

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

**PROCARIOTELE DIN GRUPUL ASGARDARCHAEOTA
EVIDENȚIATE ÎN SAPROPELURI SĂRATE OFERĂ O NOUĂ
PERSPECTIVĂ ASUPRA ORIGINII EUCARIOTELOR**

– REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT –

**Student doctorand:
Paul-Adrian BULZU**

**Coordonator științific:
Prof. Dr. Horia Leonard BANCIU**

**CLUJ-NAPOCA
2019**

Cuprins

Prefață.....	3
Lista abrevierilor.....	4
Capitolul I: Introducere generală.....	5
1.1 Eucariogeneza.....	6
1.2 Apariția bacteriilor, arceelor și a eucariotelor	8
1.3 Fagocitoza ca declanșator al eucariogenezei	10
1.4 O listă a genomurilor de Asgardarchaeota	12
1.5 Distribuția geografică și mediul de viață al Asgardarchaeota	13
1.6 Filogenomica Asgardarchaeotelor	14
1.7 Proteinele-marker pentru eucariote (ESP) sunt abundente în Asgardarchaeota.....	15
1.8 Microorganisme cu versatilitate metabolică.....	16
1.9 Scopurile tezei	19
Capitolul II: Iluminând diversitatea microbială și funcțiile lor în sapropeluri saline	20
1. Introducere	20
2. Materiale și metode	21
2.1 Locații pentru prelevarea probelor și metodologie.....	21
2.2 Analize chimie ale sedimentelor.....	23
2.3 Extracția, purificarea și concentrarea ADN.....	23
2.4 Secvențierea și procesarea datelor	24
2.5 Estimarea abundenței procariotelor	25
2.6 Asamblarea metagenomurilor.....	25
2.7 Analiza filogenetică a genelor pentru ARN ribozomal din subunitatea mică	25
3. Rezultate și discuții	26
3.1 Diversitatea și predicția funcțională a bacteriilor	28
3.2 Diversitatea și predicția funcțională a arceelor.....	35
3.3 Diversitatea și predicția funcțională a eucariotelor	39
4. Concluzii.....	43
5. Mulțumiri.....	44
Capitolul III: Iluminând metabolismul Asgardarchaeota într-o nișă microoxică însoțită	45
1. Introducere	45
2. Materiale și metode	45
2.1 Prelevarea probelor	45
2.2 Analize chimice ale sedimentelor	46
2.3 Extracția și secvențierea ADN.....	47
2.4 Asamblarea metagenomurilor și partajarea genomurilor	47
2.5 Adnotarea genomurilor.....	48
2.6 Arbori filogenetici	49

2.7 Alinierea multiplă a secvențelor rodopsinelor	50
2.8 Construirea arborilor pentru RuBisCO	50
2.9 Construirea arborilor pentru primaze	50
2.10 Filogenii ale glucokinazelor și căii kynureninei	51
2.11 Estimarea abundențelor pentru Loki- și Heimdallarchaeia	51
2.12 Distribuția în mediu a Heimdallarchaeia	51
3. Rezultate și discuții	52
3.1 Analize chimice ale sedimentelor	52
3.2 Filogenomica grupului Asgardarchaeota	52
3.3 Identificarea unei clase noi de rodopsine în Asgardarchaeota	57
3.4 Proteine-marker pentru eucariote identificate în Asgardarchaeota	62
3.5 Primaza specifică eucariotelor în Heimdallarchaeia	63
3.6 Reconstituiri ale căilor metabolice	65
3.7 Distribuția în mediu a Heimdallarchaeia	75
4. Concluzii	75
5. Mulțumiri	76
Capitolul IV: Vizualizarea Loki- și Heimdallarchaeia (Asgardarchaeota) prin hibridizare cu fluorescență <i>in situ</i> și depunere catalizată de reporter (CARD-FISH)	77
1. Introducere	77
2. Materiale și metode	77
3. Rezultate și discuții	81
4. Concluzii	83
5. Mulțumiri	84
Capitolul V: Concluzii generale și perspective	85
1. Concluzii generale	85
2. Perspective	86
Bibliografie	87
Anexe	109
Lista publicațiilor incluse în teză sub formă de capitole	132
Lista publicațiilor neincluse în teză	132
Lista participărilor în cadrul conferințelor	133
Lista participărilor ca membru în proiecte de cercetare	134
Mulțumiri generale	135

Lista abrevierilor

AAI	–	identitatea medie a aminoacizilor
ATP	–	adenozin trifosfat
BLAST	–	ustensila simplă de căutare bazată pe alinierea locală
bp	–	perechi de baze
CARD	–	depunere catalizată de reporter
CoA	–	coenzima A
CPR	–	radiația încregăturilor candidate
ESP	–	proteine-marker pentru eucariote
FECA	–	Primul Strămoș Eucariot Comun
FISH	–	hibridizare cu fluorescență <i>in situ</i>
Ga	–	miliarde de ani în urmă
ISO	–	Organizația Internațională pentru Standardizare
kbp	–	mii de perechi de baze
LACA	–	Ultimul Strămoș Archeal Comun
LECA	–	Ultimul Strămoș Eucariot Comun
LGT	–	transfer lateral de gene
LUCA	–	Ultimul Strămoș Universal Comun
Ma	–	milioane de ani în urmă
MAG	–	genom asamblat prin metagenomică
Mbp	–	milioane de perechi de baze
NAD	–	nicotinamid adenin dinucleotid
NGS	–	secvențiere de ultimă generație
nt	–	nucleotide
ORF	–	cadru de citire deschis
PCR	–	reacția înlănțuită de polimerizare
RT	–	temperatura camerei
SAG	–	genom amplificat dintr-o singură celulă
SAR	–	Stramenopile, Alveolata, Rhizaria (supragrup)
SMTZ	–	zona de tranziție sulfat-metan
SSU	–	subunitate mică (ARN ribozomal)
TCA	–	ciclul acizilor tricarboxilici
THF	–	tetrahidrofuran
WGS	–	Whole Genome Shotgun (metodă de secvențiere)
WL	–	Wood-Ljungdahl (cale metabolică)

Cuvinte cheie: Asgardarchaeota, CARD-FISH Asgard, calea kinureninei, eucariogeneza, protoeucariot, schizorodopsina, sedimente sărate

Capitolul I: Introducere generală

[Capitolul I a fost parțial publicat ca: Bulzu, P.-A., Cristea, A., Buda, D.M., Banciu, H.L. (2019). 'Asgardarchaeota – a novel prokaryotic group discovered in aquatic sediments that might shed light on the origin and early evolution of eukaryotes'. *Aerul și Apa: Componente ale Mediului/ Air and Water: Components of the Environment*, ISSN 2067-743X. pp. 435-446. doi: 10.24193/AWC2019_43]

Apariția eucariotelor, urmată de diversificarea lor rapidă, este considerată ca fiind unul dintre evenimentele majore din istoria vieții (Adl *et al.*, 2012; López-García and Moreira, 2015). Deși observațiile recente așează eucariotele în vârful evoluției celulare, ca rezultatul unei interacțiuni timpurii între o gazdă archeală (Eme *et al.*, 2017) și un endosimbiont alfa-proteobacterian (Martijn *et al.*, 2018), întrebări privind identitatea exactă și natura partenerului archeal încă persistă (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017; Da Cunha *et al.*, 2018; Spang *et al.*, 2018).

Descoperirea procariotelor din linia Lokiarchaeia pe baza metagenomicii și plasarea lor evolutivă ca strămoși direcți ai eucariotelor - o poziție deținută anterior de membrii supraîncrengăturii TACK (compusă din încrengăturile Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota și Korarchaeota) (Guy and Ettema, 2011) - a accentuat dezbaterea deja reaprinsă privind topologia Arborelui Vieții (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017; Da Cunha *et al.*, 2018; Spang *et al.*, 2018). Această descoperire a fost imediat urmată de alte trei încrengături archeale candidate (Odin, Thor și Heimdallarchaeia), care împreună cu Lokiarchaeia, formează recent-definita supraîncrengătura Asgardarchaeota sau "archeele Asgard", numită după zei din mitologia scandinavă (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017).

Distribuția geografică a supraîncrengăturii Asgardarchaeota: La data scrierii acestei teze (ianuarie 2019), inventarul membrilor Asgardarchaeota a constat din 27 de genomuri asamblate prin metagenomică (MAG) depuse în baza de date NCBI Genome, 3 în baza de date MG-RAST și 35 de genomuri nepublicate, raportate într-un articol sub formă de preprint (Bulzu *et al.*, 2018). Cele șaiszeci și cinci de MAG-uri includ 10 Heimdallarchaeia, 29 Lokiarchaeia, 25 Thorarchaeia și un genom din Odinararchaeia. După descoperirea Lokiarchaeia (Spang *et al.*, 2015) în sedimentele marine din Dorsala Atlantică Arctică, archeele Asgard au fost identificate într-o gamă variată de medii caracterizate prin parametri biologici și chimici diferiți (Spang *et al.*, 2015; Seitz *et al.*, 2016; Dombrowski *et al.*, 2017; Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017; Y. Liu *et al.*, 2018; Tully, Graham and Heidelberg, 2018). Cu toate că prezența Asgardarchaeota este frecvent dedusă exclusiv pe baza genelor pentru ARNr 16S sau a contigurilor individuale (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2018), lista locațiilor geografice care au produs genomuri mai mult sau mai puțin complete este semnificativ mai scurtă (Figura 1).

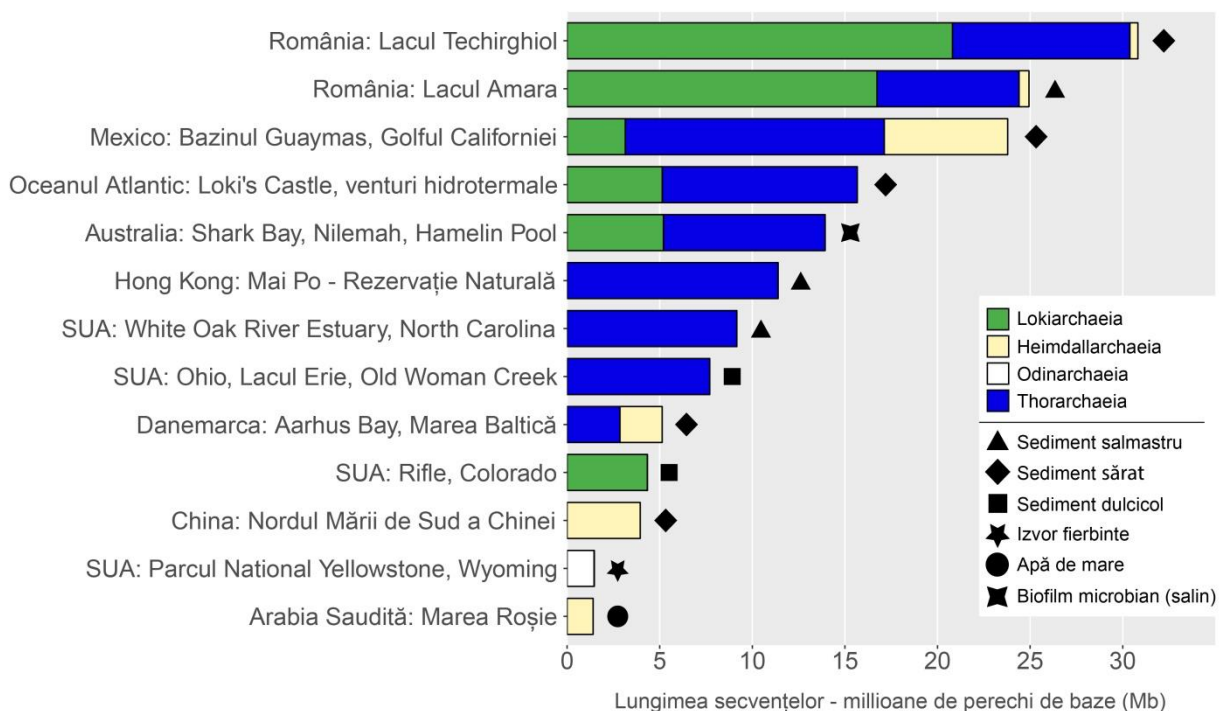


Figura 1. Principalele locații geografice de eșantionare care au generat MAG-uri de Asgardarchaeota. Lungimea însumată a contigurilor este reprezentată prin barele orizontale, împărțite în funcție de afilierea taxonomică. Taxonomia și mediile de viață sunt indicate în legendă.

Filogenomica supraîncręgăturii Asgardarchaeota: Puținele studii disponibile referitoare la poziționarea filogenetică a liniilor evolutive din Asgardarchaeota, față de eucariote și alte archee și-au formulat concluziile pe baza analizelor bazate pe: 1) gene codificatoare de ARNr 16S și 23S utilizate individual sau sub formă concatenată (Spang *et al.*, 2015; Seitz *et al.*, 2016; Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017; Y. Liu *et al.*, 2018), 2) proteine ribozomale concatenate conservate între archee și eucariote (Spang *et al.*, 2015; Seitz *et al.*, 2016; Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017; Y. Liu *et al.*, 2018) și 4) gene-marker individuale – „proteine-marker pentru eucariote” (abreviat ca ESP) (Spang *et al.*, 2015; Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017; Akıl and Robinson, 2018; acest studiu) sau alți markeri relevanți cum ar fi factorul de elongare 2 (EF-2) (Narrowe *et al.*, 2018).

Proteinele ESP sunt abundente în archeele Asgard: Studiul genomilor de Asgardarchaeota a relevat cel mai mare număr de gene codificatoare de proteine ESP (Hartman and Fedorov, 2002) detectate în domeniul Archaea (Spang *et al.*, 2015, 2018; Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017). Genele ESP identificate codifică omologi ai proteinelor eucariote care acționează în menținerea integrității și a traficului membranelor, sortarea endozomală, structura ribozomului, N-glicozilare, ubiquitinarea proteinelor, structura și dinamica citoscheletului (de exemplu: profilina, actina, gelsolina, foliculina) (Spang *et al.*, 2015; Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017; Y. Liu *et al.*, 2018).

Microorganismele cu versatilitate metabolică: Se anticipează că informațiile privind structura celulară fină și capacitățile metabolice ale Asgardarchaeota vor ajuta la testarea ipotezelor concurente privind originea eucariotelor (Koonin, 2015; Sousa *et al.*, 2016; Bernard *et al.*, 2018) oferind în cele din urmă perspective valoroase privind tranziția *Archaea-Eukaryota*. Cu toate acestea, în lipsa unor reprezentanți cultivabili, acest demers științific s-a bazat exclusiv pe abordările metagenomice independente de cultivare.

Scopurile tezei

În lumina celor mai recente studii, eucariotele sunt prezentate ca rezultatul unei interacțiuni dintre o gazdă archeală care împărtășește strămoși comuni cu membri actuali ai grupului Asgardarchaeota și un endosimbiont din cadrul alfa-proteobacteriilor care, în cele din urmă, a dat naștere mitocondriei. De la descoperirea lor inițială în vecinătatea unor venturi hidrotermale fierbinți din Atlanticul de Nord, mai multe genomuri ale archeelor din grupul Asgard au fost recuperate dintr-o gamă largă de medii de viață prin abordări bazate pe secvențierea de ultimă generație. În ciuda acestui fapt, numărul redus de genomuri recuperate și natura incompletă a celor disponibile au împiedicat încercările anterioare de a efectua caracterizări filogenetice sau metabolice detaliate pentru acest grup. Este important de menționat faptul că grupul Asgard de arhee a devenit subiectul central al acestei teze ca urmare a detectării lor în sedimentele bogate în materie organică (sapropeluri) din lacurile Amara și Techirghiol, în faza exploratorie a investigațiilor noastre.

Obiectivele principale ale acestei teze au fost:

1. Descrierea și compararea diversității microbiene și implicarea dedusă în procesele biogeochimice care probabil se desfășoară în sapropelurile a trei lacuri românești cu salinități foarte diferite (**Capitolul II**).
2. Clarificarea istoriei evolutive a Asgardarchaeotelor în relație cu eucariotele, alte grupe de arhee și între diferitele linii evolutive care compun această supraîncrengătură (**Capitolul III**).
3. Elucidarea rețelelor metabolice și a trăsăturilor celulare asemănătoare celor eucariote ale liniilor evolutive din cadrul Asgardarchaeota (**Capitolul III**).
4. Să fundeze primele imagini ale celulelor de Asgardarchaeota folosind metoda CARD-FISH (**Capitolul IV**).

Capitolul II: Iluminând diversitatea și funcționalitatea microbiană în sapropeli sărate

[Acest capitol există în prezent sub forma unui manuscris aflat în pregătire; părți din secțiunea Metode din cadrul acestui capitol au fost publicate ca: Bulzu, P.-A., Andrei, A.-Ș., Salcher, M. M., Mehrshad, M., Inoue, K., Kandori, H., Beja, O., Ghai, R. and Banciu, H. L. (2019) 'Casting light on Asgardarchaeota metabolism in a sunlit microoxic niche', *Nature Microbiology*. doi: 10.1038/s41564-019-0404-y.

1. Introducere

Cu toate că nu există un consens între diferitele ramuri ale specialiștilor din domeniul științelor mediului, termenul "sapropel" (gr., *sapros* = putrezit, *pelos* = sol) (Stein, 2014) este folosit în general pentru a descrie sedimente îmbogățite cu carbon organic (> 2% din greutatea uscată), de culoare închisă și cu granulație fină formate în corpuri de apă cu stratificație și condiții reducătoare (Kidd, Cita and Ryan, 1978; de Lange and ten Haven, 1983; Stein, 2014). Sapropelurile se acumulează în mod tipic în corpurile de apă în care rămășițele detritice ale macrofitelor acvatice și / sau terestre, fitoplanctonul și zooplanctonul sunt supuse unor transformări complexe mediate de microorganisme anaerobe și amestecate cu particule minerale fine (de exemplu, carbonați, silicați) (Stankevica *et al.*, 2015; Yermolaeva *et al.*, 2016). În timp ce studiile focalizate asupra sapropelurilor marine străvechi au evidențiat ansambluri microbiene caracteristice biosferei subterane (Sass and Parkes, 2011; Parkes *et al.*, 2014), există puține informații privind comunitățile microbiene care se dezvoltă în sapropeli saline formate recent. În această privință, tehnicile de ultimă generație independente de cultivare, cuplate cu analize fizico-chimice detaliate, au potențialul de a dezvălui diversitatea, structura și rolurile biogeochimice ale acestor organisme. În acest studiu ne-am propus să investigăm diversitatea microbiană și rolul microorganismelor identificate în geneza sedimentelor îmbogățite cu materie organică din trei lacuri românești cu caracteristici distincte.

2. Materiale și metode

Amara, Techirghiol și Ursu sunt lacuri românești formate în mod natural și caracterizate prin salinități, regimuri hidrice, nivel de eutrofizare, climat local și mecanisme de geneză care diferă semnificativ între acestea (Alexe, 2010; Gheorghievici *et al.*, 2012). În mod deosebit, toate cele trei lacuri au depozite mari de sedimente bogate în materie organică (sapropeli), reprezentând astfel modele potrivite pentru descifrarea diversității microbiologice implicate în propria lor geneză.

Eșantionarea sedimentelor: a fost efectuată pentru analizele chimice și metagenomice în lacurile Techirghiol, Amara și Ursu din România. În Lacul Techirghiol, prelevarea de probe a fost efectuată în zona de mică adâncime a malului folosind un probator pentru sedimente realizat la comandă, în timp ce în lacurile Amara și Ursu, adâncimea crescută a apei nu a permis folosirea acestui probator manual, prin urmare, prelevarea de probe fiind efectuată cu o dragă Petite Ponar (Wildco, Saginaw, MI, SUA).

Extracția ADN-ului ambiental: a fost efectuată din probele de sapropel utilizând un kit de izolare dedicat, conform instrucțiunilor furnizate de producător.

Secvențierea ADN prin metoda “Whole Genome Shotgun” (WGS): a fost efectuată de o companie comercială. Cantitatea totală de date brute de secvențiere generată pentru fiecare metagenom a fost: 64,5 Gbp - Amara, 57,6 Gbp - Techirghiol și 59,6 Gbp - Ursu.

Evaluarea diversității microbiene și estimarea abundenței relative: Seturile pre-procesate rezultate după secvențierea WGS Illumina au fost submulțite în mod aleatoriu iar secvențele putativ codificatoare de ARN al subunității mici ribozomale au fost interogate în fiecare subset prin scanarea cu UBLAST (Edgar, 2010) față de cea mai recentă versiune a bazei de date non-redundante SILVA (v.132, grupate la o identitate de 85%) (Pruesse *et al.*, 2007). Secvențele asociate astfel genelor codificatoare de ARNr 16S și 18S au fost comparate utilizând programul blastn (Altschul *et al.*, 1990) (valoare $e < 1e-5$) față de baza de date SILVA (v. 132, grupată la o identitate de 99%). Secvențele atribuite principalelor încregături procariote au fost utilizate pentru a calcula abundențele lor (exprimate ca procent “%” din totalul secvențelor corespunzătoare ARNr de tip 16S sau 18S) în mediile lor de viață.

Asamblarea și adnotarea secvențelor genelor ARNr din subunitatea mică: Seturile pre-procesate de secvențiere în perechi Illumina generate pentru toate cele trei probe au fost asamblate *de novo* utilizând programul Megahit (Li *et al.*, 2016) v.1.1.1 cu parametrii implicați și următoarea listă de k-meri: 39, 49, 69, 89, 109, 129, 149. Secvențele codificatoare de ARN ribozomal au fost extrase din contiguri folosind SSU-ALIGN (Nawrocki, 2009), filtrate în funcție de lungime și încărcate în aplicația online SILVA SINA pentru aliniere și clasificare (Pruesse, Peplies and Glockner, 2012). Fișierele conținând rezultatele clasificării taxonomice au fost salvate iar alinierea conținând atât secvențele originale cu care s-a realizat interogarea cât și cele identificare ca fiind învecinate au fost utilizate în continuare pentru a construi arbori filogenetici folosind algoritmul “maximum-likelihood” implementat în programul IQ-TREE (Nguyen *et al.*, 2015).

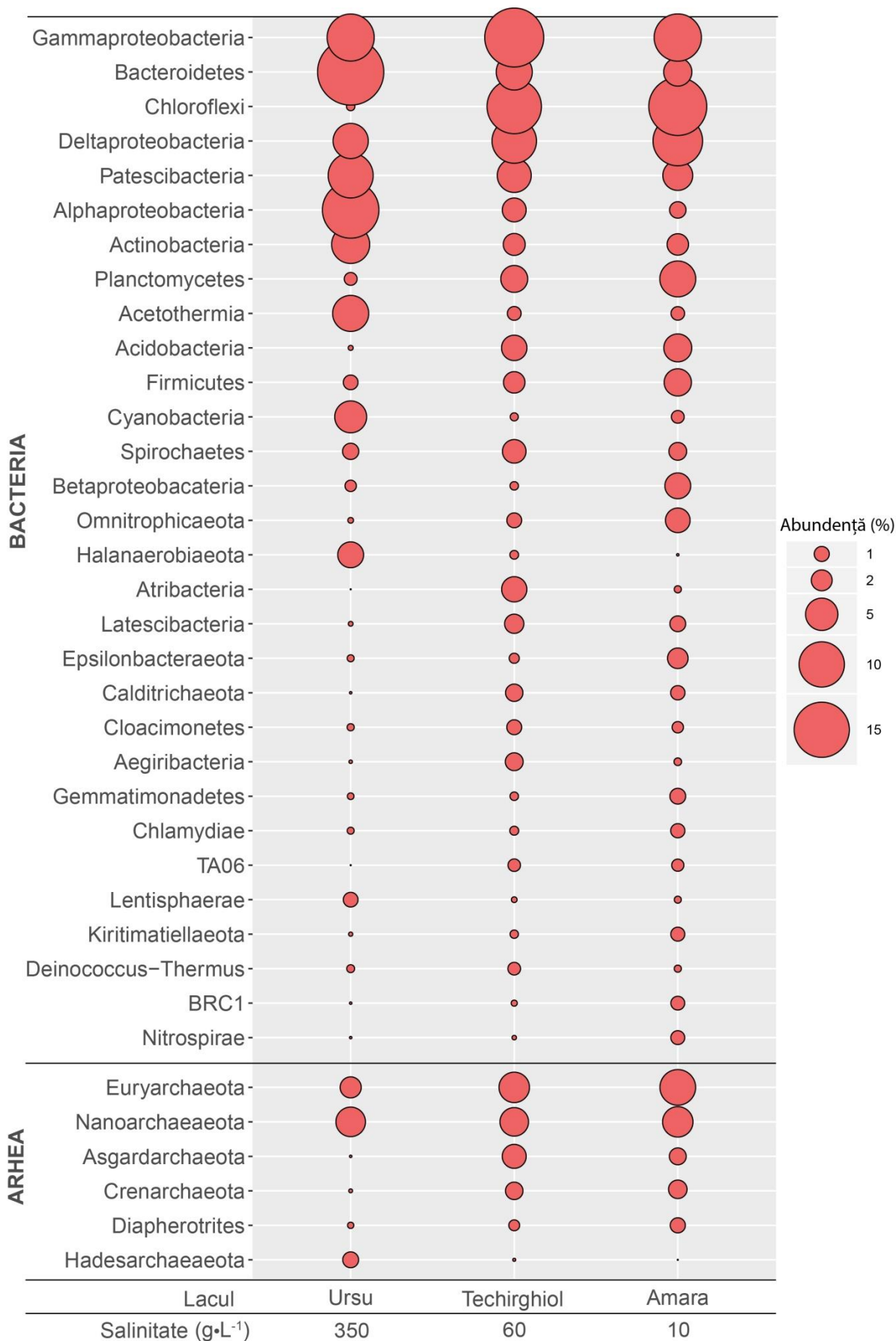


Figura 2. Abundențele relative ale încregăturilor (și claselor din cadrul Proteobacteria) ce constituie $\geq 0.5\%$ din comunitatea microbiană în cel puțin un set de date, estimate pe baza secvențelor scurte, neasamblate, de ARNr al subunității mici.

3. Rezultate și concluzii

Clasificările taxonomice realizate pe baza fragmentelor genei ARNr 16S din secvențele metagenomice neasamblate au evidențiat prezența a 34 de încregături procariote distincte (28 din domeniul Bacteria și 6 din domeniul Archaea) cu abundențe relative estimate de $\geq 0,5\%$ în cel puțin unul dintre cele trei sapropeluri eșantionate (Figura 2).

Structura și compoziția comunităților microbiene din sapropeluri reflectă proprietățile limnologice distincte caracteristice fiecărui lac eșantionat. Frațiunile procariote în toate sapropelurile au fost dominate de bacterii, judecând atât după abundența relativă generală, precum și în funcție de diversitatea încregăturilor. Cu toate acestea, o tendință crescătoare pentru prezența archeelor a fost vizibilă în sens cu scăderea salinităților: 7,5% în Ursu, 12,8% în Techirghiol și 14,3% în sapropelul din Amara. Au fost identificate mai multe încregături procariote fără reprezentanți izolați în toate cele trei eșantioane.

În mod deosebit, dovezile de la nivelul genelor codificatoare de ARNr 16S pentru prezența archeelor enigmatice din grupul Asgard în sapropelurile lacurilor Amara și Techirghiol au impus investigații genomice detaliate focalizate asupra lor, publicate în prezent sub forma unui studiu separat (Bulzu *et al.*, 2019). Indiferent de valorile salinităților, inferențele eco-fiziologice au demonstrat că micoorganismele prezente în sapropeluri sunt implicate în principal în degradarea materiei organice și ciclul sulfului.

Eucariotele au fost clasificate pe baza secvențelor de gene ARNr 18S detectate în probele de sapropel. Grupele taxonomice identificate au acoperit toate nivelurile trofice, variind de la alge verzi și macrofite la macronevertebrate. Influxul materiei organice alohtone provenite de la plantele circumlacustre și cel din algele autohtone și / sau macronevertebrate în procesul de formare a sapropelului a fost confirmată tot prin această abordare. Remarcabil, majoritatea taxonilor eucarioți identificați în sapropeluri sunt specifici coloanei de apă fiind dependenți de lumină și / sau de prezența oxigenului, fapt care indică prezența condițiilor favorabile de conservare a ADN-ului organismelor moarte. Organisme potențial autohtone sapropelului au fost fungii și nevertebratele detritivore bentice care au capacitatea de a interacționa cu comunitățile procariote locale facilitând astfel descompunerea materiei organice.

Capitolul III: Iluminând metabolismul Asgardarchaeota într-o nișă microoxică însorită

[Acest capitol a fost publicat parțial ca: Bulzu, P.-A., Andrei, A.-Ș., Salcher, M. M., Mehrshad, M., Inoue, K., Kandori, H., Beja, O., Ghai, R. and Banciu, H. L. (2019) 'Casting light on Asgardarchaeota metabolism in a sunlit microoxic niche', *Nature Microbiology*. ISSN: 2058-5276, doi: 10.1038/s41564-019-0404-y.]

1. Introducere

Descoperirea archeelor Asgard, cele mai apropiate rude existente ale eucariotelor, cunoscute până în prezent, a reaprins dezbaterile privind existența a numai două domenii ale vieții. Deși este evident că arceele Asgard codifică multiple proteine specifice eucariotelor, lipsa informațiilor genomice și a investigațiilor la nivel de metabolism au împiedicat realizarea inferențelor privind cel mai apropiat strămoș eucariot și a peisajului metabolic care a pus bazele apariției arhitecturii subcelulare distinctiv eucariote. Am utilizat tehnici de ultimă generație din domeniul metagenomicii, analize filogenetice sensibile și reconstituiri metabolice la scară genomică, cu scopul de a ilumina înrudirea îndepărtată cu strămoși archeali ai eucariotelor.

2. Materiale și metode

Eșantionare: Amara și Techirghiol sunt lacuri de mică adâncime din sud-estul României ce conțin depozite mari de sedimente bogate în materie organică (numite "sapropeluri"). Sedimentul pentru analizele chimice și metagenomice exploratorii a fost colectat în lacurile Tekirghiol și Amara în octombrie 2017. Succesul recuperării genomurilor de Asgardarchaeota a impus o a doua campanie de prelevare de probe pentru analize chimice detaliate în aprilie 2018, în Lacul Techirghiol, pe locul prelevării probei din prima campanie.

Analizele chimice ale sedimentelor: au fost efectuate pentru ambele eșantioane omogenizate (0-40 cm Techirghiol și 0 - 10 cm Amara) colectate în 2017 și pentru profilul vertical obținut din lacul Techirghiol în 2018.

Extracția și secvențierea ADN-ului ambiental: ADN-ul a fost extras din aproximativ 10 g de probă umedă de sediment omogenizat (0-40 cm Techirghiol și 0-10 cm Amara) colectat în 2017, utilizând kitul de izolare DNeasy PowerMax (Qiagen, Hilden, Germania).

Asamblarea și partajarea metagenomurilor: Asamblarea *de novo* a seturilor de perechi de secvențe scurte pre-procesate rezultate în urma secvențierii Illumina a fost realizată folosind programul Megahit (Li *et al.*, 2015) v.1.1.1 cu parametri implicați. Contigurile asamblate au fost supuse partajării folosind o combinație de metode dependente și independente de taxonomie. Gradul de recuperare și contaminarea binurilor genomice au fost estimate folosind programul

CheckM (Parks *et al.*, 2015). Binurile genomice, cu un nivel de recuperare estimat de peste 10% și o contaminare sub 3%, au fost considerate genomuri asamblate prin metagenomică (MAG).

Adnotarea genomurilor: Secvențele codificatoare de proteine au fost prezise *de novo* cu Prokka (Seemann, 2014) pentru toate MAG-urile de Asgard disponibile (35 din acest studiu, 14 descărcate din baza de date NCBI / Genome). Inferențele metabolice au fost ghidate de adnotările funcționale KEGG. InterProScan (v.5.25) (Jones *et al.*, 2014) a fost utilizat pentru a adnota domeniile proteice. Potențialele proteine ESP au fost identificate pe baza listelor publicate anterior (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017).

Arbori filogenetici: Au fost luați în considerare 131 de taxoni pentru analize filogenetice ale genelor pentru ARN ribozomal al subunității mici (SSU) și subunității ribozomale mari (LSU). Pentru analize filogenomice ale proteinelor ribozomale concatenate au fost considerați 93 de taxoni. Secvențele pentru ARNr, precum și cele ale proteinelor au fost aliniat independent folosind PRANK (Loytynoja, 2014), curățate de breșe folosind BMGE (Criscuolo and Gribaldo, 2010) și concatenate în cadrul fiecărui tip de secvență (ARNr sau proteină). Filogeniile de tip “maximum-likelihood” au fost deduse folosind IQ-TREE cu bootstrapping ultrarapid (-bb 1000) și testare statistică (-alrt 1000) (Nguyen *et al.*, 2015; Hoang *et al.*, 2018). Filogenii de tip Bayesian au fost construite folosind PhyloBayes MPI 1.8 (Lartillot *et al.*, 2013), cu modelul evolutiv CAT-Poisson.

Alinierea multiplă a secvențelor rodopsinelor: Cele trei grupe de rodopsine (tipul-1, schizorodopsine și heliorodopsine) au fost aliniat primele folosind T_Coffee (Notredame *et al.*, 2000) în modul exact, acest program utilizând informații despre structura proteinelor oriunde există, sau comparații ale secvențelor cu omologii lor din bazele de date pentru a crește acuratețea. Aceste alinieri individuale au fost aliniat între ele folosind opțiunea de aliniere a profilurilor în T_Coffee.

Reconstrucția arborelui pentru RuBisCO: MUSCLE (Edgar, 2004) a fost utilizat pentru alinierea secvențelor ($n = 146$) subunităților mari ale enzimelor RuBisCO (tipurile I-III) și RuBisCO-like (tip IV) (*rbcL*, K01601). Secvențele care nu au fost generate în acest studiu au fost recuperate din studii anterioare (Tabita *et al.*, 2007; Wrighton *et al.*, 2016). Arborii filogenetici au fost construiți prin metoda “maximum-likelihood” cu FastTree2 (Price, Dehal and Arkin, 2010) folosind un model JTT, aproximare gamma și 100 de iterații de bootstrapping.

Construcția arborilor pentru primaze: Toate genomurile de Archaea ($n = 3242$; 1 martie 2019) au fost descărcate din secțiunea NCBI Genome. În plus, 22 de secvențe de proteine

eucariote pentru subunitățile mică (PriS) și mare (PriL) ale ADN primazei au fost preluate din baza de date UniProt (<https://www.uniprot.org/>). InterProScan a fost utilizat local pentru a adnota proteinele prezise. Secvențele conținând domenii care aparțin subunităților primazei au fost extrase din proteomurile prezise. Cele două subseturi au fost aliniate folosind PRANK (-protein + F). Arbori filogenetici au fost generați prin metoda “maximum-likelihood” pentru fiecare subunitate utilizând IQ-TREE (-bb 1000, -alrt 1000) cu bootstrapping ultrarapid.

Filogenii pentru glucokinaze și calea kinureninei de la Heimdallarchaea: Secvențele de fosfofructokinază / glucokinază dependente de ADP au fost identificate pe baza numărului KO atribuit (K00918), în 3 MAG-uri (AMARA_4, Heimdall_AB_125, Heimdall_LC_3). Secvențele recuperate au fost utilizate împreună cu alte 49 de kinaze ale glucidelor publicate într-un studiu anterior (Castro-Fernandez *et al.*, 2017). Secvențele de aminoacizi ale enzimelor din calea kinureninei - 2,3-dioxigenaza (TDO), kinurenin 3-monooxygenaza (KMO) și 3-hidroxantranilat 3,4-dioxigenaza (HAAO) - identificate numai în MAG-uri de Heimdallarchaea au fost utilizate alături de secvențele corespunzătoare acestor enzime din 12 genomuri eucariote și 15 de bacterii recuperate din baza NCBI RefSeq. MAFFT-L-INS-i (Katoh, 2002) (parametrii implicați) și PRANK (parametrii: -PROTEIN + F) au fost utilizate pentru alinierea secvențelor enzimelor, urmate de îndepărtarea breșelor folosind BMGE (-m BLOSUM30 -t AA -g 0.5 -b 3). Arbori filogenetici au fost construiți pentru fiecare enzimă prin metoda “maximum-likelihood” folosind FastTree2 cu 100 de iterații standard de bootstrapping.

3. Rezultate și discuții

Analiza chimică a sedimentelor: Analiza conținutului de săruri solubile în apă din sedimentele lacurilor Techirghiol (0-40cm) și Amara (0-10cm) a indicat cationii și anionii dominanți ($\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$): Na^+ (16,5 și 7,0), K^+ (1,0 și 0,22), Mg^{2+} (1,1 și 4,0), Cl^- (27,7 și 11,2) și SO_4^{2-} (0,25 și 13,2).

Analize filogenomice pentru Asgardarchaeota: Interogările bazate pe omologii au fost utilizate pentru a recupera contiguri asociate cu Asgardarchaeota din metagenomurile asamblate *de novo* pentru două probe de sedimente secvențiate în profunzime, eșantionate din lacuri salmastre, de mică adâncime (salinitățile apei porale din fiecare probă: 5,7% în Lacul Techirghiol și 3,9% în Lacul Amara). Utilizând o strategie hibridă de partajare și efectuând inspecția manuală urmată de rafinarea datelor, am obținut 11 MAG-uri de calitate superioară și medie (> 50% nivel de recuperare, <2% contaminare) și 24 de calitate redusă (<50% nivel de recuperare, <3% contaminare), care acoperă 3 (din patru) linii evolutive din cadrul acestei supraîncrângături.

Arborele filogenomic realizat prin metoda “maximum-likelihood”, bazat pe concatenarea genelor pentru ARNr din componența subunităților ribozomale mici (SSU) și mari (LSU), a prezentat o topologie în care eucariotele s-au ramificat cu un suport statistic solid din interiorul Asgardarchaeota. În plus față de reconstituirea modelului de ramificație Asgardarchaeota / Eukaryota descris anterior (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017), am oferit dovezi pentru o legătura evolutivă strânsă între Heimdallarchaeia și eucariote.

Filogenia axată la nivel de genom pentru Asgardarchaeota a dezvăluit un model de origine, divergență și descendență, în care grupul Heimdallarchaeia formează ramura bazală a supraîncrângăturii iar Thor- / Odinararchaeia cea mai tânără (Figura 3a). Deși diferit în privința modelului de ramificare comparativ cu arborele SSU + LSU, s-a constatat că arborele filogenomic este robust (Figura 3a) și susține o topologie adusă în atenție de un studiu anterior (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017). Arborele realizat prin metoda Bayesiană folosind recodificarea de tip SR4 (Susko and Roger, 2007) a rezolvat cu susținere ridicată monofilia dintre Asgardarchaeota / Eukaryota, fără a rezolva totuși topologia internă a supraîncrângăturii și punctul exact de ramificare al eucariotelor (Figura 3b).

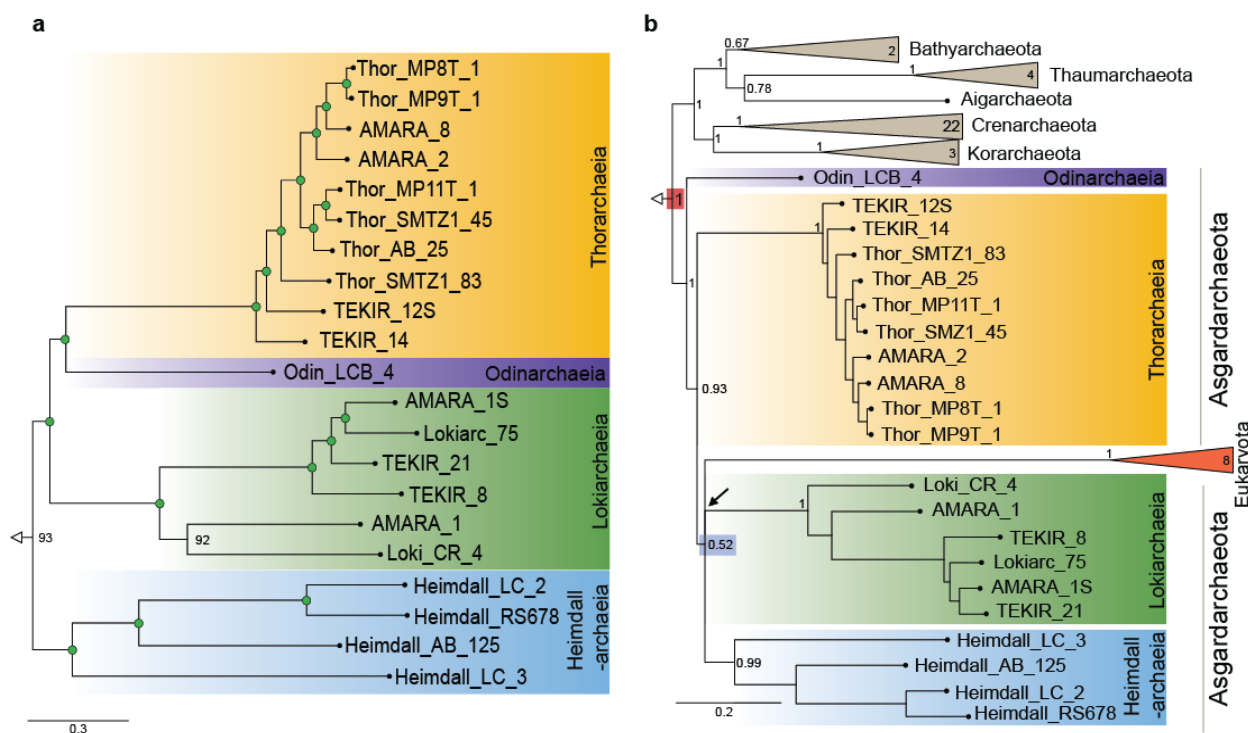


Figura 3. Filogenomica grupului Asgardarchaeota. a) Filogenie “Maximum-likelihood” (LG + C60, matrice generală și 60 de modele de profiluri proteice de substituție de aminoacizi) pentru supraîncrângătura Asgardarchaeota. Cercurile verzi evidențiază valori UFBoot mai mari de 95. b) Filogenie pentru Asgardarchaeota generată prin inferență Bayesiană (CAT-Poisson, model CAT de substituție a aminoacizilor cu rate de schimb globale uniforme). Săgeata neagră indică poziția nerezolvată a încrângăturii Lokiarchaeia.

În ceea ce privește Thorarchaeia, arborii filogenomici (Figura 3a, b) au arătat că ramurile bazale ale acestei încrângături au fost reprezentate de MAG-uri recuperate din sedimentul hipersalin al lacului Techirghiol (TEKIR_14 și TEKIR_12S). Celelalte formează un cluster compact ($n = 8$), care pare a fi rezultatul unui eveniment de diversificare mai recent, în medii salmastre. De remarcat că această diversitate filogenetică redusă din cadrul Thorarchaeia contrastează cu MAG-urile extrem de divergente ale Loki- și Heimdallarchaeia (Figura 3a, b).

Identificarea unei clase noi de rodopsine în Asgardarchaeota: Studii recente care au indicat prezența unei familii necaracterizate de rodopsine (Pushkarev *et al.*, 2018) (heliorodopsine; abreviate ca HeR) în monoderme (Flores-Uribe *et al.*, 2019) au impus un screening dedicat în toate MAG-urile de Asgardarchaeota disponibile. Rezultatele au arătat că MAG-ul Heimdallarchaeota RS678 codifică două HeR și ceea ce pare să fie o rodopsină de tip 1 care funcționează ca pompă de protoni (Figura 4), sugerând astfel sensibilitatea la lumină. În mod remarcabil, am descoperit că MAG-urile de Asgardarchaeota recuperate în acest studiu codifică secvențe de rodopsine similare ca orientare membranară cu rodopsinele de tip 1 și care se organizează în urma analizei filogenetice într-un grup monofiletic localizat între HeR și rodopsinele de tip 1 (Figura 4).

Având în vedere poziția lor filogenetică intermediară, ca rodopsine de tip 1 apropiate de HeR și prezența trăsăturilor întâlnite atât în tipul 1, cât și în HeR, le-am numit schizorodopsine (gr. *schizein* = "a divide" și "rodopsină"; abreviate drept SzR). Descoperirea recentă a HeR, cu roluri funcționale încă obscure (Pushkarev *et al.*, 2018; Flores-Uribe *et al.*, 2019), a descurajat speculațiile privind rolul SzR în Asgardarchaeota. Cu toate acestea, multitudinea de rodopsine pe care le-am identificat în Heimdallarchaeia (presupuse pompe de protoni de tip 1, HeR și SzR) împreună cu SzR prezente în Loki- și Thorarchaeia sugerează că, în timpul istoriei lor evolutive, Asgardarchaeota au fost prezente în habitate expuse la lumină.

Proteine ESP identificate în Asgardarchaeota: Pentru a susține conexiunile filogenetice între membrii Asgardarchaeota și eucariote, am analizat toate MAG-urile recuperate și cele disponibile public (14 în iulie 2018) pentru prezența potențialelor proteine ESP. Similar cu rapoartele precedente (Spang *et al.*, 2015; Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018), MAG-urile s-au dovedit a fi semnificativ îmbogățite în ESP, întărind astfel legătura lor ancestrală cu eucariotele. În plus, față de ESP raportate (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017), am identificat o subunitate putativă a complexului vezicular de acoperire COPII (asociat cu traficul veziculelor intracelulare și secreția) în Thorarchaeia și proteine care conțin domeniul N-terminal al foliculinei - o proteină specifică eucariotelor în Lokiarchaeia. În plus, am obținut

rezultate concludente pentru domeniile asociate cu ESP - Ezrin / radixin / moesin C-terminal și ELKS în Lokiarchaeia.

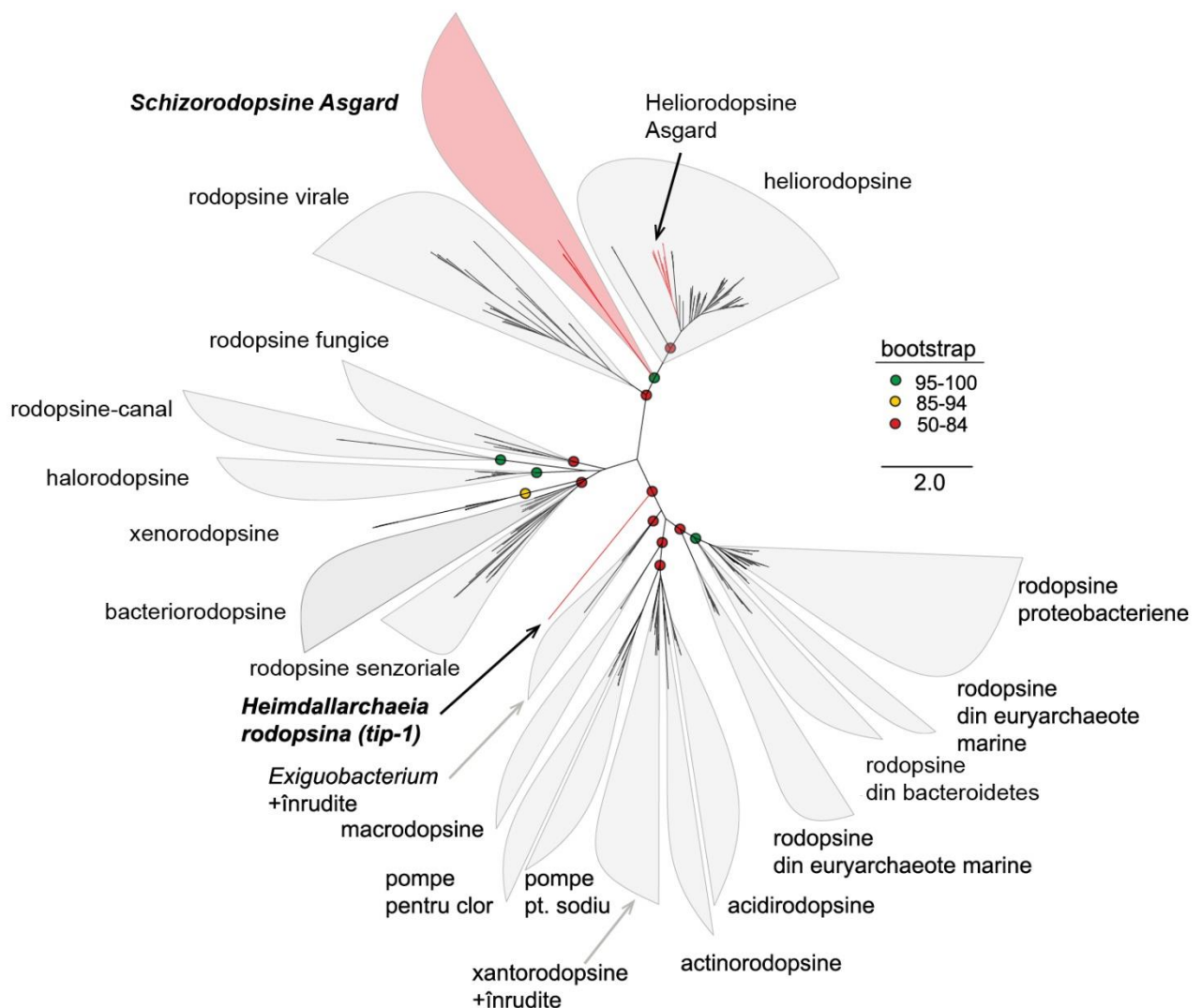


Figura 4. Analiza filogenetică a rodopsinelor. Este reprezentat un arbore fără rădăcină obținut prin metoda “maximum-likelihood” care include schizorodopsinele ($n = 6$) din Asgardarchaeota identificate în cadrul acestui studiu, heliorodopsine și rodopsine the tipul 1 reprezentative. Ramurile marcate cu culoarea roșie reprezintă secvențe identificate în Asgardarchaeota. În total, au fost utilizate 392 de secvențe pentru construirea acestui arbore.

Primază specifică eucariotelor în Heimdallarchaeia: În urma adnotării proteinelor, a devenit evident că Loki- și Thorarchaeia codifică o ADN primază tipică archeelor, în timp ce un omolog distinct, specific eucariotelor, a fost identificat în Heimdallarchaeia. Această observație intrigantă a determinat analize filogenetice suplimentare, luând în considerare ADN primazele din toate ordinele archeale împreună cu principalii reprezentanți ai liniilor eucariote și a tuturor archeelor Asgard disponibile.

Reconstituiri metabolice: Reconstrucția metabolică la nivel genomic a pus un accent deosebit pe Heimdallarchaeia (Figura 5), deoarece analizele filogenetice au indicat membri acestui grup ca fiind cei mai apropiați de strămoșii archeali ai protoeucariotelor. În timp ce modurile de viață anaerobe deduse pentru Loki- (Sousa *et al.*, 2016) și Thorarchaeia (Liu *et al.*, 2018) au fost considerate a fi însoțite de autotrofie (Sousa *et al.*, 2016) și respectiv mixotrofie (Liu *et al.*, 2018), pentru Heimdallarchaeia nu au fost realizate reconstituiri metabolice detaliate anterior studiului actual. Fiziologia dedusă aici a indicat stiluri de viață mixotrofice (pentru Asgardarchaeota în general), indicând simultan prezența transportatorilor pentru absorbția materiei organice exogene și a circuitelor metabolice responsabile de catabolismul acesteia.

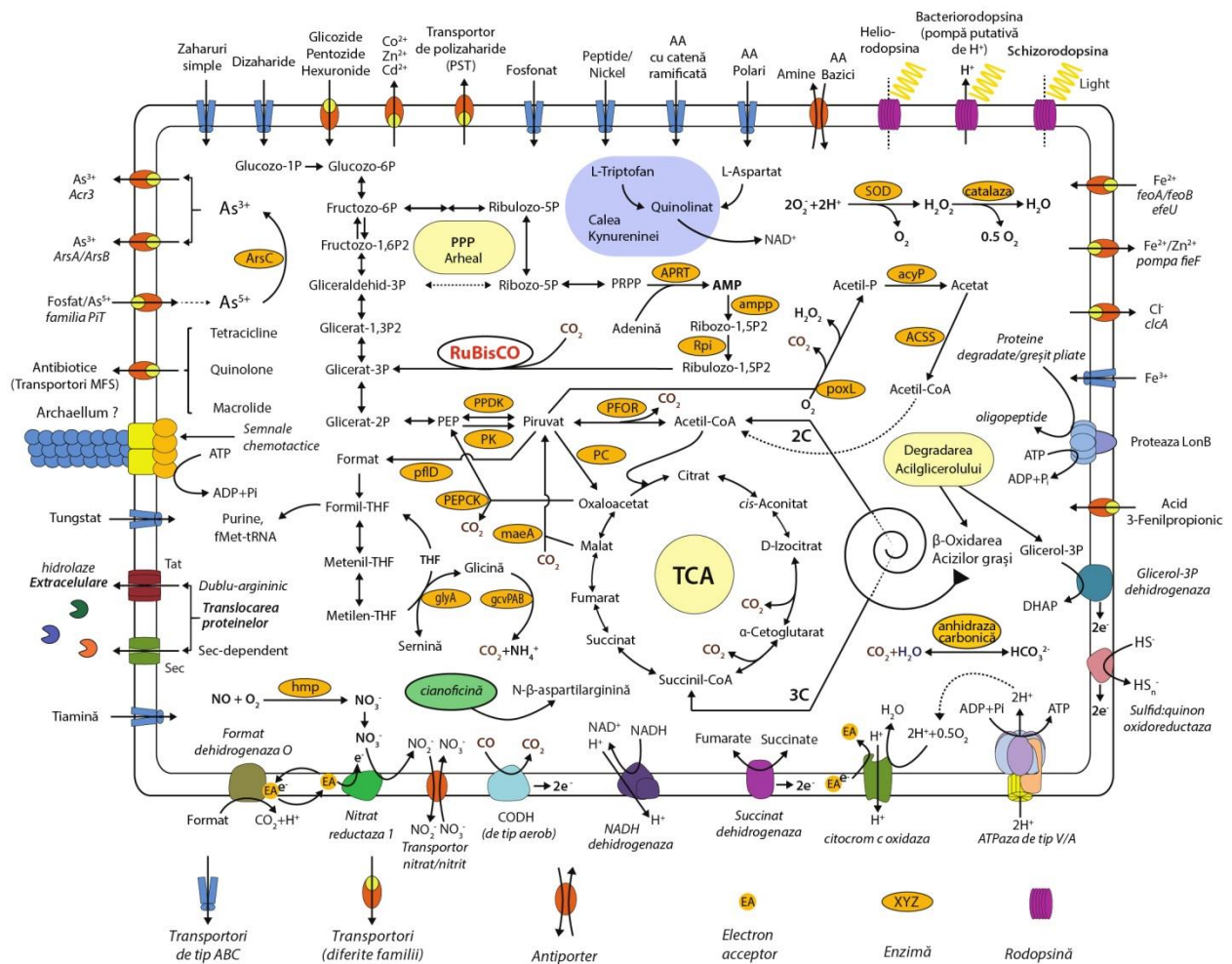


Figura 5. Reconstrucție metabolică pentru Heimdallarchaeia. Textul din panourile galbene indică denumirile căilor și a proceselor metabolice. Abrevieri: ACSS - acetil-CoA sintetază și anhidrază carbonică; acyP - acilfosfatază; ampp - AMP fosforilază; APRT - pirofosforilaza AMP; ArsC - arsenat reductază (glutaredoxină); BCAA - aminoacizi cu catenă ramificată; CODH - monoxid de carbon dehidrogenază; gcvPAB - glicin dehidrogenază; glyA - glicin hidroximetiltransferază; hmp - dioxigenaza oxidului nitric; maeA - malat dehidrogenază (decarboxilază); PC - piruvat carboxilaza; PEPCCK - fosfoenolpiruvat carboxikinaza; pflD - format C-acetiltransferază; PFDK - piruvat ferredoxin oxidoreductază; PK - piruvat kinaza; poxL - piruvat oxidaza; PPDK - piruvat, fosfat dikinază; PPP - calea pentozofosforică; Rpi-riboza-5-fosfat izomeraza; RuBisCO - Ribulozo-1,5-bisfosfat carboxilază / oxigenază; SOD - superoxid dismutaza; TCA - ciclul acizilor tricarbxicili.

În timp ce toate încregăturile din cadrul Asgardarchaeota codifică enzyme ale căii glicolitice, s-a descoperit că trei MAG-uri de Heimdallarchaeia (LC_3, AB_125 și AMARA_4) utilizează kinazele dependente de ADP non-canonice și, așa cum s-a menționat anterior (Liu *et al.*, 2018), în Thorarchaeia nu s-a identificat nici un omolog al glucokinazei. Am considerat că ramura non-oxidativă a căii pentozofosforice (PPP), bine reprezentată în acest grup, ar putea reprezenta fie un punct de intrare alternativ pentru zaharuri în glicoliză, fie că funcția glucokinazei canonice este îndeplinită de enzime încă neidentificate (Brasen *et al.*, 2014).

Omologii identificați pentru ribulozo 1,5-bisfosfat carboxilaza / oxigenaza (RuBisCO) aparțin tipurilor III (Loki- și Heimdallarchaeia) și IV (Loki- și Thorarchaeia). Considerăm că MAG-urile codificatoare de RuBisCO de tip III utilizează calea de degradare a nucleotidmonofosfatului (Kono *et al.*, 2017), realizând fixarea CO₂ prin legarea catabolismului nucleozidelor cu glicoliza / gluconeogeneza. Această concluzie este susținută de co-prezența genelor care codifică: RuBisCO tip III, fosforilaze AMP, ribozo-1,5-bisfosfat izomeraze și anhidraze carbonice.

Deoarece nicotinamid adenin dinucleotidul (NAD⁺) este un cofactor esențial în biochimia și energetica redox (Ternes and Schönknecht, 2014), am investigat mecanismele pentru sinteza sa *de novo*. Așa cum era de așteptat, toate încregăturile din Asgardarchaeota conțin calea aspartatului - un set de transformări metabolice care se pot desfășura atât în prezența, cât și în absența oxigenului (Gazzaniga *et al.*, 2009). În plus, Heimdallarchaeia conțin și calea exclusiv aerobă a kinureninei pentru biosinteza NAD⁺, cunoscută doar în câteva grupe de bacterii și eucariote (Ternes and Schönknecht, 2014). Inferențele filogenetice au arătat că această cale, considerată a fi prezentă în strămoșul protoeucariot (Ternes and Schönknecht, 2014), a fost probabil dobândită de strămoșul grupului Heimdallarchaeia prin transfer lateral de gene de la bacterii. Pe baza informațiilor accesibile autorilor acestui studiu, Heimdallarchaeia sunt primele organisme din domeniul Archaea la care s-a raportat calea aerobă a kinureninei.

Dintre toate încregăturile analizate, ciclul TCA complet a fost identificat în Loki- și Heimdallarchaeia. În plus, Lokiarchaeia conțin gene-cheie (izocitrat dehidrogenază, 2-oxoglutarat-ferredoxin oxidoreductază, ATP-citrat-lyază) care indică un ciclu TCA reducător implicat în fixarea autotrofă a CO₂. În ceea ce privește fosforilarea oxidativă, în timp ce ATPaza de tip V / A apare mai ales completă în Loki- și Thorarchaeia, celelalte componente implicate în fosforilarea oxidativă lipsesc sau sunt incomplete, subliniind modurile de viață anaerobe. Pentru Heimdallarchaeia am putut identifica ATPaza completă de tip V / A, succinat dehidrogenaza, NADH: chinone oxidoreductază aproape completă și, în mod important - citocrom c oxidaza - un alt marker distinctiv pentru aerobioză.

4. Concluzii

În acest studiu, propunem că Heimdallarchaeia cuprinde arceele cele mai apropiat înrudite față de eucariotele actuale și oferim detalii legate de stilul lor de viață facultativ aerob, caracterizat prin capacitatea de a utiliza energia soarelui și prezența unor căi metabolice anterior necunoscute în domeniul Archaea.

Capitolul IV: Vizualizarea Loki- și Heimdallarchaeia (Asgardarchaeota) prin hibridizare *in situ* cu fluorescență și depunere catalizată de reporter (CARD-FISH)

[Acest capitol a fost parțial publicat ca un articol în preprint (fără revizie): Salcher, M. M., Andrei, A.-Ș., Bulzu, P.-A., Keresztes, Z. G., Banciu, H. L. and Ghai, R. (2019) 'Visualization of Loki- and Heimdallarchaeia (Asgardarchaeota) by fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH)', bioRxiv, p. 580431. doi: 10.1101/580431.]

1. Introducere

Genomurile asamblate prin metagenomică (MAG) din cadrul Asgardarchaeota sunt recuperate dintr-o varietate din ce în ce mai largă de habitate, extinzând astfel distribuția lor cunoscută în mediul înconjurător și oferind acces la zestrea genetică a acestei linii arceale. În ciuda poziției lor filogenetice particulare la baza copacului eucariot al vieții, morfologia acestor organisme uluitoare rămâne un mister. Pentru a vizualiza acest grup evaziv am aplicat o combinație între tehnicile CARD-FISH și microscopia de epifluorescență probelor de sedimente hipersaline din zona de coastă folosind sonde CARD-FISH proiectate pentru liniile Heimdallarchaeia și Lokiarchaeia, oferind astfel primele dovezi vizuale pentru ambele grupuri. Aici, vom arăta că, în timp ce Heimdallarchaeia se caracterizează printr-o morfologie celulară uniformă, caracterizată prin localizarea centrală a ADN-ului, Lokiarchaeia prezintă o multitudine de forme și dimensiuni care reflectă diversitatea lor filogenetică vastă și distribuția ecologică.

2. Materiale și metode

Proiectarea sondelor oligonucleotidice: Am optimizat manual alinierea tuturor secvențelor 16S clasificate ca Asgardarchaeota folosind programul ARB (Ludwig *et al.*, 2004) cu ultima versiune a bazei de date SILVA (v.132, grupată la 99% identitate) (Pruesse *et al.*, 2007) și am construit un arbore RAxML (cu modelul evolutiv GTR-GAMMA, 100 iterații de bootstrap (Stamatakis, Ludwig and Meier, 2005)) pentru toate secvențele complete și de înaltă calitate. Toate încercările de a construi o sondă generală care vizează toate secvențele Asgardarchaeota (n = 935) au eșuat, probabil datorită diversității ridicate din cadrul acestei supraîncrângături. Am proiectat trei sonde competitive distincte pentru Heimdallarchaeia și două pentru Lokiarchaeia. Fiecare sondă

competitivă a fost utilizată în aceleași concentrații ca și sondele CARD-FISH pentru a preveni legarea nespecifică.

Testarea sondelor: Sondele au fost testate *in silico* (Yilmaz, Parnerkar and Noguera, 2011) și în laborator cu diferite concentrații de formamidă în tamponul de hibridizare până când s-au obținut condiții stricte.

CARD-FISH și vizualizarea celulelor: Am testat sondele în eșantioane de sedimente obținute din două locații de unde recent au fost recuperate mai multe genomuri încadrate ca Asgardarchaeota folosind metagenomica (Lacurile Techirghiol și Amara, România) (Bulzu *et al.*, 2018). Șapte straturi de sedimente (0-70 cm, în intervale de câte 10 cm) au fost prelevate din Lacul Techirghiol, iar în Lacul Amara a fost realizată eșantionarea stratului superficial de 10 cm. Probele au fost fixate cu formaldehidă, tratate prin sonicare, vortexare și centrifugare pentru a detașa celulele de particulele sedimentare iar aliquote au fost filtrate pe membrane albe de polycarbonat (dimensiunea porilor 0,2 μm, Millipore). Metoda CARD-FISH a fost efectuată așa cum a fost descris anterior (Ishii *et al.*, 2004). Filtrele au fost contramarcate cu DAPI și inspectate prin microscopie de epifluorescență.

3. Rezultate și discuții

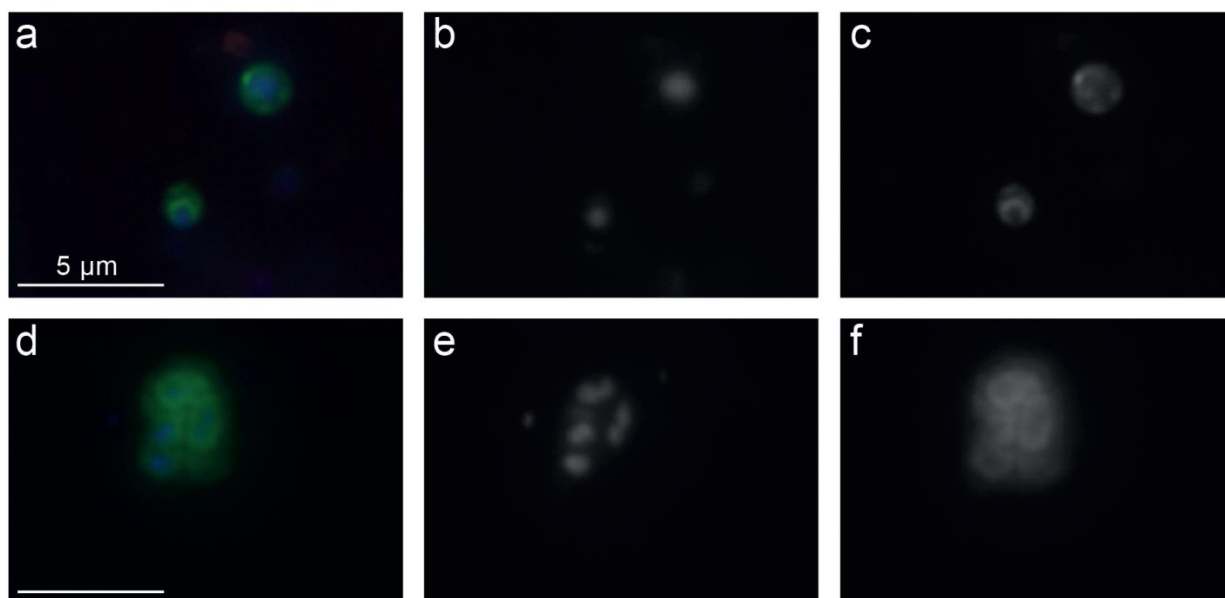


Figura 6. Imagini obținute în urma aplicării metodei CARD-FISH pentru Heimdallarchaeia folosind sonda heim-526. Cadranle din partea stângă (a, d) afișează imaginile suprapuse ale semnalului sondei (verde), colorația cu DAPI (albastru) și autofluorescența (roșu), cadranle situate central (b, e) colorație DAPI pentru ADN, panourile din partea dreaptă (c, f) marcarea prin CARD-FISH a proteinelor. Bara de scală (5μm) din imaginile din partea stângă se aplică tuturor microfotografiilor prezentate în figură.

Ambele încregături au fost rare și absente la adâncimi mai mari de 40 cm ale sedimentului. Toate Heimdallarchaeia observate au fost asemănătoare în privința dimensiunilor

celulei ($2,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ lungime x $1,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$ lățime, $n = 23$), cu formă constantă și ADN condensat ($0,8 \pm 0,2 \times 0,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$) în centrul celulelor (Figura 6). În contrast, Lokiarchaeia a prezentat diferite forme și dimensiuni și am putut distinge cel puțin trei morfotipuri distincte: Cele mai frecvente au fost celulele ovoidale mici și mijlocii ($2,0 \pm 0,5 \times 1,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$, $n = 30$, Figura 7 a-c) prezente în diferite straturi de adâncime în Lacul Techirghiol (0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm) și în proba superficială de 10 cm din Lacul Amara. O singură celulă rotundă de mari dimensiuni ($3,8 \times 3,6 \mu\text{m}$, Figura 7 d-f) cu semnal de fluorescență puternic și ADN condensat în centru a fost detectată în Lacul Amara iar celule filamentoase mari ($12,0 \pm 4,3 \times 1,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$, $n = 6$, **Figura 7 g-i**) cu ADN filamentos, condensat ($10,2 \pm 4,8 \times 0,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$) au fost prezente la adâncimea sedimentelor de 30-40 cm în Lacul Techirghiol și de 0-10 cm în Lacul Amara.

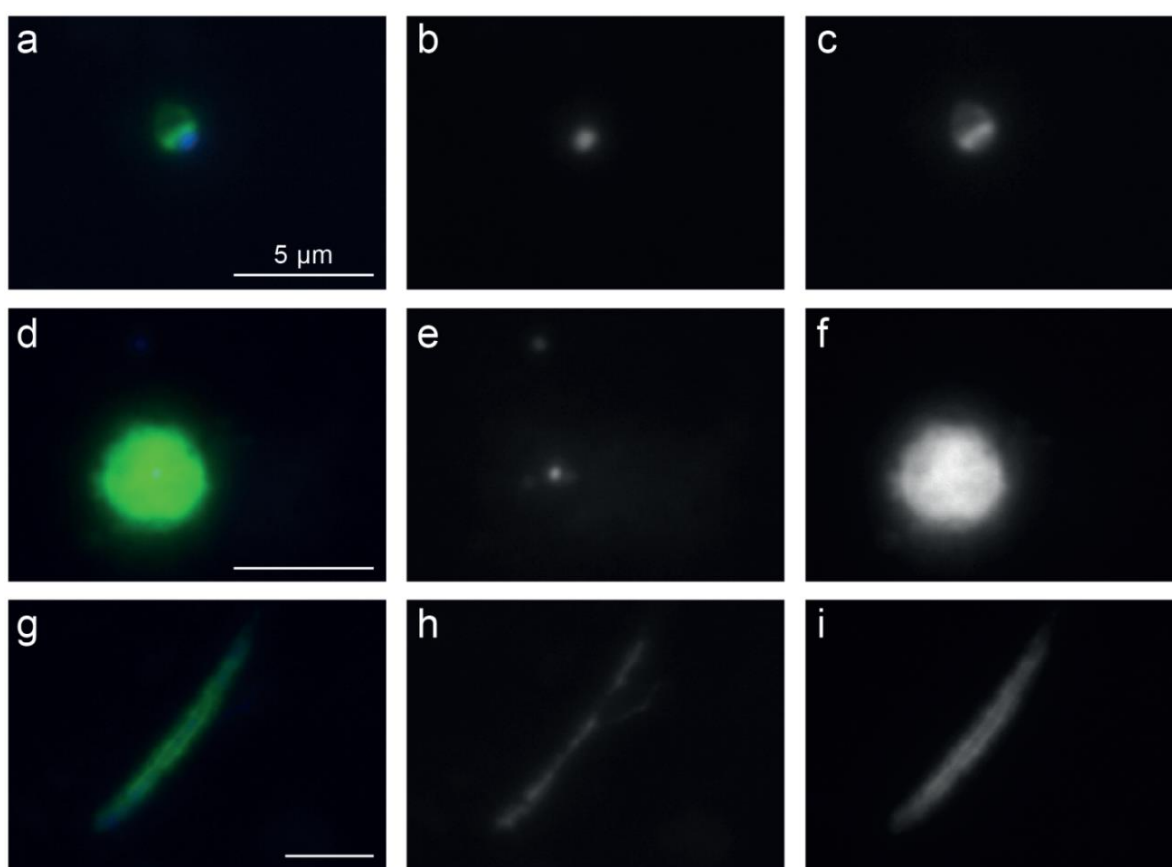


Figura 7. Imagini obținute în urma aplicării metodei CARD-FISH pentru Lokiarchaeia folosind sonda loki1-1184. Sunt prezentate trei morfotipuri celulare diferite: (a-d) celule ovoidale mici și mijlocii, (d-f) celule rotunde mari și (g-i) celule filamentoase mari. Cadraneele din partea stângă (a, d, g) prezintă imagini suprapuse ale semnalului sondei (verde), colorația cu DAPI (albastru) și autofluorescența (roșu), panourile din mijloc (b, e, h) colorația cu DAPI pentru ADN, cadraneele din dreapta figurii (c, f, i) marcarea prin CARD-FISH a proteinelor. Bara de scală ($5\mu\text{m}$) din imaginile din partea stângă se aplică tuturor microfotografiilor prezentate în această figură.

Variabilitatea morfologică constatată pentru Lokiarchaeia reflectă, cel mai probabil, eșantionarea mai extinsă a diversității filogenetice în cadrul acestei încrengături. În timpul inspecțiilor microscopice, am verificat cu atenție semnalele potențial nespecifice sau

autofluorescente la lungimi de undă care nu interferează cu semnalul sondei și nu au găsit nici o suprapunere pentru niciuna dintre celulele inspectate. Un set de controale negative a fost aplicat pentru a exclude semnalele fals-pozitive datorate legării nespecifice a coloranților sau a acidului nucleic din componența sondelor prin utilizarea unei sonde nespecifice (Wallner *et al.*, 1993).

Pentru a evita semnalele false-pozitive datorate peroxidazelor celulare, am efectuat experimente de control suplimentare, inclusiv reacția CARD necuplată. Toate aceste tratamente de control au condus la semnale de fundal scăzute, nespecifice, dar fără o colorare evidentă a celulelor. Alte dovezi ale specificității au fost observate în toate celulele hibridizate cu sonda pentru *Heimdallarchaeia*, atât formele, cât și tiparele de colorare cuplate cu DAPI rămânând consecvente.

4. Concluzii

Examinând aceste prime imagini ale unor celule de *Asgardarchaeota*, nu am putut trece cu vederea potrivirea neașteptată între denumirile lor și aspecte ale morfologiei și ecologiei lor deduse ulterior. Inspirați de descoperirea lor inițială în apropierea venturilor fierbinți din zona *Loki's Castle*, în largul coastei Norvegiei (Spang *et al.*, 2015), botezul lor inițial după zeități din mitologia nordică (Odin, Thor, Loki și Heimdall (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017)) a fost neobișnuit de prescient.

Capitolul V: Concluzii generale

Studiile detaliate în această teză de doctorat combină abordări de actualitate ale secvențierii de înaltă procesivitate a ADN ambiental (eDNA) cu bioinformatica și analizele fizico-chimice pentru a descrie biodiversitatea sedimentelor saline, bogate în materie organică (sapropeluri) și pentru a dezvălui modurile de viață și istoria evolutivă a archeelor *Asgard*.

Primul studiu (Capitolul II) ilustrează biodiversitatea și predicțiile funcționale realizate pentru organisme implicate în formarea sapropelurilor existente în trei lacuri cu parametri fizico-chimici diferiți, localizate pe teritoriul României. Aceasta reprezintă prima încercare de a compara grupele microbiene care populează sapropeluri lacustre recent formate prin utilizarea metodelor independente de cultivare. Rezultatele au indicat multiple surse pentru materia organică detritică ce contribuie la procesul de formare a sapropelurilor. Bacteriile domină comunitățile procariote în toate cele trei sapropeluri investigate (din lacurile Amara, Techirghiol și Ursu). Taxoni rari și/sau necultivabili care constituie așa-numita “materie neagră microbială” au fost detectați din ambele domenii procariote ale vieții. Identificarea enigmaticelor archee din grupul *Asgard* a îndemnat la investigații detaliate focalizate la nivelul acestui grup taxonomic.

Al doilea studiu (Capitolul III) a utilizat tehnicile metagenomicii pentru a reconstitui și apoi caracteriza genomurile unor archee aparținând grupului Asgard din sapropelurile lacurilor Amara și Techirghiol. Folosind asamblarea *de novo* și strategii de partajare hibridă, au fost reconstituite treizeci și cinci de genomuri parțiale, astfel dublând cantitatea de date genomice disponibile pentru acest grup taxonomic. Analizele filogenomice au confirmat topologia surprinzătoare a eocitelor remarcată într-un studiu anterior, ce prezintă ramificarea eucariotelor din interiorul supraîncrângăturii Asgardarchaeota. O reconstituire a metabolismului pentru Heimdallarchaeia a fost realizată în premieră, dezvăluind astfel potențialul lor pentru mixotrofie și aerobioză. Am identificat o familie necunoscută de rodopsine, în cadrul archeelor Asgard, pe care le-am denumit “schizorodopsine”. Coroborând datele filogenomice cu cele legate de capacitățile metabolice, am arătat că grupul Heimdallarchaeia cuprinde cei mai apropiați strămoși actuali ai eucariotelor din domeniul Archaea, propunând ca urmare modelul “protoeucariotului aerob”.

Cel de-al treilea studiu (Capitolul IV) a avut ca scop obținerea primelor imagini ale unor celule de Loki- și Heimdallarchaeia. Prin combinarea tehnicii CARD-FISH cu microscopia optică de epifluorescență s-a observat că toate celulele de Heimdallarchaeia sunt similare în privința dimensiunii celulelor și a formei în timp ce Lokiarchaeia sunt reprezentate de celule care pot fi încadrate în cel puțin trei tipuri morfologice diferite. Diversitatea morfologică observată a fost atribuită volumului redus de date de secvență disponibil pentru Asgardarchaeota la momentul realizării acestui studiu.

Bibliografie selectivă

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. and Spiegel, F. W. (2012) 'The revised classification of eukaryotes.', *J. Eukaryot. Microbiol.*, 59(5), pp. 429–493.
- Akıl, C. and Robinson, R. C. (2018) 'Genomes of Asgard archaea encode profilins that regulate actin', *Nature*, 562(7727), pp. 439–443.
- Alexe, M. (2010) 'Studiul lacurilor sărate din Depresiunea Transilvaniei', Ed. Presa Universitară Clujeană: Cluj-Napoca, Romania, (book in Romanian).
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) 'Basic local alignment search tool.', *J. Mol. Biol.*, 215(3), pp. 403–410.
- Bernard, G., Pathmanathan, J. S., Lannes, R., Lopez, P. and Baptiste, E. (2018) 'Microbial Dark Matter Investigations: How Microbial Studies Transform Biological Knowledge and Empirically Sketch a Logic of Scientific Discovery', *Genome Biol. Evol.*, 10(3), pp. 707–715.
- Brasen, C., Esser, D., Rauch, B. and Siebers, B. (2014) 'Carbohydrate metabolism in *Archaea*: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation.', *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 78(1), pp. 89–175.
- Bulzu, P.-A., Andrei, A.-S., Salcher, M. M., Mehrshad, M., Inoue, K., Kandori, H., Beja, O., Ghai, R. and Banciu, H. (2018) 'The sunlit microoxic niche of the archaeal eukaryotic ancestor comes to light', *bioRxiv*, p. 385732, doi: <https://doi.org/10.1101/385732>
- Bulzu, P.-A., Andrei, A.-Ș., Salcher, M. M., Mehrshad, M., Inoue, K., Kandori, H., Beja, O., Ghai, R. and Banciu, H. L. (2019) 'Casting light on Asgardarchaeota metabolism in a sunlit microoxic niche', *Nat. Microbiol.*, <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0404-y>.
- Cai, M., Liu, Y., Zhou, Z., Yang, Y., Pan, J., Gu, J.-D. and Li, M. (2018) 'Asgard archaea are diverse, ubiquitous, and transcriptionally active microbes', *bioRxiv*, p. 374165, doi: <https://doi.org/10.1101/374165>
- Castro-Fernandez, V., Herrera-Morande, A., Zamora, R., Merino, F., Gonzalez-Ordenes, F., Padilla-Salinas, F., Pereira, H. M., Brandao-Neto, J., Garratt, R. C. and Guixé, V. (2017) 'Reconstructed ancestral enzymes reveal that negative selection drove the evolution of substrate specificity in ADP-dependent kinases.', *J. Biol. Chem.*, 292(51), p. 21218.
- Criscuolo, A. and Gribaldo, S. (2010) 'BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments', *BMC Evol. Biol.*, 10(1), p. 210.
- Da Cunha, V., Gaia, M., Gadelle, D., Nasir, A. and Forterre, P. (2017) 'Lokiarchaea are close relatives of Euryarchaeota, not bridging the gap between prokaryotes and eukaryotes', *PLOS Genet.*, 13(6), p. e1006810.
- Da Cunha, V., Gaia, M., Nasir, A. and Forterre, P. (2018) 'Asgard archaea do not close the debate about the universal tree of life topology', *PLOS Genet.*, 14(3), p. e1007215.

- Dombrowski, N., Seitz, K. W., Teske, A. P. and Baker, B. J. (2017) ‘Genomic insights into potential interdependencies in microbial hydrocarbon and nutrient cycling in hydrothermal sediments.’, *Microbiome.*, 5(1), p. 106.
- Edgar, R. C. (2004) ‘MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput’, *Nucleic Acids Res.*, 32(5), pp. 1792–1797.
- Edgar, R. C. (2010) ‘Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.’, *Bioinformatics.*, 26(19), pp. 2460–2461.
- Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C. W. and Ettema, T. J. G. (2017) ‘Archaea and the origin of eukaryotes.’, *Nat. Rev. Microbiol.*, 15(12), pp. 711–723.
- Flores-Uribe, J., Hevroni, G., Ghai, R., Pushkarev, A., Inoue, K., Kandori, H. and Béjà, O. (2019) ‘Heliorhodopsins are absent in diderm (Gram-negative) bacteria: Some thoughts and possible implications for activity’, *Environ. Microbiol. Rep.*, <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12730>.
- Gazzaniga, F., Stebbins, R., Chang, S. Z., McPeck, M. A. and Brenner, C. (2009) ‘Microbial NAD Metabolism: Lessons from Comparative Genomics’, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 73(3), pp. 529–541.
- Gheorghievici, L. M., Pompei, I., Gheorghievici, G. and Tănase, I. (2012) ‘The influence of abiotic factors on suppliers of organic matter in the peloidogenesis process from Lake Techirghiol, Romania’, *AAFL Bioflux.*, 5(2), pp. 401–405.
- Guy, L. and Ettema, T. J. G. (2011) ‘The archaeal “TACK” superphylum and the origin of eukaryotes.’, *Trends Microbiol.*, 19(12), pp. 580–587.
- Hartman, H. and Fedorov, A. (2002) ‘The origin of the eukaryotic cell: A genomic investigation’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(3), p. 1420 LP-1425.
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q. and Vinh, L. S. (2018) ‘UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation’, *Mol. Biol. Evol.*, 35(2), pp. 518–522.
- Ishii, K., Mußmann, M., MacGregor, B. J. and Amann, R. (2004) ‘An improved fluorescence *in situ* hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments.’, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 50(3), pp. 203–213.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.-Y., Lopez, R. and Hunter, S. (2014) ‘InterProScan 5: genome-scale protein function classification.’, *Bioinformatics.*, 30(9), pp. 1236–1240.
- Katoh, K. (2002) ‘MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform’, *Nucleic Acids Res.*, 30(14), pp. 3059–3066.
- Kidd, R. B., Cita, M. B. and Ryan, W. B. F. (1978) ‘Stratigraphy of eastern Mediterranean sapropel sequences recovered during DSDP Leg 42A and their paleoenvironmental significance’, *Initial Reports DSDP.*, 42A, pp. 421–443.
- Kono, T., Mehrotra, S., Endo, C., Kizu, N., Matusda, M., Kimura, H., Mizohata, E., Inoue, T., Hasunuma, T., Yokota, A., Matsumura, H. and Ashida, H. (2017) ‘A RuBisCO-mediated carbon metabolic pathway in methanogenic archaea’, *Nat. Commun.*, 8, p. 14007.

- Koonin, E. V (2015) ‘Archaeal ancestors of eukaryotes: not so elusive any more.’, *BMC Biol.*, 13, p. 84.
- de Lange, G. J. and ten Haven, H. L. (1983) ‘Recent sapropel formation in the eastern Mediterranean’, *Nature*, 305(5937), pp. 797–798.
- Lartillot, N., Rodrigue, N., Stubbs, D. and Richer, J. (2013) ‘PhyloBayes MPI: phylogenetic reconstruction with infinite mixtures of profiles in a parallel environment.’, *Syst. Biol.*, 62(4), pp. 611–615.
- Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K. and Lam, T.-W. (2015) ‘MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph.’, *Bioinformatics.*, 31(10), pp. 1674–1676.
- Li, D., Luo, R., Liu, C.-M., Leung, C.-M., Ting, H.-F., Sadakane, K., Yamashita, H. and Lam, T.-W. (2016) ‘MEGAHIT v1.0: A fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices.’, *Methods.*, 102, pp. 3–11.
- Liu, Y., Zhou, Z., Pan, J., Baker, B. J., Gu, J.-D. and Li, M. (2018) ‘Comparative genomic inference suggests mixotrophic lifestyle for Thorarchaeota’, *ISME J.*, 12(4), pp. 1021–1031.
- López-García, P. and Moreira, D. (2015) ‘Open questions on the origin of eukaryotes’, *Trends Ecol. Evol.*, 30(11), pp. 697–708.
- Loytynoja, A. (2014) ‘Phylogeny-aware alignment with PRANK.’, *Methods Mol. Biol.*, 1079, pp. 155–170.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. and Schleifer, K.-H. (2004) ‘ARB: a software environment for sequence data.’, *Nucleic Acids Res.*, 32(4), pp. 1363–1371.
- Martijn, J., Vosseberg, J., Guy, L., Offre, P. and Ettema, T. J. G. (2018) ‘Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria.’, *Nature.*, 557(7703), pp. 101–105.
- Narrowe, A. B., Spang, A., Stairs, C. W., Caceres, E. F., Baker, B. J., Miller, C. S. and Ettema, T. J. G. (2018) ‘Complex evolutionary history of translation Elongation Factor 2 and diphthamide biosynthesis in *Archaea* and parabasalids’, *Genome Biol. Evol.*, 10(9), pp. 2380–2393.
- Nawrocki, E. P. (2009) *Structural RNA Homology Search and Alignment using Covariance Models*. Washington University School of Medicine. PhD Thesis, <http://eddylab.org/publications/Nawrocki09b/Nawrocki09b-phdthesis.pdf>.
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. and Minh, B. Q. (2015) ‘IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies’, *Mol. Biol. Evol.*, 32(1), pp. 268–274.
- Notredame, C., Higgins, D. G. and Heringa, J. (2000) ‘T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment.’, *J. Mol. Biol.*, 302(1), pp. 205–217.

- Parkes, R. J., Cragg, B., Roussel, E., Webster, G., Weightman, A. and Sass, H. (2014) ‘A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere:geosphere interactions’, *Mar. Geol.*, 352, pp. 409–425.
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P. and Tyson, G. W. (2015) ‘CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes.’, *Genome Res.*, 25(7), pp. 1043–1055.
- Price, M. N., Dehal, P. S. and Arkin, A. P. (2010) ‘FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments.’, *PLoS One.*, 5(3), p. e9490.
- Pruesse, E., Peplies, J. and Glockner, F. O. (2012) ‘SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes.’, *Bioinformatics.*, 28(14), pp. 1823–1829.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J. and Glockner, F. O. (2007) ‘SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB.’, *Nucleic Acids Res.*, 35(21), pp. 7188–7196.
- Pushkarev, A., Inoue, K., Larom, S., Flores-Uribe, J., Singh, M., Konno, M., Tomida, S., Ito, S., Nakamura, R., Tsunoda, S. P., Philosof, A., Sharon, I., Yutin, N., Koonin, E. V, Kandori, H. and Beja, O. (2018) ‘A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics.’, *Nature.*, 558(7711), pp. 595–599.
- Sass, H. and Parkes, R. J. (2011) ‘Sub-seafloor sediments: An extreme but globally significant prokaryotic habitat (Taxonomy, Diversity, Ecology) BT - Extremophiles Handbook’, in Horikoshi, K. (ed.). Tokyo: Springer Japan, pp. 1015–1041.
- Seemann, T. (2014) ‘Prokka: rapid prokaryotic genome annotation.’, *Bioinformatics.*, 30(14), pp. 2068–2069.
- Seitz, K. W., Lazar, C. S., Hinrichs, K.-U., Teske, A. P. and Baker, B. J. (2016) ‘Genomic reconstruction of a novel, deeply branched sediment archaeal phylum with pathways for acetogenesis and sulfur reduction.’, *ISME J.*, 10(7), pp. 1696–1705.
- Sousa, F. L., Neukirchen, S., Allen, J. F., Lane, N. and Martin, W. F. (2016) ‘Lokiarchaeon is hydrogen dependent.’, *Nat. Microbiol.*, 1, p. 16034.
- Spang, A., Eme, L., Saw, J. H., Caceres, E. F., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Lombard, J., Guy, L. and Ettema, T. J. G. (2018) ‘Asgard archaea are the closest prokaryotic relatives of eukaryotes’, *PLOS Genet.*, 14(3), p. e1007080.
- Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L. and Ettema, T. J. G. (2015) ‘Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes’, *Nature.*, 521, p. 173.
- Stamatakis, A., Ludwig, T. and Meier, H. (2005) ‘RAxML-II: a program for sequential, parallel and distributed inference of large phylogenetic trees’, *Concurr. Comput. Pract. Exp.*, 17(14), pp. 1705–1723.
- Stankevica, K., Kalnina, L., Klavins, M., Cerina, A., Ustupe, L. and Kaup, E. (2015) ‘Reconstruction of the Holocene palaeoenvironmental conditions accordingly to the multiproxy sedimentary records from Lake Pilvelis, Latvia’, *Quat. Int.*, 386, pp. 102–115.
- Stein, R. (2014) ‘Sapropel’, in Harff, J., Meschede, M., Petersen, S., and Thiede, J. (eds) *Encyclopedia of Marine Geosciences*, Springer Heidelberg, pp. 746–747.

- Susko, E. and Roger, A. J. (2007) 'On reduced amino acid alphabets for phylogenetic inference.', *Mol. Biol. Evol.*, 24(9), pp. 2139–2150.
- Tabita, F. R., Hanson, T. E., Li, H., Satagopan, S., Singh, J. and Chan, S. (2007) 'Function, structure, and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs.', *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71(4), pp. 576–599.
- Ternes, C. M. and Schönknecht, G. (2014) 'Gene Transfers Shaped the Evolution of De Novo NAD⁽⁺⁾ Biosynthesis in Eukaryotes', *Genome Biol. Evol.*, 6(9), pp. 2335–2349.
- Tully, B. J., Graham, E. D. and Heidelberg, J. F. (2018) 'The reconstruction of 2,631 draft metagenome-assembled genomes from the global oceans', *Sci. Data.*, p. 170203.
- Wallner, G., Amann, R. and Beisker, W. (1993) 'Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms.', *Cytometry.*, 14(2), pp. 136–143.
- Wrighton, K. C., Castelle, C. J., Varaljay, V. A., Satagopan, S., Brown, C. T., Wilkins, M. J., Thomas, B. C., Sharon, I., Williams, K. H., Tabita, F. R. and Banfield, J. F. (2016) 'RubisCO of a nucleoside pathway known from *Archaea* is found in diverse uncultivated phyla in bacteria.', *ISME J.*, 10(11), pp. 2702–2714.
- Yermolaeva, N. I., Zarubina, E. Y., Romanov, R. E., Leonova, G. A. and Puzanov, A. V (2016) 'Hydrobiological conditions of sapropel formation in lakes in the south of Western Siberia', *Water Resour.*, 43(1), pp. 129–140.
- Yilmaz, L. S., Parnerkar, S. and Noguera, D. R. (2011) 'mathFISH, a web tool that uses thermodynamics-based mathematical models for *in silico* evaluation of oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization.', *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(3), pp. 1118–1122.
- Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Backstrom, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K. W., Anantharaman, K., Starnawski, P., Kjeldsen, K. U., Stott, M. B., Nunoura, T., Banfield, J. F., Schramm, A., Baker, B. J., Spang, A. and Ettema, T. J. G. (2017) 'Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity.', *Nature.*, 541(7637), pp. 353–358.

Lista publicațiilor incluse în teza de doctorat sub forma unor capitole

Capitolul I

Bulzu, P.-A., Cristea, A., Buda, D.M., Banciu, H.L. (2019). ‘Asgardarchaeota – a novel prokaryotic group discovered in aquatic sediments that might shed light on the origin and early evolution of eukaryotes’. *Aerul si Apa: Componente ale Mediului/ Air and Water: Components of the Environment*, ISSN 2067-743X. pp. 435-446. doi: 10.24193/AWC2019_43

Capitolul III

Bulzu, P.-A., Andrei, A.-Ș., Salcher, M. M., Mehrshad, M., Inoue, K., Kandori, H., Beja, O., Ghai, R. and Banciu, H. L. (2019) ‘Casting light on Asgardarchaeota metabolism in a sunlit microoxic niche’, *Nature Microbiology*. ISSN: 2058-5276, doi: 10.1038/s41564-019-0404-y. (AIS₂₀₁₇=7.515; IF₂₀₁₇=14.174)

Capitolul IV

Salcher, M. M., Andrei, A.-Ș., Bulzu, P.-A., Keresztes, Z. G., Banciu, H. L. and Ghai, R. (2019) ‘Visualization of Loki- and Heimdallarchaeia (Asgardarchaeota) by fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH)’, *bioRxiv*, p. 580431, doi: 10.1101/580431. (articol în preprint – fără revizie)