau bazinul Witwatersrand, Africa de Sud (Chivian și colab., 2008). Procesele care duc la generarea de  $H_2$  includ oxidarea silicaților (Stevens și McKinley, 2000), radioliza apei (Lin și colab., 2006) și serpentinizarea rocilor ultramafice (Schrenk și colab., 2013; Purkamo și colab., 2016). Din  $H_2$  obținut și din hidrocarburi cu lanț scurt de atomi de carbon se poate sintetiza  $CH_4$  (Sherwood-Lollar, 2007). Deși acești compuși pot susține unele ecosisteme, acestea sunt de obicei compuse dintr-un număr redus de specii, dominante fiind cele metanogene și SRB (Kieft, 2016).

#### **II.4.2 Diversitatea procariotelor în biosfera continentală de mare adâncime**

Deoarece geologia scoarței terestre este foarte variată, la fel sunt și comunitățile microbiene care o populează (Kieft, 2016). Comunități metabolic active au fost întâlnite în pânza freatică ce alimentează izvorul termal Liddy, SUA, unde organismele metanogene erau dominante (Chapelle și colab., 2002), sau în apele subterane de mare adâncime din Africa de Sud, unde a fost întâlnit un singul organism sulfat reducător aparținând filumului Firmicutes (Lin și colab., 2006). O comunitate microbială puțin mai complexă a fost raportată în Marele Bazin Artesian din Australia, în care organisme din trei genuri au fost dominante: *Methanospirillum*, *Thermodesulfobivrio* și *Hydrogenobacter* (Kimura et al., 2005). Acest acvifer termal depozitează apă cu o vechime de până la 2 milioane de ani și are o temperatură de aproximativ 64°C. Acvifere similare din punct de vedere al vechimii depozitelor de apă, și cu grade diferite de conectivitate cu suprafața, se află pe teritoriul României (Țenu, 1981). În această teză s-a investigat diversitatea microbială din două acvifere hipertermale din România și s-a urmărit modul în care infiltrarea apei meteorice influențează biodiversitatea în subteran.

## II.5 Comunitățile microbiene sedimentare și microbialitele

Aceste comunități microbiene se dezvoltă la suprafața unor suporturi solide cum ar fi sedimentele, în jurul izvoarelor termale sau în medii hipersaline (Stal, 2012; Bolhuis și colab., 2014). Comunitățile microbiene sedimentare au o structură stratificată dată de dispunerea microorganismelor cu diferite roluri funcționale. Uneori, structura poate să fie biomineralizată, caz în care microorganismele determină/influențează precipitarea unui mineral, în general calcitul. Structuri mineralizate de acest fel datează de aproximativ 3.5 miliarde de ani, ceea ce a condus la formularea ipotezei ce susține că microbialitele moderne sunt structuri analoage stromatolitelor Precambriene (Stal, 2012; Vasconcelos și colab., 2006).

### II.5.1 Compoziția și litificarea comunităților microbiene sedimentare

Microbialitele sunt organominerale rezultate din interacțiunea comunității microbiene cu mediul ambiant. Mineralizarea acestor structuri poate fi biologic indusă?nu invers-”indusa biologic/ influentata biologic”? sau biologic influențată. Mineralizarea indusă biologic presupune precipitarea mineralului ca rezultat direct al activității microbiene, pe când mineralizarea influențată biologic se referă la mineralizarea pasivă a materiei organice, în principiu ca rezultat al factorilor de mediu, precum pH ridicat, mai degrabă decât al metabolismului celular (Dupraz și colab., 2009). Comunitățile microbiene sedimentare au capacitatea să direcționeze echilibrul spre forme mai reduse sau oxidate ale carbonului (materie organică vs. CO<sub>2</sub>). CO<sub>2</sub> dizolvat în apă formează acidul carbonic (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), care, în funcție de pH apei poate lega diferiți cationi formând minerale carbonatice. Așa cum cationii prezenți în mediu pot varia, tot așa variază și mineralul precipitat, rezultând calcit/aragonit (CaCO<sub>3</sub>), magnezit (MgCO<sub>3</sub>), dolomit (CaMg(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), stronțianit (SrCO<sub>3</sub>) etc. (Dupraz și colab., 2009). În general, comunitățile microbiene sedimentare sunt formate din 5 -7 grupuri funcționale care cooperează pentru a realiza ciclul complet al elementelor majore (C, O, N și S). Aceste grupuri funcționale includ: 1) organismele fotolitoautotrofe (ex. cianobacteriile); 2) organisme chemoorganoheterotrofe aerobe; 3) organisme fermentative; 4) organisme heterotrofe anaerobe (ex. SRB), 5) SOB; 6) fototrofe anoxigenice (bacterii sulfuroase/nesulfuroase purpurii și verzi); 7) organisme metanogene.

În afara factorilor fizico-chimici care pot influența mineralizarea, diferite grupuri funcționale promovează precipitarea mineralelor prin creșterea alcalinității mediului, altele duc la dizolvarea mineralelor prin generarea de acizi organici (Visscher și Stolz, 2005). Fluctuațiile sezoniere lipsesc în mediile termale, iar schimbările în intensitatea luminoasă sunt printre

singurele întâlnite. În aceste habitate, diversitatea și complexitatea comunităților microbiene sunt în principal determinate de temperatură (Miller și colab., 2009). La temperaturi ridicate, producția primară e deseori atribuită SOB, iar la temperaturi mai scăzute acest rol e îndeplinit de fototrofe oxigenice și anoxigenice (ex. Cyanobacteria, Chloroflexi, *Chlorobium*). Prin metabolismul lor, aceste organisme susțin dezvoltarea și diversificarea comunității microbiene sedimentare (Bolhuis și colab., 2014).

În cazul comunităților microbiene care se dezvoltă la temperaturi relativ scăzute, cianobacteriile fotosintetizante contribuie la precipitarea  $\text{CaCO}_3$  (Visscher și Stolz, 2005; Stal, 2012). Fixarea oxigenică a  $\text{CO}_2$  rezultă în creșterea pH ambiental, uneori la valori mai mari de 10, și în producerea ionului bicarbonic. Fotosinteza anoxigenică realizată de bacteriile sulfuroase verzi și purpurii rezultă în generarea de  $\text{HS}^-$ , iar oxidarea lui duce la scăderea alcalinității mediului. Per ansamblu, metabolismul acestora produce un mol de  $\text{CaCO}_3$  per mol de  $\text{H}_2$  oxidat (Visscher și Stolz, 2005). Chemolitoautotrofia este susținută de compusi ca  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{Fe}_2^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  și  $\text{HS}^-$ . SOB sunt abundente în mediile termale sulfatice, iar prin metabolismul lor duc la dizolvarea  $\text{CaCO}_3$ . De asemenea, organismele chemoorganoheterotrofe duc la dizolvarea unui mol de  $\text{CaCO}_3$  la fiecare mol de  $\text{CH}_2\text{O}$  oxidat (Visscher și Stolz, 2005). Ca urmare, fotosinteza și reducerea sulfatului promovează precipitarea  $\text{CaCO}_3$  și litifierea comunității, iar respirația aerobă și oxidarea sulfului rezultă în pierderea mineralului (Visscher și Stolz, 2005).

## **II.6 Metode de studiu a biodiversității mediilor termale**

Pentru o perioadă, tehnicile dependente de culturi au fost folosite pentru caracterizarea diversității microbiene din probele de mediu, dar mai apoi s-a înțeles că mai puțin de 10% din speciile existente pot fi cultivate în laborator. Ca urmare, s-a apelat la tehnici independente de culturi, care vizau inițial amplificarea genei pentru ARNr 16S din probe de ADN metagenomic. Mai apoi, au fost dezvoltate tehnicile NGS, iar biodiversitatea a început să fie investigată prin metabarcoding și secvențializare shotgun, permițând caracterizarea genomurilor și transcriptomurilor unor specii individuale dar și al întregii comunități. Probabil că în viitor biodiversitatea comunităților termale se va analiza prin manipularea individuală a celulelor urmată de secvențializarea completă a genomului, prin metagenomică funcțională și metabolomică, prin studiul metagenomurilor virale etc. (Urbietta și colab., 2015).

### **III. Scopul tezei**

În această teză s-a urmărit caracterizarea biodiversității în trei tipuri de medii termale prin NGS, pentru a se descrie:

i) patternul diversității microbiene din două acvifere hipertermale din Câmpia de Vest a României. De asemenea, s-a investigat impactul parametrilor fizico-chimici și rolul conectivității cu ecosistemele de la suprafață în conturarea biodiversității.

ii) compoziția depozitelor de carbonat din preajma forajului de la Ciocaia și caracterizarea diversității microbiene ce ar putea influența mineralizarea.

iii) relațiile dintre parametrii fizico-chimici ai apelor geotermale și diversitatea procariotelor din comunități microbiene sedimentare nemineralizate dezvoltate în jurul a trei foraje.

### **IV. Materiale și metode**

#### **IV.1 Colectarea și procesarea probelor**

a) S-au colectat probe de apă termală în duplicat de la 11 foraje, în sticle de 2 l. Apa colectată de la fiecare foraj s-a filtrat pe 3 filtre sterile de nitroceluloză cu dimensiunea porilor de 0.22 μm (Fioroni, Franța) până la colmatarea filtrelor.

b) S-au colectat probe din trei microbialite, fiecare din ele formându-se la o temperatură specifică (32°C, 49°C și 65°C). Pentru extracția de ADN s-au colectat aproximativ 3 cm<sup>3</sup> din fiecare deposit mineral în tuburi Falcon sterile de 50 ml, și s-au imersat în azot lichid. Pentru analiza mineralogică și SEM s-au colectat în duplicat aproximativ 5 cm<sup>3</sup> din fiecare microbialit și s-au depozitat în cutii Petri.

c) S-au colectat în triplicat aproximativ 3 g din comunitățile microbiene sedimentare nemineralizate în tuburi Falcon de 15 ml. S-a adăugat imediat în tuburi reactivul TRIzol™ (Invitrogen) pentru a se păstra integritatea ARN. Probele au fost depozitate pe gheață, și prelucrate în laborator în aceeași zi.

#### **IV.2 Extracția acizilor nucleici (ADN și ARN)**

a) Trei filtre au fost obținute pentru fiecare probă, iar ADN total a fost extras folosindu-se un protocol pe bază de rășină Chelex® 100 (Bio-Rad) (Suenaga și Nakamura, 2005).

b) ADN din probele de microbialite s-a extras pe baza protocolului conceput de Reyes-Escogido și colab. (2010) ce folosește un agent de chelatare (Chelex® 100, Bio-Rad) împreună cu microunde.

c) ADN și ARN total au fost extrase din probele de comunități microbiene sedimentare nemineralizate folosindu-se instrucțiunile oferite de producătorii reactivului TRIzol™ (Invitrogen).

### **IV.3 Microscopia cu lumină polarizată și Microscopia electronică de baleiaj (SEM)**

Pentru probele de microbialite, microscopia cu lumină polarizată s-a realizat cu un microscop Nikon TE-2000 echipat cu o cameră digitală Nikon D90 (Nikon Inc., Melville, NY, SUA). Pentru SEM, probele au fost imersate în azot lichid, fixate pe suporturi de cupru, acoperite cu un strat de aur de 10 nm și analizate la un microscop electronic JEOL JSM 5510LV (JEOL, Tokyo, Japan).

### **IV.4 Analiza mineralogică prin difracție în raze X (XRD)**

Compoziția mineralelor a fost determinată prin XRD, folosindu-se un difractometru cu radiație CuK $\alpha$  și filtru de Ni. Probele au fost măcinate manual într-un mojar de agat, și au fost măsurate între 2 și 60°2 $\theta$ , cu o viteză de scanare de 2°/min.

### **IV.5 PCR cantitativ (qPCR)**

a) Abundența procariotelor a fost determinată în probele de apă termală și în comunitățile microbiene sedimentare nemineralizate prin qPCR, utilizându-se amorsele universale PRK341F/PRK806R (Yu și colab., 2005). Toate detaliile pentru reproducerea reacțiilor se pot găsi în teză.

b) Abundența organismelor din domeniile Bacteria și Archaea a fost determinată prin utilizarea amorselor specifice fiecărui domeniu: 931F Archaea AGGAATTGGCGGGGAGCA (Einen și colab., 2008), M1100R Archaea BGGGTCTCGCTCGTTRCC (Einen și colab., 2008), 338F Bacteria ACTCCTACGGGAGGCAGCAG (Lane, 1991), 518R Bacteria ATTACCGCGGCTGCTGG (Muyzer și colab., 1993). Toate detaliile pentru reproducerea reacțiilor se pot găsi în teză.

### **IV.6 Analiza comunității microbiene**

a) Pentru probele de apă termală și comunități microbiene sedimentare nemineralizate s-au amplificat regiunile variabile V3-V4 din genele pentru ARNr 16S. Pentru aceasta s-au folosit amorsele universale PRK341F/PRK806R (Yu și colab., 2005) la care s-au adăugat adaptorii Illumina. Concentrația ampliconilor s-a determinat cu kitul Qubit® dsDNA HS Assay Kit și fluorimetrul Qubit® (Thermo Fisher Scientific). Concentrația bibliotecilor de secvențe s-a determinat cu kitul PerfeCta® NGS Quantification Kit for Illumina (Quanta BioSciences, USA),

după care biblioteca de secvențe a fost diluată cu Tris pH 8 la o concentrație finală de 4 nM. Secvențializarea a fost realizată pe o platformă Illumina MiSeq (Illumina, SUA) (V3 sequencing chemistry, 300 pb - paired-end reads).

b) În probele de microbialite s-a amplificat regiunea variabilă V4 a genei pentru ARNr 16S, folosindu-se amorsele universale 515F-806R și protocolul descris de Lundberg și colab. (2013).

#### **IV.7 Procesarea datelor de secvențializare**

Datele brute de secvențializare au fost procesate cu ajutorul softurilor Usearch v8 și QIIME (Caporaso și colab., 2010; Edgar, 2010). Pentru eliminarea secvențelor barcode, pentru demultiplexing și pentru combinarea perechilor de secvență (forward și reverse) s-a folosit instrumentul QIIME. Pentru îndepărtarea secvențelor unice, pentru controlul calitativ și înlăturarea secvențelor himerice s-a folosit Usearch V8 și baza de date Greengenes ("13\_8") ca referință (DeSantis și colab., 2006). Taxonomia a fost atribuită în QIIME folosindu-se baza de date Greengenes ("13\_8") ca referință, iar secvențele cloroplastidiale și mitocontriale au fost înlăturate din setul final de date.

#### **IV.8 Analiza statistică**

Pentru estimarea alfa-diversității, indicele de diversitate filogenetică (PD-whole tree), indicii Shannon, Simpson și Chao1 au fost calculați în QIIME. Distanțele Unweighted și Weighed Unifrac au fost calculate pentru estimarea diversității între probe. Testele Mantel, ANOSIM și determinarea de OTU indicatoare s-au realizat în R. Toate detaliile pentru realizarea acestor teste se găsesc în teză.

#### **IV.9 Predicția diversității funcționale**

Predicția diversității funcționale s-a realizat în PICRUSt (Langille și colab., 2012). Pentru aceasta, OTU au fost generate folosindu-se opțiunea "open reference" și au fost păstrate în setul final doar acele OTU care aveau corespondent în Greengenes ("13\_8"). Tabelul cu OTUa fost normalizat după numărul de gene pentru ARNr 16S din fiecare genom, iar tabelul normalizat a fost folosit pentru predicția genelor funcționale. Indicii weighted NSTI s-au calculat în cazul fiecărei probe pentru evaluarea exactității predicției.



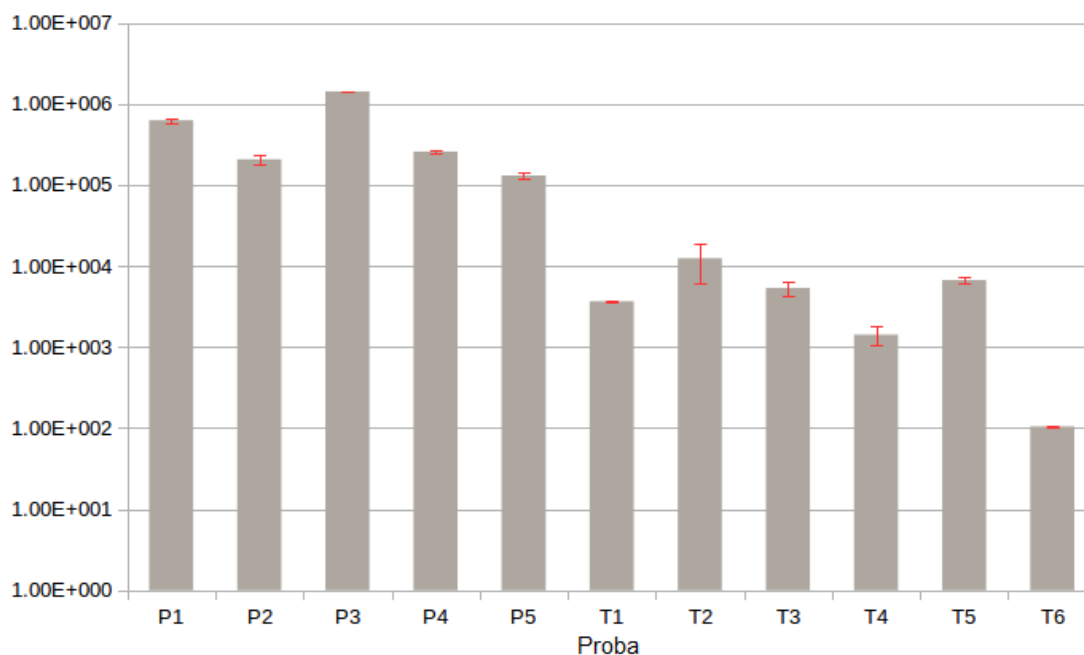
## V. Rezultate și discuții

### V.1 Acviferele hipertermale de mare adâncime: acviferul Panonian și Triasic

(Această secțiune este parte a articolului: *Chiriac CM, Baricz A, Szekeres E, Rudi K, Dragoș N, Coman C. 2017. Microbial composition and diversity patterns in deep hyperthermal aquifers from the Western Plain of Romania. Microbial Ecology, DOI: 10.1007/s00248-017-1031-x*).

#### V.1.1 Abundența genelor pentru ARNr 16S

Numărul genelor pentru ARNr 16S a variat în acviferul Panonian între  $1.3 \times 10^5$  –  $1.4 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>, valorile mai ridicate întâlnindu-se la 55°C (proba P3), pe când în acviferul Triasic valorile au fost cuprinse între  $1.05 \times 10^2$  -  $1.2 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup>, cele mai scăzute valori fiind determinate în probele cu temperaturi de 92 - 104°C (Figura 1).



**Figura 1.** Abundența numărului de gene pentru ARNr 16S în cele 11 probe de apă termală colectate din acviferul Panonian și Triasic. Valorile pe axa Y sunt exprimate în mL<sup>-1</sup>.

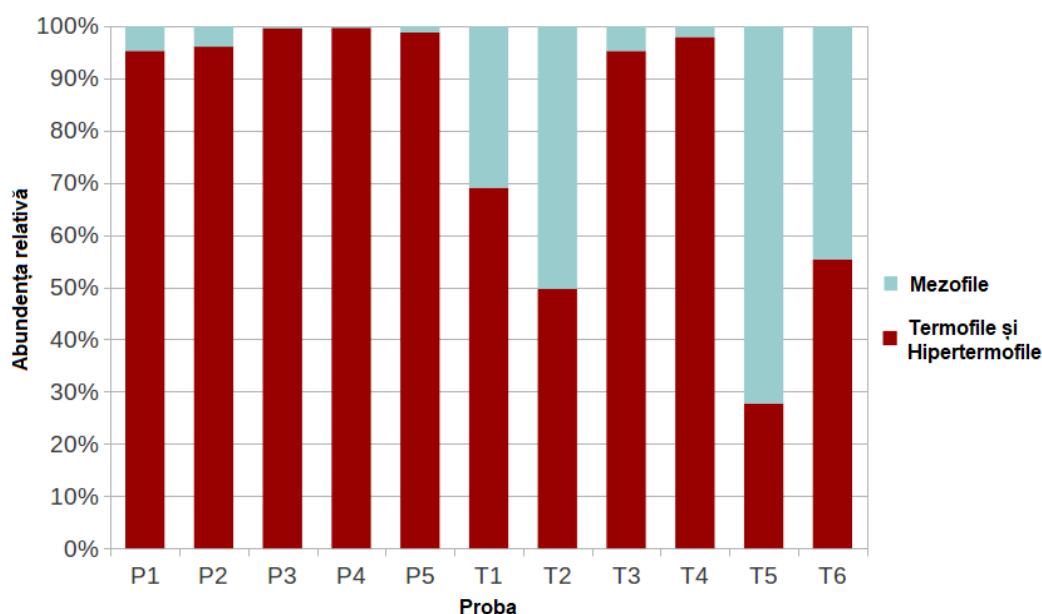
Abundența procariotelor pare să scadă cu adâncimea și cu creșterea temperaturii, observații raportate și în alte studii (Kieft, 2016; Nyysönen și colab., 2014; Itävaara și colab., 2011). Aceasta variază între  $10^5$  –  $10^6$  celule/mL în depozitul Panonian, valori similare întâlnindu-se și în Marele Bazin Artesian din Australia la temperatura de 64°C (Kimura și colab., 2005). Numărul scăzut de gene la adâncimi și temperaturi mari în acviferul Triasic se poate



datorată lipsei nutrienților și unui metabolism scăzut, ceea ce îngreunează caracterizarea acestor ecosisteme (Kieft, 2016).

### V.1.2 Structura comunității microbiene

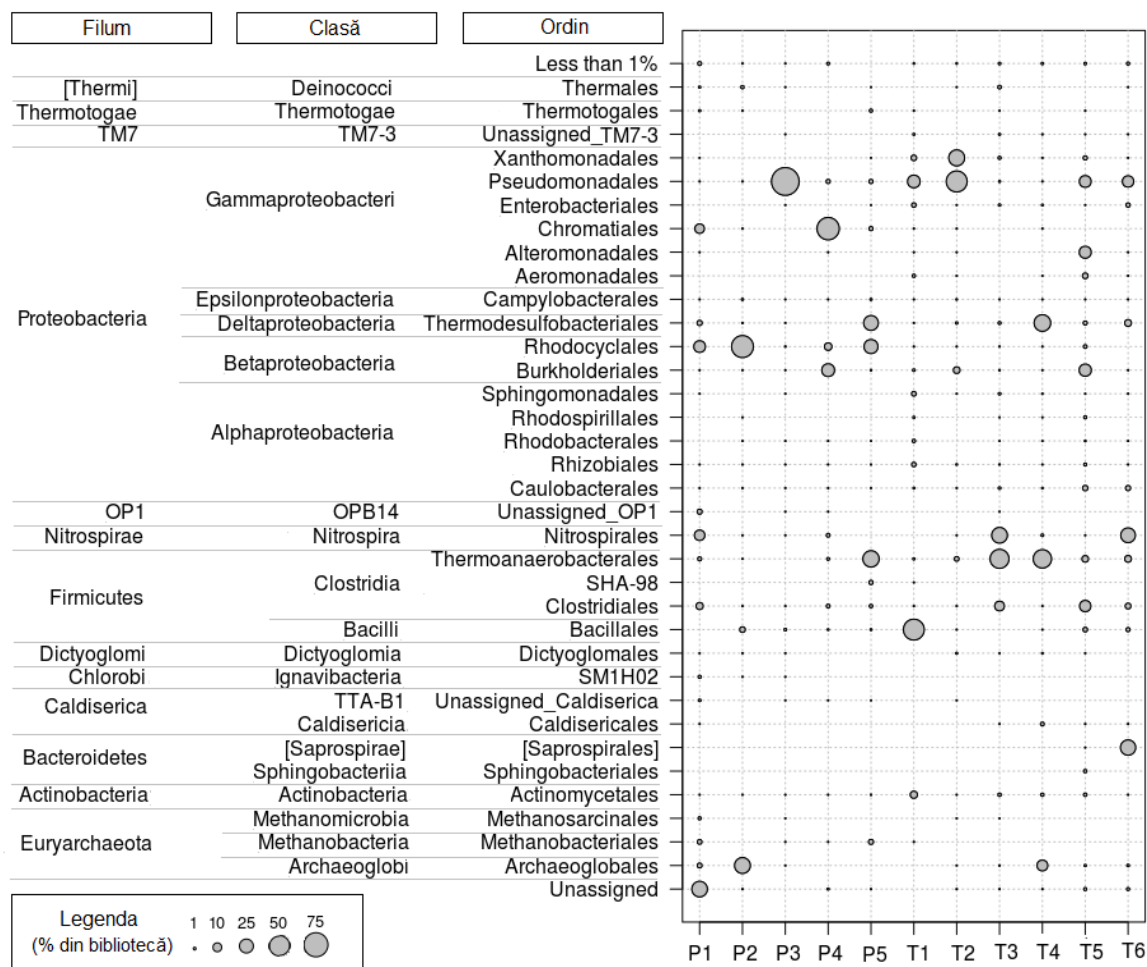
După filtrarea calitativă, secvențele au fost grupate pe baza unei similarități de 97% în 43 - 121 OTU-uri în fiecare probă. Între 95 - 99% din secvențele obținute în probele din acviferul Panonian aparțin unor organisme termofile sau hipertermofile, ceea ce susține acest acvifer ca fiind unul pristin, necontaminat cu ape meteorice recente (Țenu, 1981). Pe de altă parte, între 28 - 98% din secvențele obținute în probele din depozitul Triasic pot fi considerate ca aparținând unor specii termofile, indigene, o contaminare mai redusă cu specii mezofile fiind întâlnită în probele T3 și T4 (Figura 2). Prezența mezofilelor aici nu e surprinzătoare deoarece acest acvifer este alimentat cu cantități însemnate de ape meteorice (Țenu, 1981).



**Figura 2.** Procentul de secvențe ce aparțin unor specii termofile sau hipertermofile, precum și abundența mezofilelor în probele investigate.

Datele taxonomice au arătat că organismele în cele 11 probe de apă termală aparțin la 24 de filumuri, 13 dintre ele având o abundență mai mare de 1%. Cel mai abundent filum în acviferul Panonian este Proteobacteria (Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- și Epsilonproteobacteria), cu 31.9 - 93.9% din biblioteca de secvențe, pe când în apele din depozitul Triasic atât Proteobacteria (6.4 - 95.8%) cât și Firmicutes (2.8 - 57.5%) sunt abundente (Figura 3). Așadar,

chiar dacă aceste două depozite de apă subterană se află în proximitate, ele sunt populate de comunități microbiene diferite. Mai mult, din totalul de 224 OTU identificate în cele 11 probe, doar 5 OTU dominante au fost comune celor două acvifere (*Rhodocyclaceae*, *Thermoanaerobacteriaceae*, *Thermodesulfovibrio*, *Archaeoglobus* și *Acinetobacter*), subliniind încă o dată diferența dintre cele două depozite.

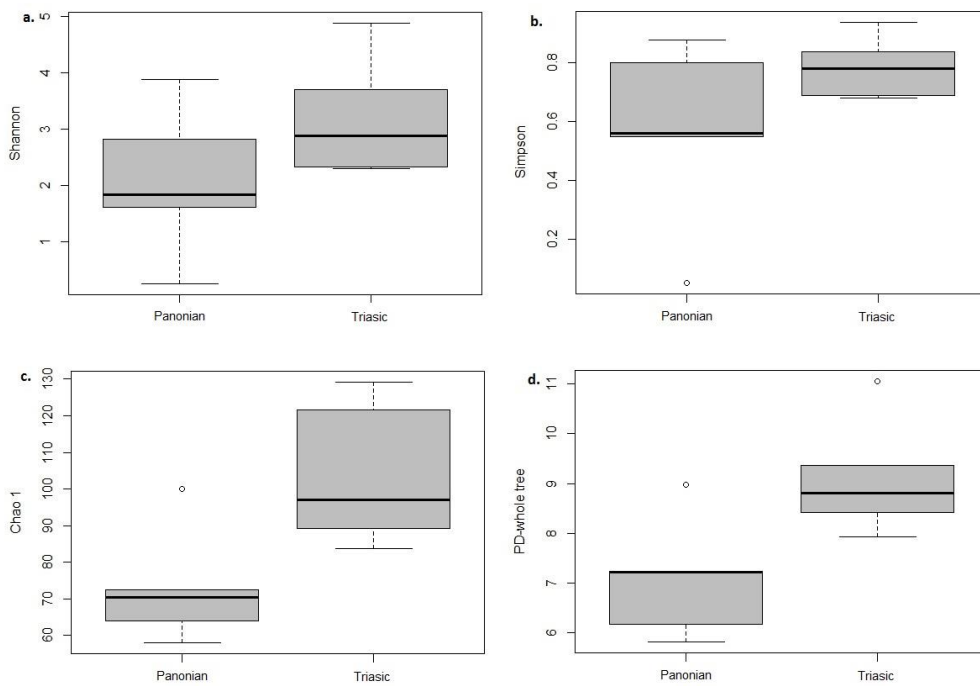


**Figura 3.** Compoziția taxonomică a comunităților microbiene la nivel de filum, clasă și ordin. Abundența relativă a grupurilor dominante (> 1% din biblioteca de secvențe) în cele 11 probe de apă colectate din acviferul Panonian și Triasic.

### V.1.3 Diversitatea procariotelor

Neașteptat, numărul speciilor a crescut liniar cu temperatura, coeficientul de corelație Pearson dintre numărul de OTU și temperatura apei fiind  $r = 0.747$  ( $p < 0.05$ ). Acest rezultat a fost surprinzător pentru că în general comunitățile microbiene devin mai puțin complexe cu creșterea temperaturii, apele termale și hipertermale fiind dominate de un număr redus de specii adaptate la condiții extreme de temperatură (Kieft, 2016; Inskeep și colab., 2010). Totuși,

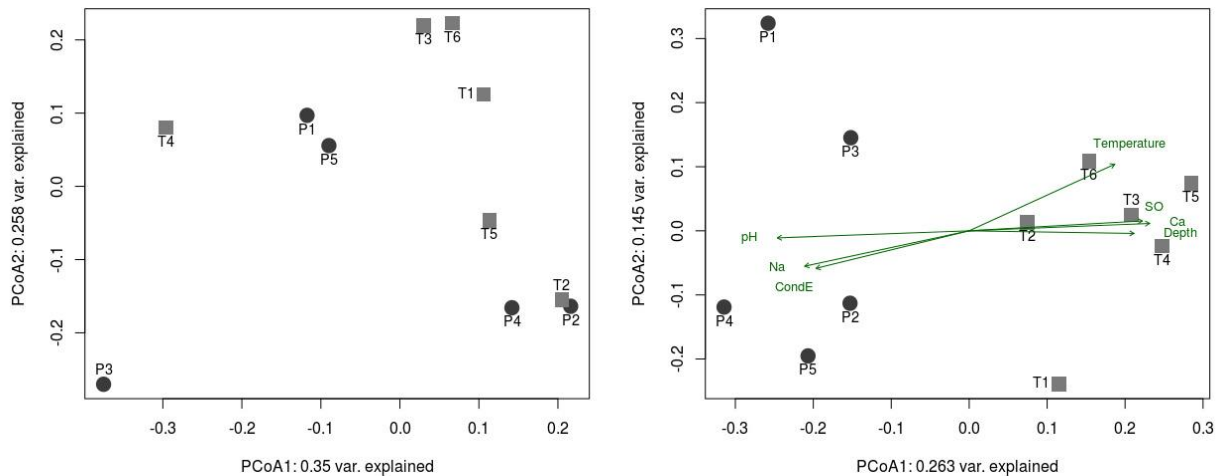
rezultatele au fost diferite când adundențele mezofilelor și ale termofilelor au fost luate în calcul separat. Ca urmare, abundența termofilelor și a hipertermofilelor, adică a speciilor indigene, a fost negativ corelată cu creșterea temperaturii ( $r = -0.65$ ,  $p < 0.05$ ) și a adâncimii de la care provenea apa ( $r = -0.61$ ,  $p < 0.05$ ), ceea ce e în concordanță cu literatura. În acviferul Triasic, mai ales, organisme termofile și hipertermofile au fost identificate împreună cu specii aerobe, mezofile, cosmopolite. O posibilă explicație pentru aceasta ar fi alimentarea continuă a acviferului cu apă meteorică (Țenu, 1981), ceea ce ar face din acest acvifer un mediu hipertermal ”de suprafață” (Hubalek și colab., 2016; Kieft, 2016). În acest context, numărul de OTU, precum și indicii Shannon, Simpson, și indicele de diversitate filogenetică, au fost toți pozitiv corelați cu abundența mezofilelor ( $r$  între 0.58 - 0.66,  $p < 0.05$ ).



**Figura 4.** Indicii de alfa-diversitate calculați pentru probele de apă termală din acviferul Panonian și Triasic. a) Indicele Shannon; b) Indicele Simpson; c) Indicele Chao1; d) Indicele PD-whole tree.

Existența unei proporții atât de ridicate de organisme mezofile în acviferul Triasic, care se află la adâncimi mai mari decât cel Panonian, a dus probabil la o creștere artificială a biodiversității probelor cu temperatura și adâncimea (Figura 4). De fapt, dacă ținem cont și de rezultatele de la qPCR, comunitățile devin mai puțin abundente și mai dispersate în acviferul Triasic, probabil ca urmare a temperaturii extreme și a lipsei nutrienților (Hubalek și colab., 2016).

Pentru a putea observa beta-diversitatea, s-au generat două grafice PCoA pe baza distanțelor Weighted și Unweighted Unifrac. Gruparea probelor dată de distanțele Weighted Unifrac nu a fost statistic semnificativ corelată cu temperatura, adâncimea de la care s-au colectat probele, abundența mezofilelor, și nici cu vreun alt parametru fizico-chimic (Figura 5a). Însă, atunci când au fost calculate distanțele Unweighted Unifrac, a rezultat gruparea probelor în funcție de acviferul din care au fost colectate (Figura 5b). Un test ANOSIM a fost realizat pentru a verifica gruparea probelor în funcție de acvifer, iar rezultatul a fost statistic semnificativ ( $r = 0.752$ ,  $p=0.004$ ). În plus, unii parametri fizico-chimici, ca temperatura, adâncimea, concentrația  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , pH și conductivitatea electrică au fost semnificativ corelați cu beta-diversitatea ( $p < 0.05$ ).



**Figura 5.** a) Grafic PCoA al primelor două componente principale folosind distanțele Weighted Unifrac; b) Același tip de grafic, dar folosind distanțele Unweighted Unifrac. Factorii de mediu care influențează semnificativ patternul de beta-diversitate ( $p < 0.05$ ) sunt reprezentați pe graficul PCoA.

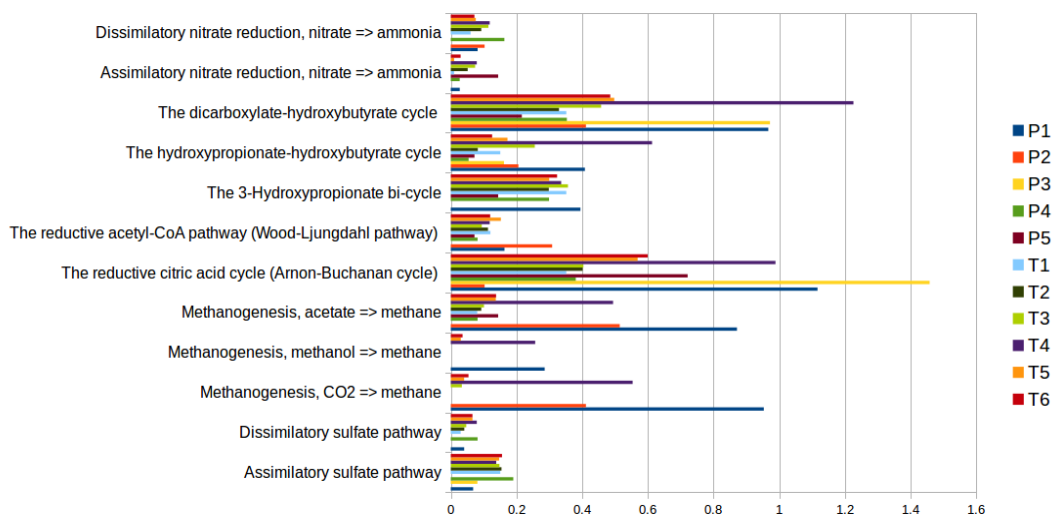
Așadar, factorii de mediu specifici fiecărui acvifer, împreună cu posibilitatea de realimentare a acviferului Triasic, au un efect cumulativ asupra diversității microbiene observate și distribuției taxonilor minori ( $< 1\%$  din biblioteca de secvențe).

#### V.1.4 Predicția diversității funcționale

Metanogenele par mai răspândite în acviferul Panonian, unde organisme din genul *Methanosaeta* utilizează acetatul ca donor de electroni (Kamagata și colab., 1992) iar cele din genul *Methanothermobacter* reduc  $\text{CO}_2$  la  $\text{CH}_4$  utilizând  $\text{H}_2$  ca donor de electroni (Wasserfallen și colab., 2000). Deoarece organismele metanogene și cele sulfat reducătoare se află în competiție pentru resurse, primul grup e dominant acolo unde sulfatul e limitat, cum e cazul acviferului Panonian, și vice versa. Organismele responsabile de reducerea sulfatului în acviferul

Panonian sunt cel mai probabil cele afiliate genului *Archaeoglobus* (Widdel, 2006), pe când concentrațiile mai ridicate de sulfat în depozitul Triasic favorizează prezența organismelor sulfat reducătoare clostridiale și non-clostridiale. Sulfatul e redus de aceste organisme la hidrogen sulfurat, și poate apoi să fie asimilat de alte procariote (Hartzell și Reed, 2006). Chiar dacă un număr ridicat de căi de fixare a carbonului se consideră că ar putea fi prezente în probele investigate, ciclul reductiv al acidului citric și ciclul dicarboxilat - hidroxibutiratului par să fie cele mai comune în toate probele, fiind specifice bacteriilor microaerofile și anaerobe, sau arheelor hipertermofile anaerobe (Berg, 2011).

**Figura 6.** Numărul de gene ce ar putea fi implicate în metabolismul azotului, sulfului și metanului, precum și în căile de fixare a carbonului în probele colectate din acviferul Triasic și Panonian, estimat prin PICRUST.



## V.2 Structura, mineralogia și biodiversitatea microbialitelor de la Ciocăia

(Această secțiune e parte a articolului: *Coman C, Chiriac CM, Robeson MS, Ionescu C, Dragoș N, Barbu-Tudoran L, Andrei AȘ, Banciu HL, Sicora C, Podar M. 2015. Structure, mineralogy, and microbial diversity of geothermal spring microbialites associated with a deep oil drilling in Romania, Frontiers in Microbiology 6:253. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00253*)

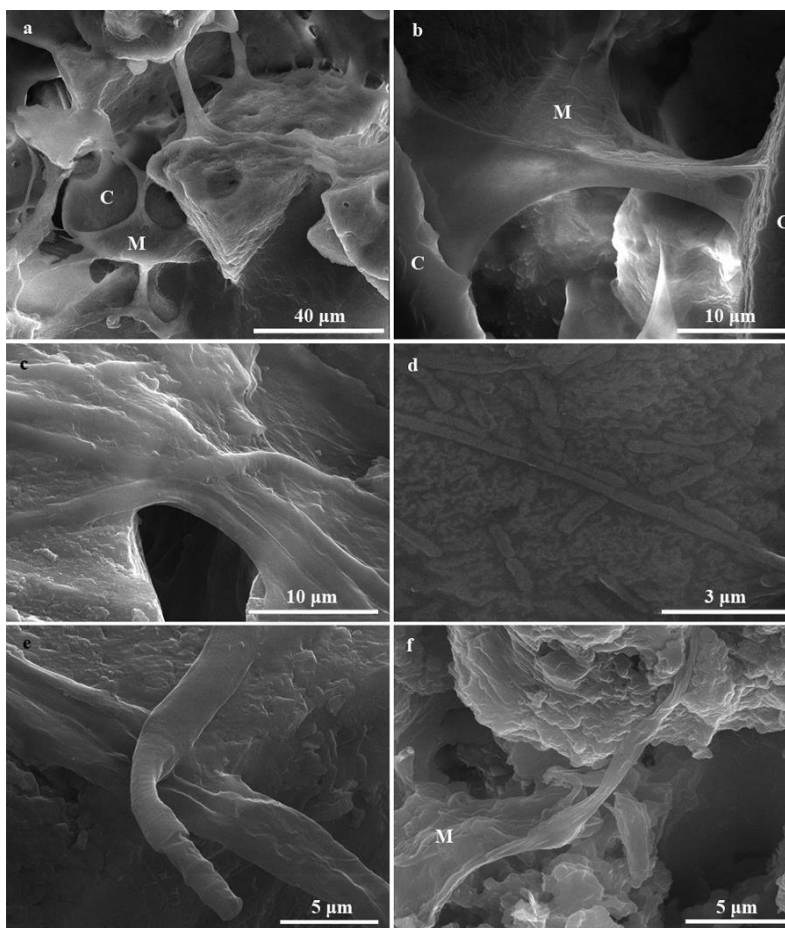
### V.2.1 Mineralogia depozitelor de carbonat

Macroscopic, depozitele de carbonat prezintă o culoare alb-murdară și o structură fibroasă. Depozitele de la 32°C și 49°C (C32 și C49) sunt formate din mai multe straturi de culoare închisă cu grosimi cuprinse între <1 mm și câțiva mm. Analiza XRD a arătat că toate cele trei depozite sunt formate în cea mai mare parte din calcit însoțit de minerale argiloase (illit și smectit) și probabil aragonit. Microscopia cu lumină polarizată a arătat că probele de carbonat

de la Ciocaia sunt formate din fascicule de cristale scalenoedrice alungite cu orientare radială, dispuse în straturi alternative de culoare deschisă și închisă. În proba de la 65°C (C65), dispunerea cristalelor este neregulată iar straturile închise nu mai sunt vizibile. Straturile închise la culoare sunt formate în mare parte din materie organică, și sunt foarte vizibile la 32°C, dar aspectul stratificat se pierde cu creșterea temperaturii.

### V.2.2 Interacțiunile dintre cristalele de carbonat și comunitatea microbiană

Câteva tipuri de interacțiuni au fost observate prin SEM între comunitatea microbiană și cristalele de carbonat: i) captarea și legarea cristalelor (Figura 7A), o interacțiune implicată în începerea procesului de litifiere (Dupraz și colab., 2009); ii) formarea de punți între cristale de către comunitatea microbiană (Figura 7A, B); iii) colonizarea mineralului de către bacterii filamentoase și bacili (Figura 7C, D).



**Figura 7.** Imagini SEM care prezintă interacțiunile dintre comunitatea microbiană și cristalele de carbonat. A) Organismele captează și leagă cristalele (C32); B) Comunitatea bacteriană formează punți între cristale (C49 și mai rar în C65); C) și D) Filamente bacteriene și bacili colonizează cristalele de carbonat (C – C32, D – C65); E) și F) Filamente individuale (E – C32), precum și comunitatea microbiană în ansamblu (F – C49) ce pare a fi inclusă într-o matrice de EPS. M – mat microbian. C – cristale de carbonat.



### V.2.3 Abundența microbială în depozitele de carbonat

Domeniul Bacteria a dominat comunitatea de la 32°C ( $2.1 \pm 0.01 \times 10^8$  celule/g de biomasă umedă; 98.6% din numărul total de celule) și cea de la 49°C ( $7.2 \pm 0.01 \times 10^8$  celule/g de biomasă umedă; 99.8% din totalul de celule). În proba C65, bacteriile au reprezentat 54.6% din totalul celulelor procariote ( $5.7 \pm 0.02 \times 10^7$  celule/g de biomasă umedă). Domeniul Archaea a reprezentat mai puțin de 2% din totalul celulelor în probele C32 ( $2.9 \pm 0.01 \times 10^6$  celule/g carbonat; 1.34% din numărul de celule) și C49 ( $1.0 \pm 0.01 \times 10^6$  celule/g carbonat; 0.2% din totalul de celule), dar a fost aproape la fel de abundent ca și domeniul Bacteria în proba C65 ( $4.7 \pm 0.03 \times 10^7$  celule/g carbonat; 45.5% din totalul de celule).

### V.2.4 Alfa-diversitatea în depozitele de carbonat

Indicele Chao1 a avut valoarea 531 în proba C32, iar în probele C49 și C65 a fost calculat la 156 și respectiv la 104. Indicele Shannon a avut valori similare în probele C49 și C65 (3 și 2.7), dar a fost de două ori mai mare în proba C32 (5.94). Curbele de rarefacție au atins platoul, și astfel s-a considerat că adâncimea de secvențializare este suficientă pentru o caracterizare exactă a diversității procariote.

### V.2.5 Diversitatea domeniului Archaea în probele de carbonat

În urma filtrării calitative au fost obținute 35.916 secvențe parțiale ale genei pentru ARNr 16S aparținând domeniului Archaea. Abundența acestui domeniu în bibliotecile de secvențe a fost una scăzută în probele C32 și C49, respectiv 0.17% și 0.31%. Proportția acestora în C65 a crescut la 35.88%. Gruparea secvențelor în OTU la un prag de similaritate de 97% a rezultat în 11 OTU în C32, 18 OTU în C49 și 14 OTU în C65. Diversitatea la nivel de clasă în domeniul Archaea se poate observa în Figura 8.

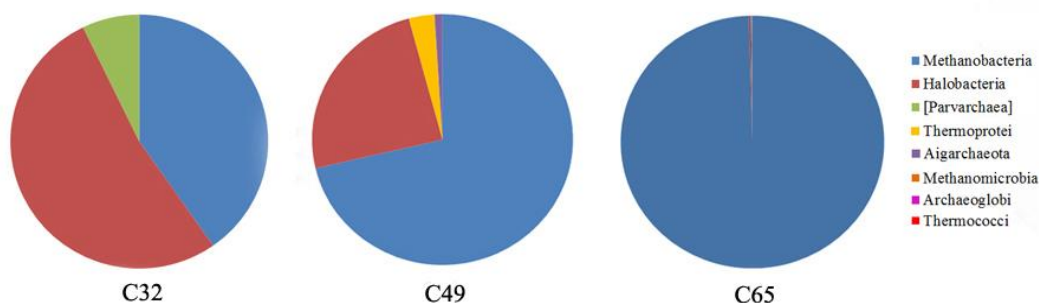
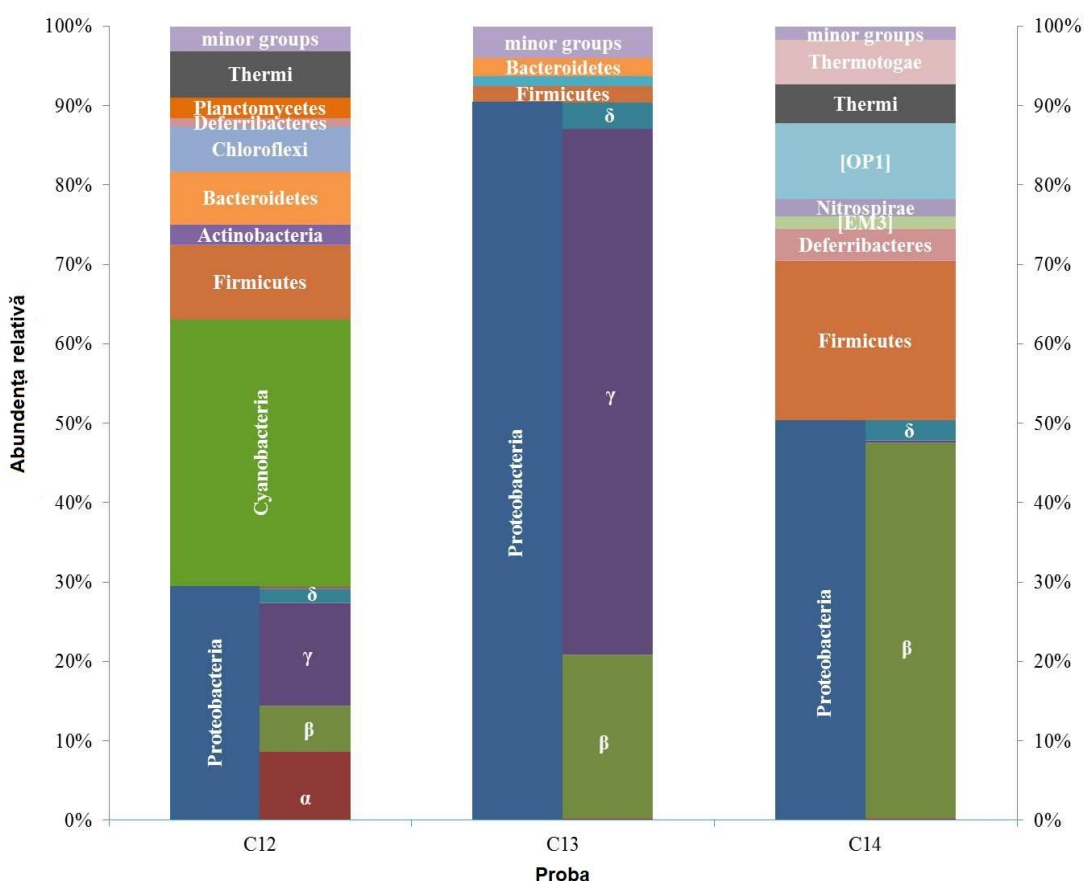


Figura 8. Diversitatea la nivel de clasă a domeniului Archaea în bibliotecile de secvențe ale celor trei probe de carbonat. Proba C32 e dominată de specii halofile, urmată de organisme metanogene și clasa [Parvarchaea]. Cu creșterea temperaturii, dominanța metanogenelor crește (probele C49 și C65).

## V.2.6 Diversitatea microbială și structura comunității bacteriene

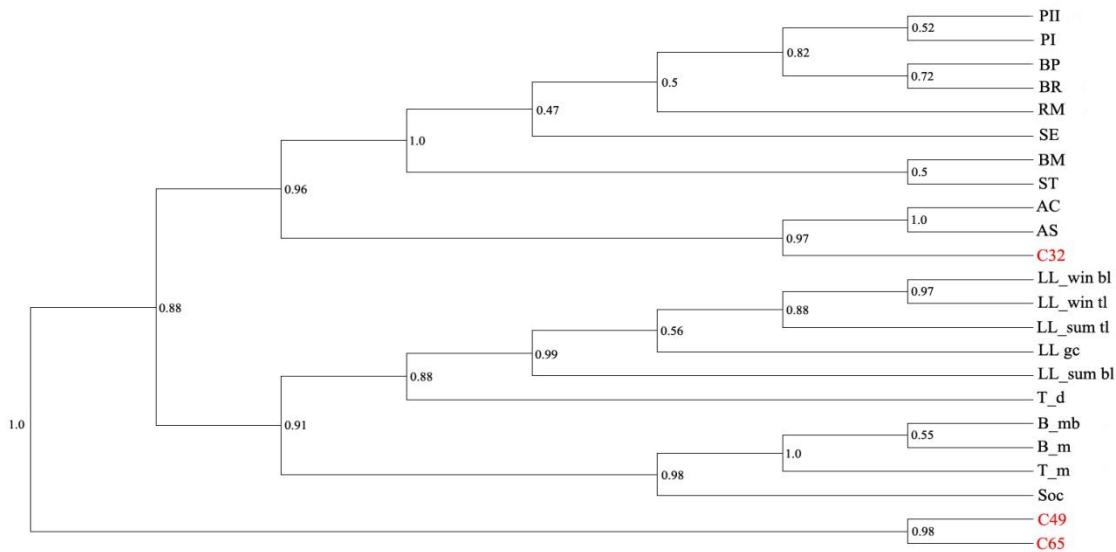
După filtrarea calitativă, în setul final de date au rămas 66.367 secvențe bacteriene pentru proba C32, 123.284 pentru C49 și 63.255 pentru C65. Numărul observat de OTU a scăzut de la 518 în C32 la 84 în C65. Cel mai abundent filum în proba C32 a fost Cyanobacteria (~34%), urmat de Proteobacteria (~29%), Firmicutes (~9%), Bacteroidetes (~7%), Chloroflexi (~6%), Thermi (~6%), Actinobacteria (~3%), Planctomycetes (~3%), și Defferibacteres (~1%). În proba C49 a avut o abundență foarte mare filumul Proteobacteria (~91%), urmat de Firmicutes și Bacteroidetes (fiecare având 2%) și Armantimonadetes (~1%). La 65°C, filumurile dominante au fost Proteobacteria (~50%), Firmicutes (~20%), [OP1] (~10%), Defferibacteres, Thermi și Thermotogae (fiecare reprezentând ~5%), [EM3] și Nitrospirae (mai puțin de 2%) (Figura 9).



**Figura 9.** Distribuția filumurilor și claselor dominante în depozitele de carbonat de la Ciocaia.



La nivelul comunității microbiene s-au determinat diferențe semnificative între cele trei depozite de carbonat. Probele C49 și C65 au fost similare între ele, și deosebite față de altele descrise în literatură, pe când C32 s-a asemănat cu probele de microbialite colectate din lacul Alchichica, Mexic (Figura 10) (Centeno și colab., 2012).



**Figura 10.** Analiza comparativă (arbore UPGMA) a diversității microbiene din probele de la Ciocaia cu alte microbialite și comunități microbiene sedimentare nemineralizate descrise în literatură. OTU-urile au fost identificate folosindu-se opțiunea "closed-reference" în QIIME (Caporaso și colab., 2010) pe baza unei similarități de 97% în urma filtrării calitative via UPARSE (Edgar, 2013). Codul probelor: PI și PII – Pozas Azules I și II; BP – Pirate Channel; BR – Los Rápidos; RM – Rio Mesquites; SE – lagoon microbialite; BM – soft microbialite; ST – microbial mat; AC – columnar microbialite Alchichica lake; AS – spongy microbialite Alchichica lake (SRR350006; Centeno și colab., 2012); LL\_win bl – Salar de Llamara winter sample, bottom layer; LL\_win tl – Salar de Llamara winter sample, top layer; LL\_sum bl - Salar de Llamara summer sample, bottom layer; LL\_sum tl – Salar de Llamara summer sample, top layer (SRR961678, SRR952918, SRR952917, SRR952915, SRR952913; Rasuk și colab., 2014); T\_d – Tebenquiche dome; B\_mb – Brava microbialite; B\_m – Brava mat; T\_m – Tebenquiche mat (SRR627689, SRR627690, SRR627691, SRR627395; Farias și colab., 2014); S – Socompa stromatolite (SRR329490; Farias și colab., 2013).

### V.2.7 Grupuri bacteriene specifice și nespecifice pentru microbialite observate în depozitele de la Ciocaia

Din domeniul Bacteria au fost identificați taxoni pentru prima oară în asociere cu microbialite moderne (Tabelul 1).

**Tabel 1.** Taxoni bacterieni descriși pentru prima oară în asociere cu microbialitele moderne.

| OTU/Grup        | Nivelul taxonomic | Filum/Clasă                               | Proba |
|-----------------|-------------------|---|-------|
| 4C0d-2/YS2      | Clasă/Ordin       | <i>Cyanobacteria</i> or [Melainabacteria] | C32   |
| <i>Azoarcus</i> | Gen               | <i>Betaproteobacteria</i>                 | C49   |

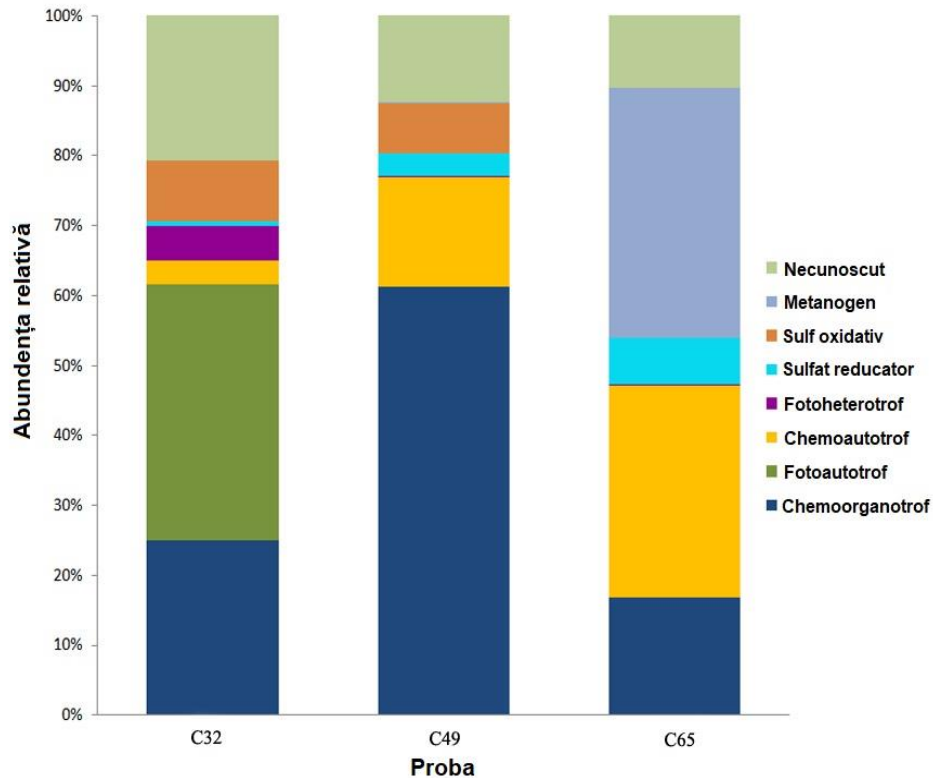
|                              |        |                           |          |
|------------------------------|--------|---------------------------|----------|
| <i>Hydrogenophilus</i>       | Gen    | <i>Betaproteobacteria</i> | C49, C65 |
| <i>Thermacetogenium</i>      | Gen    | <i>Betaproteobacteria</i> | C65      |
| <i>Thermanaerobacterales</i> | Ordin  | <i>Firmicutes</i>         | C65      |
| <i>Bacillus saliphilus</i>   | Specie | <i>Firmicutes</i>         | C32      |
| <i>Bacillus aurantiacus</i>  |        |                           |          |

La 32°C au fost identificate patru genuri cianobacteriene (*Oscillatoria*, *Pseudoanabaena*, *Leptolyngbya* și *Gloeobacter*) ce sunt frecvent întâlnite în microbialitele moderne (Foster și colab., 2009; Goh și colab., 2009; Schulze-Makuch și colab., 2013). La 49°C au dominat genurile *Idiomarina* (~ 34%) și *Halomonas* (~ 24%) din Gammaproteobacteria, împreună cu *Hydrogenophilus* (16%) din Betaproteobacteria. Potențialul unor specii din genurile *Idiomarina* și *Halomonas* de a favoriza precipitarea CaCO<sub>3</sub> a fost deja raportat în literatură (Heijs și colab., 2006; González- Muñoz și colab., 2008). Proba C65 a fost dominată de organisme din genul *Hydrogenophilus*, reprezentând 94% din totalul proteobacteriilor și aproximativ 47% din biblioteca de secvențe. Genul *Thermacetogenium* este și el prezent, cu o adundență de 17% din totalul de secvențe. Din câte știm, acest taxon nu am mai fost descris în asociere cu alte microbialite.

### V.2.8 Predicția diversității funcționale și posibile mecanisme implicate în formarea depozitelor de carbonat

Conform cu Kim și colab. (2012), în apropierea izvoarelor termale predomină precipitarea abiogenică, iar influența comunității microbiene asupra precipitării carbonatului crește cu scăderea temperaturii, și deci cu îndepărtarea de punctul de ieșire al apei la suprafață. Astfel, putem presupune că în apropierea forajului C65 mineralul precipită abiogen. Această ipoteză e susținută de microscopia SEM care nu a dezvăluit o comunitate microbială abundentă la 65°C. În plus, diversitatea microbială se aseamănă mai degrabă cu cea din biosfera de mare adâncime (Secțiunea V.1) decât cu una tipică pentru microbialite. Cu îndepărtarea de forajul termal, temperatura și viteza de curgere a apei scad și încep să se formeze comunități microbiene abundente. Astfel, precipitarea mineralului e cel mai probabil determinată de activitatea metabolică microbială la 49°C și 32°C.

Organismele fototrofe sunt abundente în proba C32 (Figura 11), fiind reprezentate atât de grupuri oxigenice cât și anoxigenice. SRB au fost identificate în toate probele, iar acestea favorizează precipitarea carbonatului prin metabolismul lor. Organismele organoheterotrofe, dominante în C49 și prezente în celelalte probe, prin metabolismul lor și în funcție de posibilitățile de tamponare ale mediului în care se găsesc, pot și ele să crească alcalinitatea mediului favorizând precipitarea carbonatului.



**Figura 11.** Abundența relativă a grupurilor funcționale în depozitele de carbonat de la Ciocaia. Inferența metabolismului s-a realizat pe baza afilierii taxonomice a OTU.

### V.3 Diversitatea microbiană din comunitățile microbiene sedimentare nemineralizate și factorii care o influențează

(Această secțiune e parte a articolului: *Chiriac CM, Szekeres E, Rudi K, Baricz A, Hegedus A, Dragoș N, Coman C. 2017. Differences in temperature and water chemistry shape distinct diversity patterns in thermophilic microbial communities, Applied and Environmental Microbiology 83: e01363-17. DOI: 10.1128/AEM.01363-17*)

#### V.3.1 Abundența genelor și a produșilor de transcriere pentru ARNr 16S

În general, numărul de copii ale produșilor de transcriere pentru ARNr 16S (cDNA) a fost cu două - trei ordine de mărime mai redus decât numărul genelor. Aceasta ne sugerează că estimarea abundenței organismelor nu ar trebui să se realizeze doar pe seama genelor din ADN metagenomic, acesta incluzând deseori în mare parte ADN extracelular (Valentini și colab., 2009). În probele de la Chiraleu (CH), numărul de copii pentru ARNr 16S a scăzut linear cu creșterea temperaturii, de la  $1.1 \pm 0.01 \times 10^8$  copii/mg material umed la  $40^\circ\text{C}$ , la  $3.4 \pm 0.6 \times 10^6$  copii/mg la  $53^\circ\text{C}$ , pe când în celelalte probe nu s-a putut observa un pattern de variație. În probele de la Ciocaia, abundența genelor a fost cuprinsă între  $1.2 \pm 0.05 \times 10^7$  -  $2.3 \pm 0.27 \times 10^8$

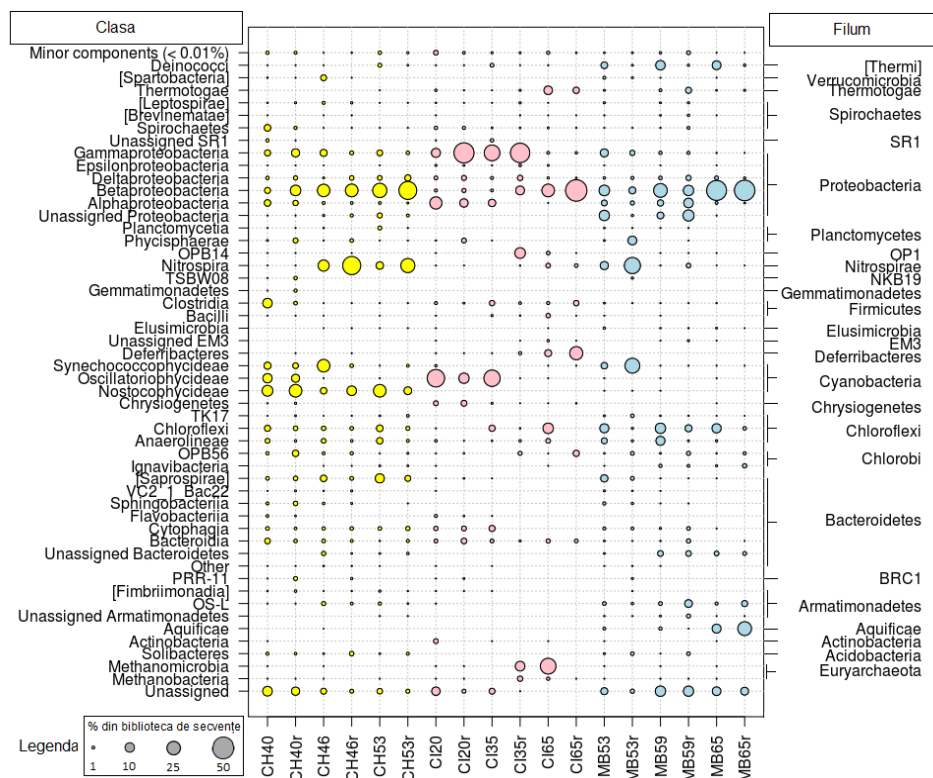
copii/mg, valori asemănătoare observându-se și în probele de microbialitate de la aceeași locație (Secțiunea V.2; Coman și colab., 2015). Numărul de gene a fost similar în probele de la Mihai Bravu (MB),  $2.89 \pm 0.1 \times 10^7 - 9.9 \pm 0.2 \times 10^8$  copii/mg, fără să se fi observat o corelație între acestea și temperatura de la care s-au colectat probele.

### V.3.2 Comunitatea microbială obținută prin secvențializarea genei pentru ARNr 16S

În urma filtrării calitative au rămas 498.539 secvențe în setul final de date, incluse în cele două biblioteci, de ADN și ADNc. Fiecare probă a avut atribuite între 3.499 și 78.280 secvențe ce au fost grupate într-un total de 639 OTU. Domeniul Archaea a avut proporții reduse în proba MB65r, dar a fost abundentă în probele CI65 și CI35r, fiind reprezentat de metanogene acetice din genurile *Methanoculleus* (5.3%) și *Methanothermobacter* (3.2%). În ce privește abundența taxonilor bacterieni, grupurile cu cea mai mare proporție au fost Proteobacteria (13.2 – 66.2%), Cyanobacteria (până la 40.3%), Chloroflexi (până la 24%), Bacteroidetes (până la 12.8%), și Firmicutes (până la 11.3%). Restul secvențelor au fost afiliate în filumurile *Deinococcus-Thermus* (sau [Thermi]) (5.7 – 11.2%), Thermatogae (până la 9.03%), Nitrospirae (2.6 – 15.75%), Spirochaetes (până la 5.94%), Verrucomicrobia (până la 4.32%) și Aquificae (până la 10%).

Probele de la CH au fost dominate de filumurile Cyanobacteria și Proteobacteria (Figura 12). Abundența proteobacteriilor și a genului *Chloroflexus* au crescut cu temperatura, dar o relație inversă s-a observat în cazul fototrofelor oxigenice. Comunitățile dezvoltate la temperaturi mai scăzute (20 și 35°C) la Ciocaia (CI) au fost formate din proporții aproape egale de cianobacterii (34.2 – 40.4%) și proteobacterii (32.2 – 40.7%). Bacteroidetes (5.6 – 6.5%) a fost următorul filum în ordinea abundenței în probele CI20 și CI35. Proba CI65 a fost dominată de clasa Betaproteobacteria, și mai ales de genul *Hydrogenophilus*, un grup de termofile aerobe facultativ chemolitotrofe, care utilizează H<sub>2</sub> ca sursă de electroni și CO<sub>2</sub> ca sursă de carbon (Hayashi și colab., 1999).

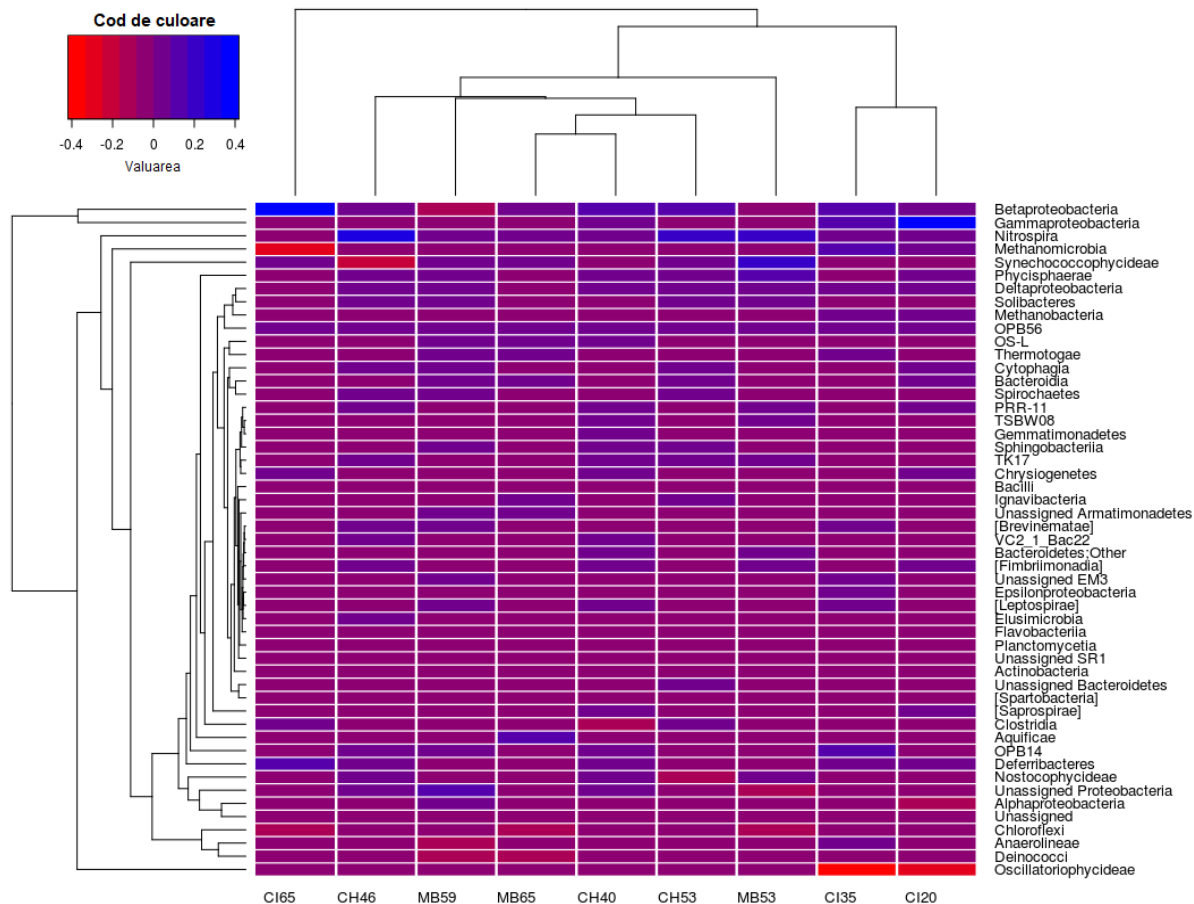
Probele de la Mihai Bravu au fost colectate de la cele mai ridicate temperaturi, între 53 și 65°C. Filumul Cyanobacteria este prezent ca un component major doar la 53°C (5.4%) (Figura 12). Se pare că factorii de mediu favorizează prezența filumului Chloroflexi, având o abundență de 15% în probele MB53 și MB65, și de 24% în proba MB59. De asemenea, proporția organismelor din clasa Betaproteobacteria crește cu temperatura, fiind reprezentate în cea mai mare parte de membrii ai genului *Hydrogenophilus*.



**Figura 12.** Abundența relativă a claselor și filurilor procariote în probele investigate. Rezultatele secvențializării ADN și ADNc sunt prezentate alăturat. Culorile fac referire la locațiile din care s-au colectat probele: galben - CH, roz - CI, albastru - MB.

### V.3.3 Compararea bibliotecilor de ADN vs. ADNc și predicția funcțională

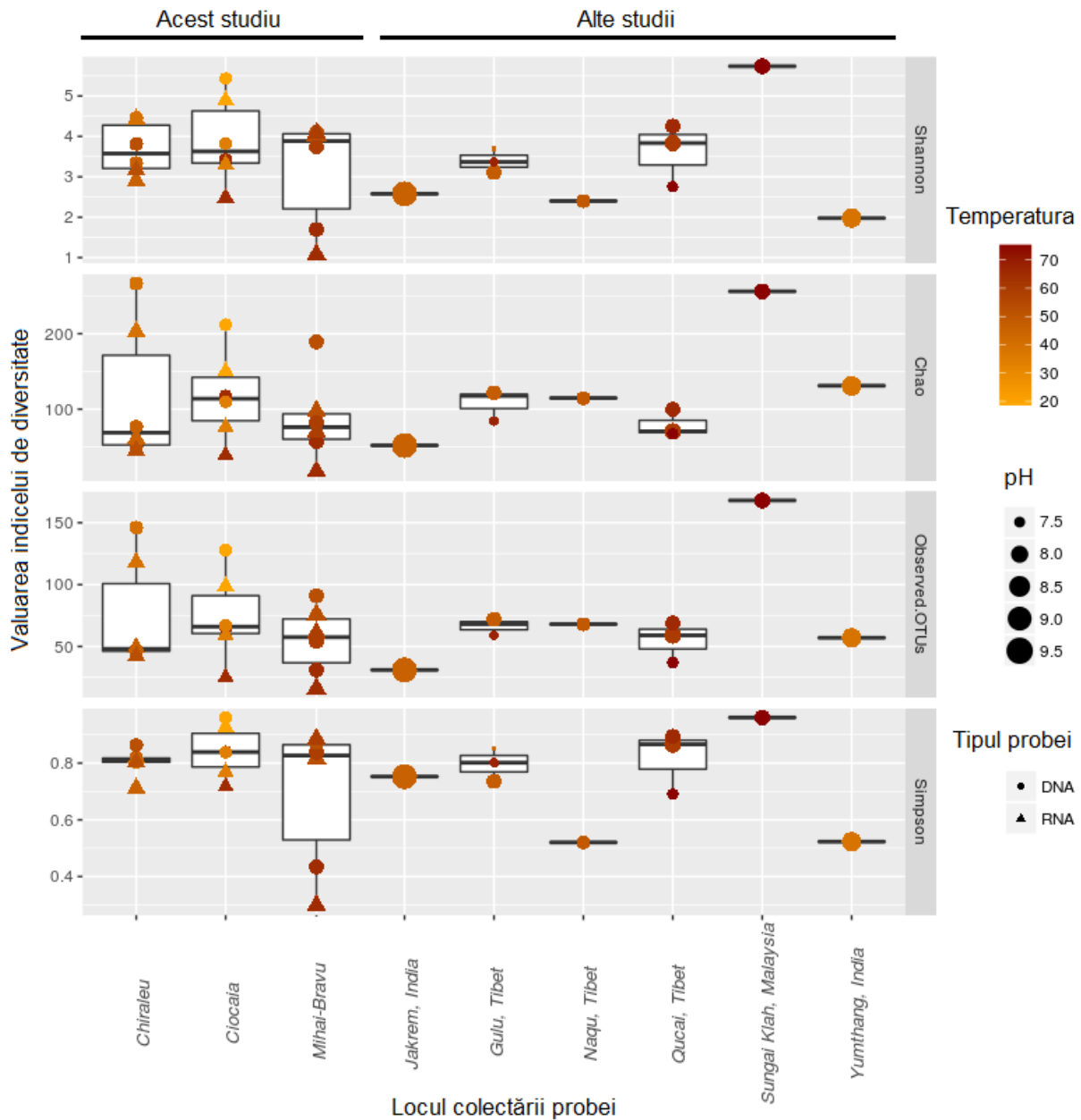
Compararea bibliotecilor de ADN vs. ADNc a arătat schimbări importante în abundența relativă a filurilor Cyanobacteria, Proteobacteria, Nitrospira, Aquificae și Methanomicrobia (Figura 13). Analizând probele de la CI și CH, o scădere a abundenței familiilor *Synechococcophycideae* (-18.5%), *Nostocophycideae* (-12.6%) și *Oscillatoriohycideae* (-34.2%) a fost observată în bibliotecile de ADNc. Aceasta nu trebuie să implice obligatoriu o scădere a populației, ci mai degrabă o scădere în capacitatea de sinteză proteică a cianobacteriilor (Blazewics și colab., 2013). Clasele Betaproteobacteria și Gammaproteobacteria au prezentat o creștere a abundenței în probele de la CI, mai ales în cazul genurilor *Ectothiorhodospira* (CI20r) și *Hydrogenophilus* (CI65r). De aceea, poate fi presupus că ambele genuri sunt producători primari în aceste ecosisteme microbiene. Surprinzător, genul *Methanosaeta* a fost cel mai abundent OTU în proba CI65 (31.6%), dar lipsește în CI65r. S-ar putea ca acest lucru să se datoreze problemelor în extracția ARN, sau ca microorganismele din acest gen să nu formeze populații active în comunitatea microbială sedimentară.



**Figura 13.** Heatmap al proporției de schimbare în abundența relativă a grupurilor taxonomice majore (ADN vs. ADNc). Valoarea 1 corespunde la 100% din biblioteca de secvențe.

### V.3.4 Alfa- și Beta-diversitatea

Indicii care măsoară abundența și diversitatea probelor (Shannon, PD-whole tree, Chao1 și numărul observat de OTU) au fost toți negativ corelați cu creșterea temperaturii (Pearson  $r$  între -0.708 și -0.468,  $p < 0.05$ ). Indicele Simpson a fost o excepție, corelația nefiind statistic semnificativă (Pearson  $r = -0.196$ ,  $p > 0.05$ ). Aceste corelații negative nu au fost surprinzătoare, mai puține specii fiind capabile să se adapteze la temperaturi ridicate (Sharp și colab., 2014). Comparând rezultatele noastre cu altele raportate în literatură, s-a observat că numărul total de OTU a fost mai mare în probele de ADN decât în cele de ADNc, ceea ce s-ar putea datora acumulării în mediu a ADN extracelular (Valentini și colab., 2009) (Figura 14).



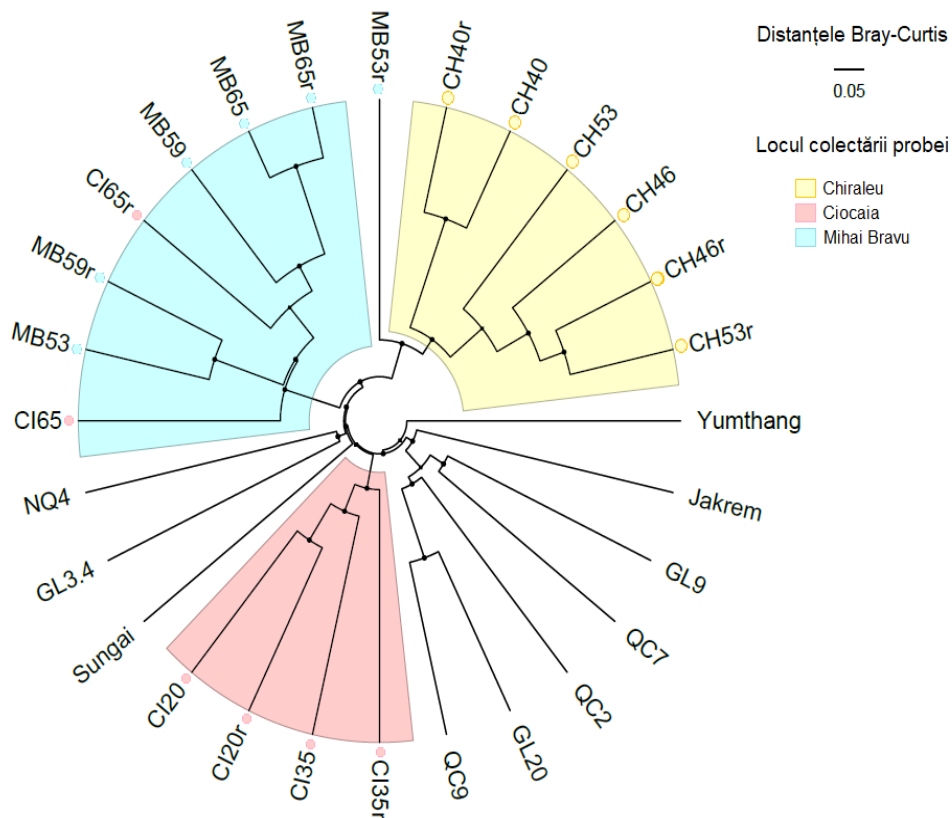
**Figura 14.** Indicii de diversitate Shannon, Simpson, Chao1 și numărul observat de OTU în probele de la Chiraleu, Ciocaia și Mihai Bravu, împreună cu indicii calculați pentru alte comunități microbiene sedimentare din medii termale (China: SRX206469, SRX206467, SRX206466, SRX206468, SRX206459, SRX206460, SRX206456, Wang și colab., 2013; India: SRS932137, SRS932073, Panda și colab., 2016; Malaysia: PRJEB7059, Chan și colab., 2015).

Beta-diversitatea pare influențată în primul rând de combinația de parametri fizico-chimici particulară fiecărei locații. Acest aspect a fost susținut de testul Mantel dintre parametri fizico-chimici și matricea de distanță Weighted Unifrac (Mantel  $r = 0.4313$ ,  $p = 0.001$ ). Pentru a se evalua efectul specific al fiecărui parametru asupra beta-diversității, s-a calculat coeficientul



Spearman ( $\rho$ ) dintre toți parametri fizico-chimici și toate combinațiile posibile dintre aceștia cu matricea de distanță Weighted Unifrac. Combinația care s-a corelat cel mai puternic cu beta-diversitatea include 6 parametri:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , temperatura și conductivitatea electrică (Spearman's  $\rho$  0.456).

Pentru a vizualiza beta-diversitatea dintre probe, s-au folosit distanțele Bray-Curtis și s-a generat un arbore UPGMA (Figura 15). Arborele a susținut gruparea probelor în funcție de locul de colectare, și nu în funcție de temperatură sau de abordarea folosită (ADN vs. ADNc).



**Figura 15.** Arbore UPGMA generat pe baza distanțelor Bray-Curtis pentru probele colectate din România și altele raportate în literatură ca fiind colectate din medii termale. Notarea probelor: Qucai, Platoul Tibetan, China, proba QC9 - SRX206469, QC7 - SRX206468, QC2 - SRX206467; Naqu, Platoul Tibetan, China, proba NQ4 - SRX206466; Gulu, Platoul Tibetan, China, proba GL3.4 - SRX206459, GL9 - SRX206460, GL20 - SRX206456 (Wang și colab., 2013); Jakrem, India - SRS932137, Yumthang, India - SRS932073 (Panda și colab., 2016); și Sungai Klah, Malaezia - PRJEB7059 (Chan și colab., 2015).

Se poate observa că probele de la Chiraleu formează un cluster separat, probabil pentru că ele sunt dominate de OTU incluse în grupurile *Nostocophycideae*, *Chloroflexi* și *Betaproteobacteria*. Probele de la Ciocaia colectate de la cele mai scăzute temperaturi (20 și 35°C) sunt de asemenea grupate împreună, fiind compuse în principal din organisme metanogene, de clasa *Gammaproteobacteria* și de familia *Oscillatoriohaptophyceae*. În schimb,



proba de la 65°C este dominată de genul *Hydrogenophilus* din clasa Betaproteobacteria, motiv pentru care se grupează cu probele de la Mihai Bravu. În această analiză, probele colectate din Platoul Tibetan și descrise inițial de Wang și colab. (2013) formează două clustere determinate de temperatură, ceea ce susține concluzia autorilor care afirmau că temperatura este parametrul principal care influențează beta-diversitatea în acea zonă. Probele GL3.4 și NQ4 au fost colectate de la temperaturi similare (48 și 49°C) și au fost dominate de filumurile Chloroflxi, Cyanobacteria și *Deinococcus-Thermu*, pe când probele de la 60 – 75°C s-au grupat separat, majoritatea OTU aparținând filumurilor Chloroflexi și Aquificae (Wang și colab., 2013).

## VI. Concluzii

Tehnologiile de secvențializare NGS au făcut posibilă caracterizarea diversității procariotelor din diferite tipuri de medii termale din Câmpia de Vest a României. Din primul studiu s-a înțeles că deși acviferele Panonian și Triasic se află în proximitate geografică, ele sunt populate de comunități microbiene diferite. Această situație ar putea fi determinată de diferențele existente la nivelul parametriilor fizico-chimici sau al gradului de alimentare al bazinelor cu apă meteorică. În plus, în acviferul Triasic s-a observat o abundență ridicată a speciilor mezofile, probabil ca rezultat al infiltrării apei de la suprafață în subteran, dar acest aspect ar trebui să fie confirmat în studii viitoare.

În cel de-al doilea studiu s-a investigat biodiversitatea din depozitele de carbonat (microbialite) formate în imediata apropiere a forajului de la Ciocaia, la temperaturi de 32, 49 și 65°C. Probele de la 32 și 49°C au prezentat o structură stratificată, pe când la 65°C distribuția cristalelor de carbonat a fost neregulată. Cel mai probabil, microbialitul din care s-a colectat proba C65 s-a format prin precipitare abiogenă, o concluzie susținută de microscopia SEM și de analiza diversității microbiene. Comunitatea microbială nu a fost vizibilă prin microscopie de baleiaj iar biblioteca de secvențe a fost mai degrabă asemănătoare cu cea din apa de subteran decât cu alte microbialite. Precipitarea carbonatului la 49°C a fost probabil influențată atât de chimismul apei, cât și de comunitatea microbială, pe când la 32°C pare a fi în primul rând determinată de metabolismul microbial.

În ultimul studiu s-a arătat că diversitatea microbială din probele de comunități microbiene sedimentare nemineralizate, dezvoltate în preajma a trei izvoare termale în gradient de temperatură, este influențată de o combinație de 6 factori: cantitatea de ioni de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>,

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, și temperatura și conductivitatea electrică a apei. Chiar dacă în cazul altor izvoare termale de pe Glob biodiversitatea pare a fi influențată în cea mai mare parte de temperatură, probele colectate de noi s-au grupat în funcție de locație.

## VII. Bibliografie

- Awramik SM. 1992. The history and significance of stromatolites. In: Schidlowski M, Kimberley MM, McKirdy DM, Trudinger PA (Eds.), *Early Organic Evolution. Implications for Energy and Mineral Resources*. Springer, Berlin, pp. 435–449.
- Beeby M, O'Connor BD, Ryttersgaard C et al. 2005. The genomics of disulfide binding and protein stabilization in thermophiles. *PLOS Biol* 3: e309.
- Berg IA. 2011. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathways. *Appl Environ Microbiol* 77: 1925–1936.
- Blazewicz SJ, Barnard RL, Daly RA, Firestone MK. 2013. Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. *ISME J* 7: 2061–2068.
- Bolhuis H, Cretoiu MS, Stal LJ. 2014. Molecular ecology of microbial mats. *FEMS Microbiol Ecol* 90: 335–350.
- Brock TD. 1986. Introduction: An overview of the thermophiles, pp. 1–6. In: Brock TD (ed) *Thermophiles. General, molecular and applied microbiology*. Wiley, New-York.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7: 335–336.
- Centeno CM, Legendre P, Beltran Y, Alcantara-Hernandez RJ, Lidstrom UE, Ashby MN, Falcon LI. 2012. Microbialite genetic diversity and composition related to environmental variables. *FEMS Microbiol Ecol* 82: 724–735.
- Chan CS, Chan K-G, Tay Y-L, Chua Y-H, Goh KM. 2015. Diversity of thermophiles in a Malaysian hot spring determined using 16S rRNA and shotgun metagenome sequencing. *Front Microbiol* 6: 177.
- Chapelle FH, O'Neill K, Bradley PM, Methé BA, Ciufo SA et al. 2002. A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens. *Nature* 415: 312–315.
- Chivian D, Alm E, Brodie E, Culley D, Dehal P, DeSantis T et al. 2008. Environmental genomics reveals a single species ecosystem deep within the Earth. *Science* 322: 275–278.
- Coman C, Chiriac CM, Robeson MS, Ionescu C, Dragos N, Barbu-Tudoran L, Andrei AS, Banciu HL, Sicora C, Podar M. 2015. Structure, mineralogy, and microbial diversity of geothermal spring microbialites associated with a deep oil drilling in Romania. *Front Microbiol* 6: 253.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie LE, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72: 5069–5072.
- Djokic T, Van Kranendonk MJ, Campbell KA, Walter MR, Ward CR. 2017. Earliest signs of life on land preserved in ca. 3.5 Ga hot spring deposits. *Nat Commun* 8: 15263.
- Dupraz C, Reid RP, Braissant O, Decho AW, Norman RS, Visscher PT. 2009. Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth Sci R* 96: 141–162.
- Edgar R. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 10: 996–998.

- Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460-2461.
- Einen J, Thorseth IH, Ovreås L. 2008. Enumeration of Archaea and Bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. *FEMS Microbiol Lett* 282: 182-187.
- Farias ME, Contreras M, Rasuk MC, Kurth D, Flores MR, Poire DG et al. 2014. Characterization of bacterial diversity associated with microbial mats, gypsum evaporites and carbonate microbialites in thalassic wetlands: Tebenquiche and La Brava, Salar de Atacama, Chile. *Extremophiles* 18: 311–329.
- Farias ME, Rascovan N, Toneatti DM, Albarracín VH, Flores MR, Poiré DG et al. 2013. The discovery of stromatolites developing at 3570 m above sea level in a high-altitude volcanic lake Socompa, Argentinean Andes. *PLoS ONE* 8: e53497.
- Ferrera I, Reysenbach AL. 2007. Thermophiles. eLS doi: 10.1002/9780470015902.a0000406.
- Foster JS, Green SJ, Ahrendt SR, Golubic S, Reid RP, Hetherington KL, Bebout L. 2009. Molecular and morphological characterization of cyanobacterial diversity in the stromatolites of Highborne Cay, Bahamas. *ISME J* 3: 573–587.
- Goh F, Allen MA, Leuko S, Kawaguchi T, Decho AW, Burns BP, Neilan BA. 2009. Determining the specific microbial populations and their spatial distribution within the stromatolite ecosystem of Shark Bay. *ISME J* 3: 383–396.
- González-Muñoz MT, De Linares C, Martínez-Ruiz F, Morcillo F, Martín-Ramos D, Arias, JM. 2008. Ca-Mg kutnahorite and struvite production by *Idiomarina* strains at modern seawater salinities. *Chemosphere* 72: 465–472.
- Hartzell P, Reed DW (2006) The Genus *Archaeoglobus*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E (eds). *The Prokaryotes*. Springer, USA, New York, pp. 82–100.
- Hayashi NR, Ishida T, Yokota A, Kodama T, Igarashi Y. 1999. *Hydrogenophilus thermoluteolus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic, hydrogen – oxidizing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 49: 83-786.
- Heijs SK, Aloisi G, Bouloubassi I, Pancost RD, Pierre C, Sinninghe-Damsté JS et al. 2006. Microbial community structure in three deep-sea carbonate crusts. *Microb Ecol* 52: 451–462.
- Hreggvidsson GO, Petursdottir SK, Stefansson SK, Björnsdottir SH, Fridjonsson OH. 2017. Microbial speciation in the geothermal ecosystem. In: Stan-Lotter H, Fendrihan S (eds). *Adaption of microbial life to environmental extremes*. Springer International Publishing, Cham, pp. 37-67.
- Hubalek V, Wu X, Eiler A, Buck M, Heim C, Dopson M et al. 2016. Connectivity to the surface determines diversity patterns in subsurface aquifers of the Fennoscandian Shield. *ISME J* 10: 2556.
- Inskeep WP, Rusch DB, Jay ZJ, Herrgard MJ, Kozubal MA, Richardson TH et al. 2010. Metagenomes from high-temperature chemotrophic systems reveal geochemical controls on microbial community structure and function. *PLoS ONE* 5: e9773.
- Itävaara M, Nyssönen M, Kapanen A, Nousiainen A, Ahonen L, Kukkonen I. 2011. Characterization of bacterial diversity to a depth of 1500 m in the Outokumpu Deep Borehole, Fennoscandian Shield: Deep Terrestrial Biodiversity. *FEMS Microbiol Ecol* 77: 295–309.
- Kamagata Y, Kawasaki H, Oyaizu H, Nakamura K, Mikami E, Endo G, Koga Y, Yamasato K. 1992. Characterization of three thermophilic strains of *Methanotherix* (“*Methanosaeta*”) *thermophila* sp. nov. and rejection of *Methanotherix* (“*Methanosaeta*”) *thermoacetophila*. *Int J Syst Bacteriol* 42: 463–468.
- Kieft TL. 2016. Microbiology of the deep continental biosphere. In: Hurst CJ (ed). *Their world: A diversity of microbial environments*, Springer, Cham, pp. 225–249.

- Kim JW, Kogure T, Yang K, Kim ST, Jang YN, Baik HS, Geesey G. 2012. The characterization of CaCO<sub>3</sub> in a geothermal environment: A SEM/TEM-EELS study. *Clay Clay Miner* 60: 484–495.
- Kimura H, Sugihara M, Yamamoto H, Patel BK, Kato K, Hanada S. 2005. Microbial community in a geothermal aquifer associated with the subsurface of the Great Artesian Basin, Australia. *Extremophiles* 9: 407–414.
- Konhauser K. 2007. Introduction of geomicrobiology. Blackwell Publishing Ltd. Maldon, Oxford, Carlton.
- Kristjansson JK, Hreggvidsson GO. 1995. Ecology and habitats of extremophiles. *World J Microbiol Biotechnol* 11: 17-25.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley & Sons, United Kingdom, Chichester, pp 115–175.
- Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepille DE, Thurber RLV, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C. 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* 8: 1-10.
- Lévêque E, Janecek S, Haye B, Belarbi A. 2000. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme Microb Technol* 26: 3–14.
- Lin LH, Wang PL, Rumble D, Lippmann-Pipke J, Boice E, Pratt LM et al. 2006. Long term biosustainability in a high energy, low diversity crustal biome. *Science* 314: 479.
- Lundberg DS, Yourstone S, Mieczkowski P, Jones CD, Dangl JL. 2013. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nat Methods* 10: 999–1002.
- Martins LO, Huber R, Huber H et al. 1997. Organic solutes in hyperthermophilic Archaea. *Appl Environ Microbiol* 63: 896-902.
- Menzel P, Gudbergssdottir SR, Rike AG, Lin L, Zhang Q, Contursi P, Moracci M, Kristjansson JK, Bolduc B, Gavrillov S, Ravin N, Mardanov A, Bonch-Osmolovskaya E, Young M, Krogh A, Peng X. 2015. Comparative metagenomes of eight geographically remote terrestrial hot springs. *Microb Ecol* 70: 411–424.
- Miller SR, Castenholz RW. 2000. Evolution of thermotolerance in hot spring cyanobacteria of the genus *Synechococcus*. *Appl Environ Microbiol* 66: 4222–4229.
- Miller SR, Williams C, Strong AL, Carvey D. 2009. Ecological specialization in a spatially structured population of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Appl Environ Microbiol* 75: 729-734.
- Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Nealson KH, Inagaki F, Takai K. 2005. Hydrogen driven subsurface lithoautotrophic microbial ecosystems (SliMEs): do they exist and why should we care? *Trends Microbiol* 13: 405-410.
- Nyysönen M, Hultman J, Ahonen L, Kukkonen I, Paulin L, Laine P et al. 2014. Taxonomically and functionally diverse microbial communities in deep crystalline rocks of the Fennoscandian shield. *ISME J* 8: 126–138.
- Onstott TC, Lin LH, Davidson M, Mislouck B, Borcsik M, Hall J et al. 2006. The origin and age of biogeochemical trends in deep fracture water of the Witwatersrand Basin, South Africa. *Geomicrobiol J* 23: 369–414.
- Oremland RS, Polcin S. 1982. Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol* 44: 1270–1276.

- Panda AK, Bisht SS, De Mantal S, Kumar NS. 2016. Bacterial and archeal community composition in hot springs from Indo-Burma region, North-east India. *AMB Expr* 6: 111.
- Pedersen K. 2000. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives. *FEMS Microbiol Lett* 185: 9–16.
- Purkamo L, Bomberg M, Kietäväinen R, Salavirta H, Nyssönen M, Nuppenen-Puputti M et al. 2016. Microbial co-occurrence patterns in deep Precambrian bedrock fracture fluids. *Biogeosciences* 13: 3091–3108.
- Rasuk CR, Kurth D, Flores MR, Contreras M, Novoa F, Poire D, Farias ME. 2014. Microbial characterization of microbial ecosystems associated to evaporites domes of gypsum in Salar de Llamara in Atacama desert. *Microb Ecol* 68: 483-494.
- Reyes-Escogido L, Balam-Chi M, Rodríguez-Buenfil I, Valdés J, Kameyama L, Martínez-Pérez F. 2010. Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 min using Chelex-100 microwave: examples from strains of lactic acid bacteria isolated from soil samples. *Antonie van Leeuwenhoek* 98: 465–474.
- Riding R. 2006. Microbial carbonate abundance compared with fluctuations in metazoan diversity over geological time. *Sediment Geol* 185: 229-238.
- Sabath N, Ferrada E, Barve A, Wagner A. 2013. Growth temperature and genome size in bacteria are negatively correlated, suggesting genomic streamlining during thermal adaptation. *Genome Biol Evol* 5: 966–977.
- Schauder R, Preug A, Jetten M, Fuchs G. 1989. Oxidative and reductive acetyl CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway in *Desulfobacterium autotrophicum*: 2. Demonstration of the enzymes of the pathway and comparison of CO dehydrogenase. *Arch Microbiol* 151: 84–89.
- Schrenk MO, Brazelton WJ, Lang SQ. 2013. Serpentinization, carbon and deep life. *Rev Miner Geochem* 75: 575-606.
- Schulze-Makuch D, Lim DSS, Laval B, Turse C, Antonio MRS, Chan O et al. 2013. Pavilion Lake microbialites: morphological, molecular, and biochemical evidence for a cold-water transition to colonial aggregates. *Life* 3: 21–37.
- Sharp CE, Brady AL, Sharp GH, Grasby SE, Stott MB, Dunfield PF. 2014. Humboldt's Spa: Microbial diversity is controlled by temperature in geothermal environments. *ISME J* 8: 1166–1174.
- Sherwood-Lollar B, Voglesonger K, Lin LH, LaCrampe-Couloume G, Telling J, Abrajano TA et al. 2007. Hydrologic controls on episodic H<sub>2</sub> release from Precambrian fractured rocks – energy from deep subsurface life on Earth and Mars. *Astrobiology* 7: 971-986.
- Sonne-Hansen J, Ahring BA. 1997. Anaerobic microbiology of an alkaline Icelandic hot spring. *FEMS Microbiol Ecol* 23: 31 – 38.
- Stal LJ. 2012. Cyanobacterial mats and stromatolites. In: Whitton BA (ed). *The Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time*, Springer, The Netherlands, pp. 65 – 125.
- Stan-Lotter H. 2017. Physiological boundaries of life. In: Stan-Lotter H, Fendrihan S (eds). *Adaptation of microbial life to environmental extremes*. Springer International Publishing, pp. 1-21.
- Stetter KO. 1986. Diversity of extremely thermophilic archaeobacteria. In: Brock TD (ed). *Thermophiles: General, molecular and applied microbiology*. John Wiley & Sons, New York, pp. 39-45.
- Stetter KO. 2006. Hyperthermophiles in the history of life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1837-1843.
- Stetter, K.O. 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett* 452: 22–25.
- Stevens TO, McKinley JP. 1995. Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science* 270: 450–454.

- Suenaga E, Nakamura H. 2005. Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 820: 137–141.
- Takai K, Nakamura K, Toki T, Tsunogai U, Miyazaki M, Miyazaki J, Hirayama H, Nakagawa S, Nunoura T, Horikoshi K. 2008. Cell proliferation at 122 °C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10949–10954.
- Țenu A. 1981. Zăcămintele de ape hipertermale din Nord-Vestul României București, Editura Academiei Republicii Socialiste România, București.
- Trivedi S, Rao SR, Gehlot HS. 2005. Nucleic acid stability in thermophilic prokaryotes: a review. *J Mol Cell Biol* 4: 61–69.
- Urbietta MS, Donati ER, Chan KG, Shahar S, Sin LL, Goh KM. 2015. Thermophiles in the genomic era: biodiversity, science and applications. *Biotechnol Adv* 33: 633-647.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol Evol* 24: 110–117.
- Vasconcelos C, Warthmann R, McKenzie JA, Visscher PT, Bittermann AG, van Lith Y. 2006. Lithifying microbial mats in Lagoa Vermelha, Brazil: Modern Precambrian relics? *Sediment Geol* 185: 175-183.
- Visscher PT, Stolz JF. 2005. Microbial mats as bioreactors: populations, processes, and products. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 215: 87-100.
- Wang S, Hou W, Dong H, Jiang H, Huang L, Wu G, Zhang C, Song Z, Ren H, Zhang J, Zhang L. 2013. Control of temperature on microbial community structure in hot springs of the Tibetan Plateau. *PLoS ONE* 8: e62901.
- Ward DM, Castenholz RW. 2000. Cyanobacteria in geothermal habitats. In: Whitton BA, Potts M (eds). *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 37–59.
- Wasserfallen A, Nölling J, Pfister P, Reeve J, Conway de Macario E. 2000. Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 43–53.
- Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW. 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301: 976–978.
- Widdel F. 2006. The Genus *Desulfotomaculum*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E (eds). *The Prokaryotes*. Springer, New York, pp. 787–794.
- Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng* 89: 670-679.