

**UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
CATEDRA DE BIOLOGIE EXPERIMENTALĂ**

TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDIUL BIODIVERSITĂȚII
COMUNITĂȚILOR
CIANOBACTERIENE ASOCIATE
IZVOARELOR TERMOMINERALE DIN
CÂMPIA DE VEST A ROMÂNIEI PRIN
TEHNICI MOLECULARE**

- rezumat -

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROF. DR. NICOLAE DRAGOȘ**

**DOCTORAND
CRISTIAN COMAN**

**CLUJ-NAPOCA
2011**

Cuprins

I. Introducere	1
II. Conceptul de specie la procariote	4
II. 1. Conceptul fenetic de specie	10
II. 2. Conceptul evoluționist de specie	11
II. 3. Concluzii	12
III. Filogenia moleculară a bacteriilor pe baza analizei comparative a unor gene conservate	12
III. 1. Analiza filogenetică pe baza secvențelor ADNr 16S și 23S	13
III. 2. Markeri moleculari alternativi care susțin cele trei domenii de organizare	16
III. 2. 1. Factorii de elongare Tu/1 α	16
III. 2. 2. ARN polimeraza	17
III. 2. 3. Hsp60	18
III. 2. 4. Aminoacil-ARNt sintetazele	20
III. 3. Markeri filogenetici ce nu susțin cele trei domenii de organizare	23
III. 3. 1. ATPaza	23
III. 3. 2. ADN giraza	24
III. 3. 3. Hsp70	27
III. 3. 4. RecA	27
III. 4. Concluzii	29
IV. Comunități cianobacteriene arhaice și actuale	30
IV. 1. Comunități cianobacteriene arhaice	30
IV. 2. Comunități cianobacteriene termofile actuale de pe Glob	32
IV. 3. Concluzii	38
V. Metode moleculare de investigare a diversității comunităților microbiene asociate diverselor habitate	39
V. 1. Izolarea ADN genomic	40
V. 2. Tehnici de hibridare a acizilor nucleici	43
V. 2. 1. Hibridarea reciprocă a ADN din comunități distincte	44
V. 2. 2. Hibridarea cantitativă	44

V. 2. 3. Sondele oligonucleotidice	44
V. 2. 4. Hibridarea cantitativă „dot-blot”	45
V. 2. 5. Hibridarea <i>in situ</i> a celulelor întregi	46
V. 3. Aplicarea PCR în ecologia microbiană	47
V. 4. Descrierea unor tehnici moleculare de investigare a biodiversității microbiene	49
V. 4. 1. ARDRA	49
V. 4. 2. T-RFLP	50
V. 4. 3. SSCP	51
V. 4. 4. LH-PCR	52
V.4.5 Amprentarea rep-PCR	54
V. 4. 6. RAPD, AP-PCR, DAF	54
V. 4. 7. DGGE	55
V. 5. Concluzii și previziuni	58
VI. Metodologia de abordare a studiului biodiversității cianobacteriilor în comunitățile termofile din Câmpia de Vest a României	59
VII. Material și metode	60
VII. 1. Eșantionarea materialului biologic	60
VII. 2. Studiul morfologic	61
VII. 3. Izolarea ADN	61
VII. 4. Abordarea moleculară	62
VII. 4. 1. Electroforeza capilară (analiza ARISA)	63
VII. 4. 2. Clonarea fragmentelor ADNr 16S-ITS, analiza profilului de restricție și secvențarea fragmentelor diferite (analiza ARDRA)	66
VII. 4. 3. Electroforeza în gel cu gradient denaturant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE)	77
VIII. Rezultate și discuții	80
VIII. 1. Descrierea biotopurilor și investigații morfologice	80
VIII. 1. 1. Descrierea izvoarelor geotermale	80
VIII. 1. 2. Prelevarea eșantioanelor	81
VIII. 1. 3. Descrierea morfologică prin microscopie optică și electronică a comunităților cianobacteriene selectate	84

VIII. 1. 4. Concluzii	92
VIII. 2. Investigarea biodiversității prin metode moleculare	93
VIII. 2. 1. Investigarea biodiversității prin metoda DGGE	93
VIII. 2. 2. Investigarea biodiversității prin metoda ARISA	99
VIII. 2. 3. Investigarea biodiversității prin metoda ARDRA	101
IX. Sunt implicate comunitățile cianobacteriene asociate izvoarelor geotermale în formarea stromatolitelor moderne?	120
IX. 1. Formațiuni sedimentare arhaice și actuale	120
IX. 1. 1. Microbialitele în erele geologice	121
IX. 1. 2. Microbialite actuale	122
IX. 2. Structura microbialitelor de la Ciocaia	123
IX. 2. 1. Microscopie optică	123
IX. 2. 2. Microscopie electronică și analiza elementală (EDX)	125
IX. 2. 3. Biodiversitatea cianobacteriilor	133
IX. 3. Concluzii	140
X. Limite și perspective	142
XI. Concluzii	143
Bibliografie	144
Lista abrevierilor	164
Lista lucrărilor publicate	165

Cuvinte cheie:

- comunități cianobacteriene
- izvoare termominerale
- biodiversitate moleculară
- stromatolite recente
- ARNr 16S
- DGGE
- ARISA
- ARDRA

I. Introducere

Ideea generală a acestei teze de doctorat a constituit-o abordarea prin mijloace moleculare a biodiversității. Ținta studiului a fost reprezentată de comunitățile de cianobacterii termofile asociate unor izvoare geotermale (termominerale), rezultate în urma unor foraje în Câmpia de Vest a României. Aceste comunități reprezintă un model excelent de studiu al diversității moleculare (delimitare precisă, omogenitate, condiții stabile impuse de temperatură și de compoziția chimică a apei), al capacității colonizatoare a cianobacteriilor și totodată o sursă de proteine (gene) rezistente la temperatură ridicată, pe care cercetările ulterioare o vor putea valorifica. Proiectul a vizat 5 comunități cianobacteriene asociate unor foraje diferite în ceea ce privește temperatura și alte proprietăți fizico-chimice ale apei forajelor: Ady Endre, Beltiug, Ciocaia, Marghita și Săcuieni.

II. Conceptul de specie la procariote

Clasificarea procariotelor este cea mai tânără și dinamică ramură a taxonomiei organismelor vii.

Printre conceptele de specie actuale descrise în literatură, două par a fi universale aplicabile și care ar putea servi la clasificarea tuturor organismelor vii, inclusiv a procariotelor: PhSC ("Phenetic Species Concept") și ESC ("Evolutionary Species Concept") (Rosello-Mora și Amann, 2001).

Conceptul fenetic și/sau politetic de specie este un concept de similaritate bazat pe caractere care nu sunt în mod necesar universale pentru membrii unității sistematice. Acesta este conceptul care a fost adoptat pentru definirea speciilor procariote, care până acum pare a fi stabil și operațional.

Conceptul evoluționist de specie a fost considerat drept cel mai teoretizat dintre concepte. El presupune analiza filogenetică a organismelor pe baza comparării evoluției diverșilor markeri filogenetici.

Conceptul de specie procariotă din zilele noastre rezultă din îmbunătățirile empirice a ceea ce s-a considerat a fi o unitate, dezvoltarea și îmbunătățirea clasificărilor taxonomice pentru procariote fiind legată de dezvoltarea tehnicilor moleculare moderne.

Conceptul fenetic de specie (PhSC) este cel adoptat pentru definirea speciilor procariote, care până acum pare a fi stabil și operațional.

Viitorul conceptului de specie procariot va fi puternic influențat de secvențarea completă a genomurilor. Fiind secvențate sute de genomuri procariote, microbiologia va putea în curând să acceseze baze de date enorme, furnizând informații care vor avea un impact deosebit asupra conceptelor actuale de specie.

III. Filogenia moleculară a bacteriilor pe baza analizei comparative a unor gene conservate

Analiza comparativă a secvențelor ARN din subunitățile ribosomale mici joacă un rol central în identificarea și taxonomia microbiană, chiar și în ziua de azi, în perioada genomicii.

Introducerea genelor pentru ARNr 16S în studiile de filogenie a dus la revoluționarea acestora și, în final, la reorganizarea viului în 3 supraregnuri de sine stătătoare: Archaea, Bacteria și Eukarya (Woese, 1987; Ludwig și colab., 1993).

Deși avantajele acestui marker sunt bine cunoscute, cu referire atât la conținutul de informații, cât și la complexitatea bazei de date de secvențe, este în mod universal acceptată ideea că ARNr 16S reflectă doar în linii mari istoria evolutivă.

Markeri filogenetici adiționali trebuie să fie luați în considerare pentru o filogenie mai detaliată.

Existența celor trei supraregnuri ale vieții este bine susținută de gene ce codifică proteine cu un nivel ridicat de conservare: factorul de elongare Tu (1 alfa), proteina de șoc termic Hsp60, subunitățile ARN polimerazei și aspartil-, leucil-, triptofanil-, tirozil-ARNt sintetazele. Dacă recunoaștem că ATPazele F_1F_0 și V_1V_0 reprezintă markeri paralogi, atunci aceștia nu pot fi folosiți pentru evaluarea conceptului celor trei supraregnuri deoarece lipsesc secvențele ortoloage eucariote și archeale sau sunt reprezentate doar de duplicații genice cu funcție incertă (Ludwig și Schleifer, 2005).

Chiar dacă există unele discrepanțe în ceea ce privește topologia globală și detaliată a arborilor, viziunea de ansamblu oferită de filogenia ARNr poate fi cu adevărat schimbată numai dacă problema paralogiei și a transferului genic lateral este rezolvată pentru markerii alternativi folosiți. În stadiul actual al cunoașterii, ARNr rămâne cea mai informativă moleculă pentru analizele filogenetice.

IV. Comunități cianobacteriene arhaice și actuale

Comunitățile procariote au dominat suprafața terestră timp de mai bine de 3 miliarde de ani, ele predominând astăzi în biotopuri speciale de tipul izvoarelor termale, a mediilor cu o salinitate ridicată și a izvoarelor sulfuroase. Recent, tot mai mulți cercetători pun accent pe studierea vieții în izvoarele termale deoarece ei sunt de părere că acestea sunt echivalente cu cele în care a început viața pe Pământ.

În cele câteva comunități microbiene fosile foarte bine conservate (din Africa și Australia), datând din perioada arhaică, au fost identificate o serie de taxoni bacterieni, cu aspect filamentos, cel mai probabil cianobacterii din ordinul Oscillatoriales (Walsh, 1992; Schopf, 1992, 2002; Wacey, 2009).

Comunitățile microbiene actuale, dezvoltate în izvoare termale din diferite regiuni de pe Glob, sunt caracterizate de o diversitate scăzută a taxonilor cianobacterieni, cel mai probabil datorată condițiilor fizico-chimice restrictive ale izvoarelor termale.

Majoritatea comunităților termofile de pe Glob, care se dezvoltă la o temperatură mai mică de 74°C, sunt dominate de cianobacterii filamentoase din ordinul Oscillatoriales. Dintre genurile care predomină amintim *Phormidium*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Mastigocladus*, *Oscillatoria*. Așadar, pe baza biodiversității cianobacteriilor din comunitățile fosile și din cele actuale, poate fi propusă o analogie între comunitățile străvechi și cele actuale, dezvoltate în jurul izvoarelor termale.

V. Metode moleculare de investigare a diversității comunităților microbiene asociate diverselor habitate

De-a lungul timpului, determinarea diversității microorganismelor din ecosisteme naturale și artificiale s-a dovedit a fi o problemă dificilă. Abordarea clasică de determinare a bacteriilor din probe naturale se bazează pe tehnici dependente de culturi de îmbogățire, în paralel cu diverse teste biochimice și fiziologice. Aceste metode, însă, nu reflectă structura comunității, ci mai degrabă selectivitatea mediului de creștere. Totodată, aceste tehnici sunt consumatoare de timp și resurse, organismul investigat putând devia de la caracterele fiziologice și genotipice pe care le prezintă în populația naturală, iar doar o fracțiune foarte mică (0,1-10%) din bacterii sunt cultivabile în laborator.

Datorită faptului că majoritatea studiilor care aplică amprentarea ADN asupra comunităților microbiene se bazează pe ARN ribosomal, în cele ce urmează vom discuta mai pe larg despre diferite metode ce folosesc ca marker această genă.

Tehnici de hibridare a acizilor nucleici

a) Hibridarea reciprocă a ADN din comunități distincte determină dacă 2 eșantioane conțin aceleași organisme, indiferent de compoziția lor.

b) Hibridarea cantitativă, bazată pe sonde oligonucleotidice marcate fluorescent. Aceasta abordare fie poate fi una de tip "dot-blot" (Rainey și colab., 1994), care presupune investigarea unui amestec de acizi nucleici izolați, fie una *in situ* a celulelor întregi, care presupune investigarea unei populații fixate folosind sonde oligonucleotidice (Amann și Fuchs, 2008).

Analiza ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

- Fragmentele amplificate prin PCR din genele ARNr 16S dintr-o populație microbială mixtă, chiar dacă au aceeași lungime, totuși prezintă diferențe la nivel nucleotidic.
- Un mod de a detecta aceste diferențe este construirea unor biblioteci de clone ADN 16S, digestia clonelor individuale endonucleaze de restricție și compararea profilelor obținute pentru discriminarea fragmentelor diferite (Mwrichia și colab., 2010).

Analiza T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism)

- Are loc marcarea printr-un compus fluorescent a uneia dintre amorse, detectabil cu ajutorul unui analizator genetic bazat pe fluorescență.
- Producții PCR sunt obținuți prin folosirea amorselor ADN 16S universale, apoi sunt digerați cu endonucleaze de restricție și supuși unei electroforeze capilare (Avaniss-Aghajani și colab., 1996).

Analiza SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)

- În condiții nedenaturante, ADN monocatenar prezintă structuri secundare diferite, datorită împerecherii specifice a nucleotidelor.
- Schimbarea unui singur nucleotid poate altera conformația unei catene ADN și va permite ca două fragmente ADN care diferă printr-un singur nucleotid să poată fi deosebite (Orita și colab., 1989).

Analiza LH-PCR (Length Heterogeneity PCR)

- Amprentarea se poate realiza și pe baza variațiilor naturale de lungime ale fragmentelor nucleotidice.

- Protocolul tipic implică amplificarea PCR a unui fragment genic cu una dintre amorse marcată fluorescent, urmată de electroforeza produșilor de amplificare pe un analizor genetic (Suzuki și colab., 1998).
- Dacă fragmentul marker folosit este regiunea ITS, atunci tehnica poartă numele de ARISA (Amplified Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) (Fisher și Triplett, 1999).

Amprentarea rep-PCR

- Această metodă folosește amorse care pot amplifica regiuni repetate din genom, dispersate în mod specific pentru o anumită specie; ampliconii sunt migrați electroforetic, rezultând amprente genomice complexe și foarte specifice.
- Această tehnică nu poate fi aplicată direct comunităților microbiene, ci doar pentru identificarea speciilor/tulpinilor izolate și cultivate în laborator (Colwell și colab., 1981; Muralitharan și Thajuddin, 2011).

Analiza RAPD (Random Amplified DNA Polymorphism), AP-PCR (Arbitrarily primed-PCR), DAF (DNA Amplification Fingerprinting)

- Aceste tehnici folosesc amorse cu specificitate scăzută, scurte, de aproximativ 10 nucleotide (RAPD), 18 nucleotide (AP-PCR) sau 6-8 nucleotide (DAF) pentru a genera profile de amprentare genomică specifice.
- Amorsele se aliniază simultan la mai multe regiuni ale genomului. În principiu, tehnicile scanează genomurile la o constângere scăzută pentru amplificarea unor fragmente scurte repetate.

Analiza DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

- Este o metodă prin care fragmente de ADN de lungime identică sau aproape identică, dar cu secvență nucleotidică diferită, pot fi separate electroforetic.
- Separarea este bazată pe schimbări în mobilitatea electroforetică a fragmentelor de ADN care migrează vertical într-un gel de poliacrilamidă cu o concentrație crescătoare de agenți denaturanți ai ADN (formamidă și uree) (Muyzer, 1993).

Studiile integrate ce combină metodele moleculare de investigare a compoziției speciilor și abundența grupurilor microbiene importante, cu măsurarea anumitor procese și parametri naturali, sunt adoptate pe scară tot mai largă. Aceste studii au potențialul de a relaționa structura comunităților cu funcțiile și activitățile microbiene complexe. Totuși, rolul ecologiei microbiene clasice nu ar trebui să fie subestimat.

Studiile moleculare însoțite de investigațiile bazate pe culturi, vor ajuta și în viitor la identificarea organismelor existente în natură cu scopul de a descoperi bogăția biodiversității reprezentată de comunitățile microbiene naturale.

VI. Metodologia de abordare a studiului

Metodologia de abordare a acestui studiu (fig. 1) a presupus colectarea materialului biologic, studierea lui prin microscopie optică și electronică, urmată de izolarea ADN pentru analize ulterioare folosind metode de biologie moleculară: Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA), Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) și Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).

Comunitățile de cianobacterii asociate izvoarelor termominerale din Câmpia de Vest a României prezintă, teoretic, o biodiversitate scăzută impusă de condițiile fizico-chimice ale apei. Datorită acestui fapt, am considerat că investigarea lor folosind doar 3 dintre tehnicile descrise anterior (ARISA, ARDRA și DGGE), pe baza markerului ADNr 16S și a secvenței ITS, este suficientă pentru a oferi o imagine de ansamblu asupra diversității taxonilor cianobacterieni ce formează aceste comunități.

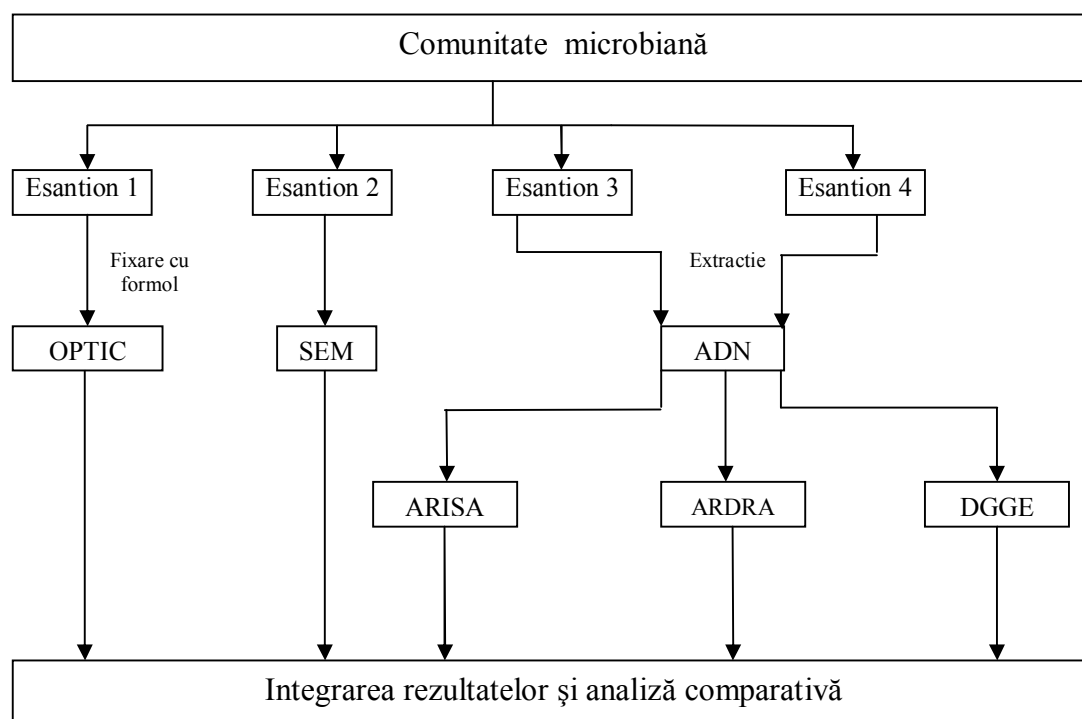


Fig. 1. Metodologia de abordare a studiului biodiversității cianobacteriilor din comunitățile termofile din Câmpia de Vest a României.

VII. Material și metode

Eșantionarea materialului biologic

Au fost prelevate în total 4 eșantioane distincte, pentru studiile de microscopie optică, electronică și pentru analizele moleculare (DGGE, ARISA, ARDRA).

Studiul morfologic

Investigarea morfologică a constat atât în observarea cu ajutorul unui microscop optic Olympus cu scopul identificării taxonilor cianobacterieni din comunitate, cât și o analiză prin microscopie electronică scanning (SEM) pentru observarea modului de organizare spațială a comunității.

Izolarea ADN

Izolarea ADN a fost efectuată prin 3 tehnici individuale: un protocol clasic elaborat în laborator și două kit-uri comerciale.

Abordarea moleculară

a) Analiza ARISA

Principiul metodei constă în migrarea prin capilarul unui analizor genetic a unor fragmente de ADN marcate în prealabil cu un fluorocrom (FAM), aparatul determinând fragmentele diferite pe baza lungimii lor. Astfel, folosind o pereche de amorse specifice, a fost amplificată regiunea ITS cianobacteriană din ADN-ul întregii comunități, fragmentele obținute fiind supuse apoi electroforezei prin capilarul unui analizor genetic ABI Prism 310.

b) Analiza ARDRA

Au fost utilizate amorse specifice cianobacteriilor pentru amplificarea fragmentului ADNr 16S+ITS. Diferențierea s-a efectuat prin ligarea fragmentelor în vectorul plasmidic pTZ57R/T (Fermentas) și separarea ulterioară prin electroporare în celule de *Escherichia coli*.

Pentru identificarea fragmentelor distincte s-a recurs la digestia cu endonucleaza de restricție *TaqI* urmată de electroforeza produșilor obținuți.

Profilele de restricție diferite au fost identificate prin analiza grupărilor ("cluster analysis"), efectuată pe baza lungimii estimative a fragmentelor rezultate în urma digestiei.

Fragmentele cu profil de restricție diferit au fost secvențate, secvențele parțiale obținute fiind comparate cu cele stocate în baza de date de nucleotide NCBI prin metoda BLAST pentru identificarea taxonilor.

c) Analiza DGGE

Utilizând o pereche de amorse specifice cianobacteriilor, a fost amplificat prin PCR un fragment din gena pentru ARNr 16S direct din ADN_g izolat din probele de pe teren. Producții de amplificare obținute au fost migrați electroforetic pe un gel de poliacrilamidă cu uree și formamidă ca agenți denaturanți.

În cazul comunității de la Marghita, au fost izolate 8 fragmente din gelul de poliacrilamidă, după DGGE. Aceste fragmente au fost folosite ca matrițe pentru re-DGGE și compararea profilurilor.

Deoarece majoritatea profilelor au fost similare celui inițial, amplificat din ADN_g al întregii comunități, a fost construită o bibliotecă de clone folosind aceeași pereche de amorse pentru fiecare fragment (5 clone/fragment, în total 40 de clone). Fiecare clonă a fost supusă unei noi DGGE și s-a încercat secvențarea ei.

Fragmentele izolate din gel sau cele din biblioteca de clone de la Marghita au fost secvențate, secvențele parțiale obținute fiind comparate cu cele stocate în baza de date de nucleotide NCBI prin metoda BLAST pentru identificarea taxonilor.

VIII. Rezultate și discuții

Descrierea biotopurilor și investigații morfologice

Izvoarele geotermale (fig. 2) reprezintă biotopuri stabile, ideale pentru studiul biodiversității comunităților cianobacteriene asociate acestora datorită faptului că nu sunt supuse variațiilor termice sezoniere.

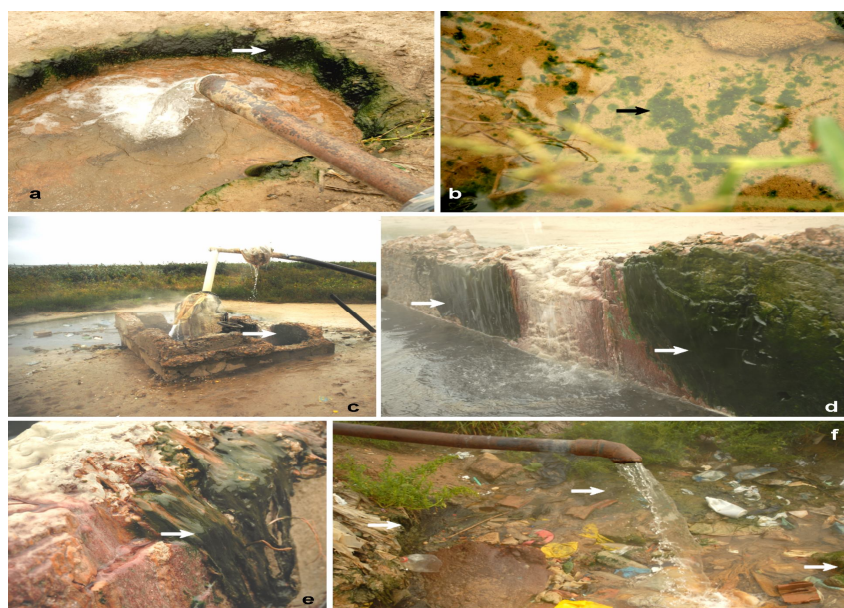


Fig. 2. Iconografia unor foraje termominerale și a comunităților cianobacteriene așa cum au fost observate în momentul prelevării probelor. **a-b.** Beltiug (jud. Satu-Mare), **c-e.** Ciocaia (jud. Bihor), **f.** Marghita (jud. Bihor). Săgețile indică aglomerările de biomasă cianobacteriană (“cyanobacterial mats”).

Au fost selectate 5 comunități cianobacteriene termofile pentru investigații morfologice și moleculare: Ady Endre, Beltiug, Ciocaia, Marghita și Săcuieni.

Temperatura apei termominerale variază în cele 5 izvoare investigate de la 55°C până la 67°C.

Observațiile prin microscopie optică au indicat prezența unui număr redus de taxoni cianobacterieni în cele 5 comunități, o posibilă consecință a proprietăților fizico-chimice ale apelor termominerale.

Dintre taxonii identificați, *Symploca thermalis*, *Mastigocladus laminosus*, *Phormidium janthiphorum* și *Symploca meneghineana* sunt tipici izvoarelor termale.

Imaginile SEM obținute (fiind exemplificată comunitatea de la Marghita în fig. 3) au arătat faptul că structurile comunităților investigate se înscriu în tiparul comunităților cianobacteriene de acest gen, fiind similare modelului trilaminar de organizare al unei comunități cianobacteriene propus în literatură.



Fig. 2. (continuare). Iconografia unor foraje termominerale și a comunităților cianobacteriene așa cum au fost observate în momentul prelevării probelor. **g-h.** Marghita (jud. Bihor), **i-j.** Ady Endre, **k-m.** Săcuieni. Săgețile indică aglomerările de biomasă cianobacteriană (“cyanobacterial mats”).

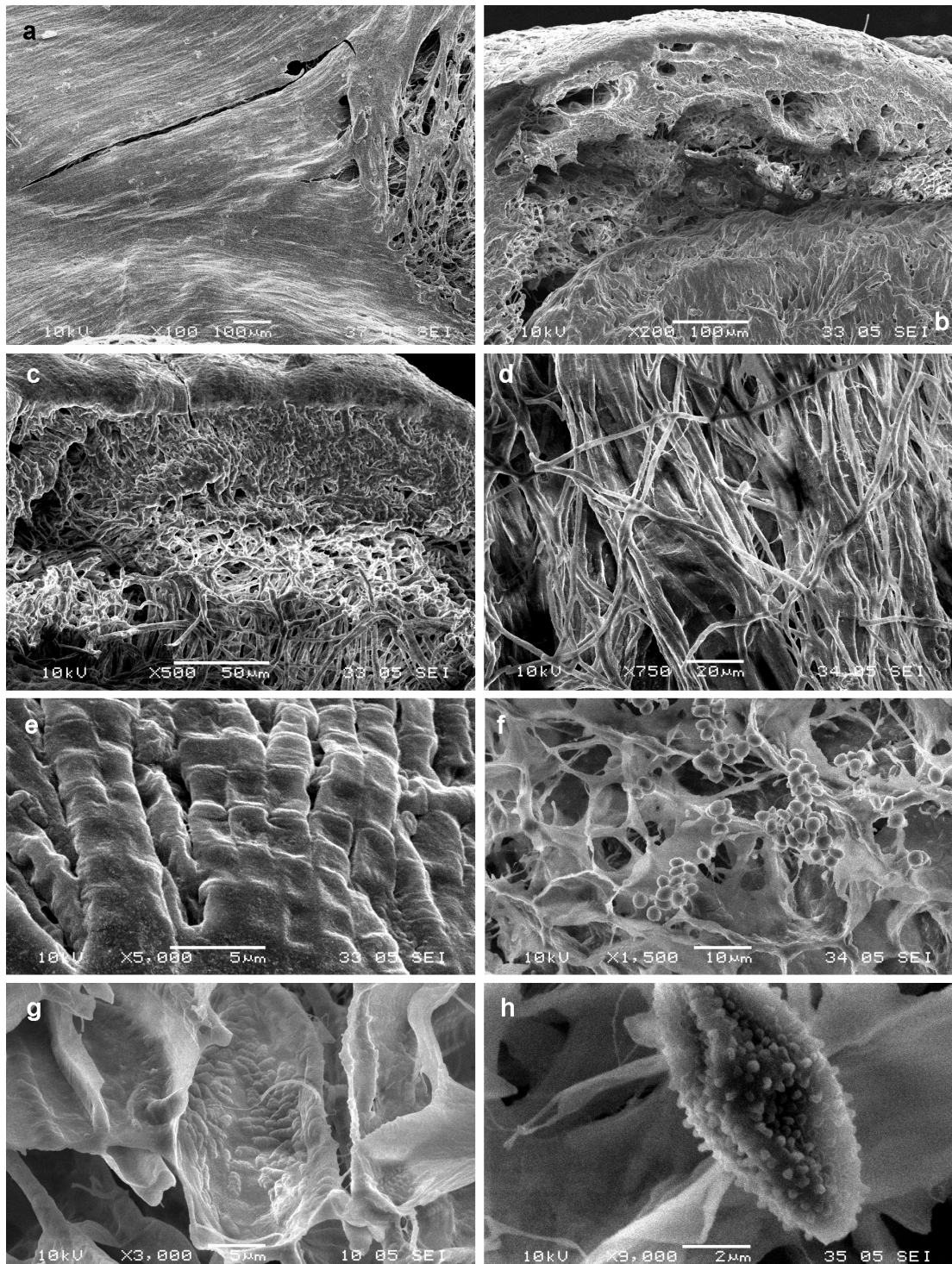


Fig. 3. Structura comunității cianobacteriene (“cyanobacterial mat”) de la forajul termomineral de la Marghita (jud. Bihor) observată în microscopie electronică scanning (SEM). **a.** suprafața, cu filamente cianobacteriene orientate relativ uniform, **b-c.** fractură transversală prezentând structura în profunzime, **d-e.** strat lax format din filamente dispuse în rețea, **f-h.** bacterii dispuse în ochiurile rețelei sau în resturile pereților celulari ai cianobacteriilor.

Investigarea biodiversității prin metode moleculare

a) Investigarea biodiversității prin metoda DGGE

Profilul DGGE (fig. 4) a indicat existența a 3 taxoni cianobacterieni în comunitatea de la Ady Endre, 4 în cea de la Beltiug, respectiv 6 în comunitățile de la Ciocaia și Săcuieni.

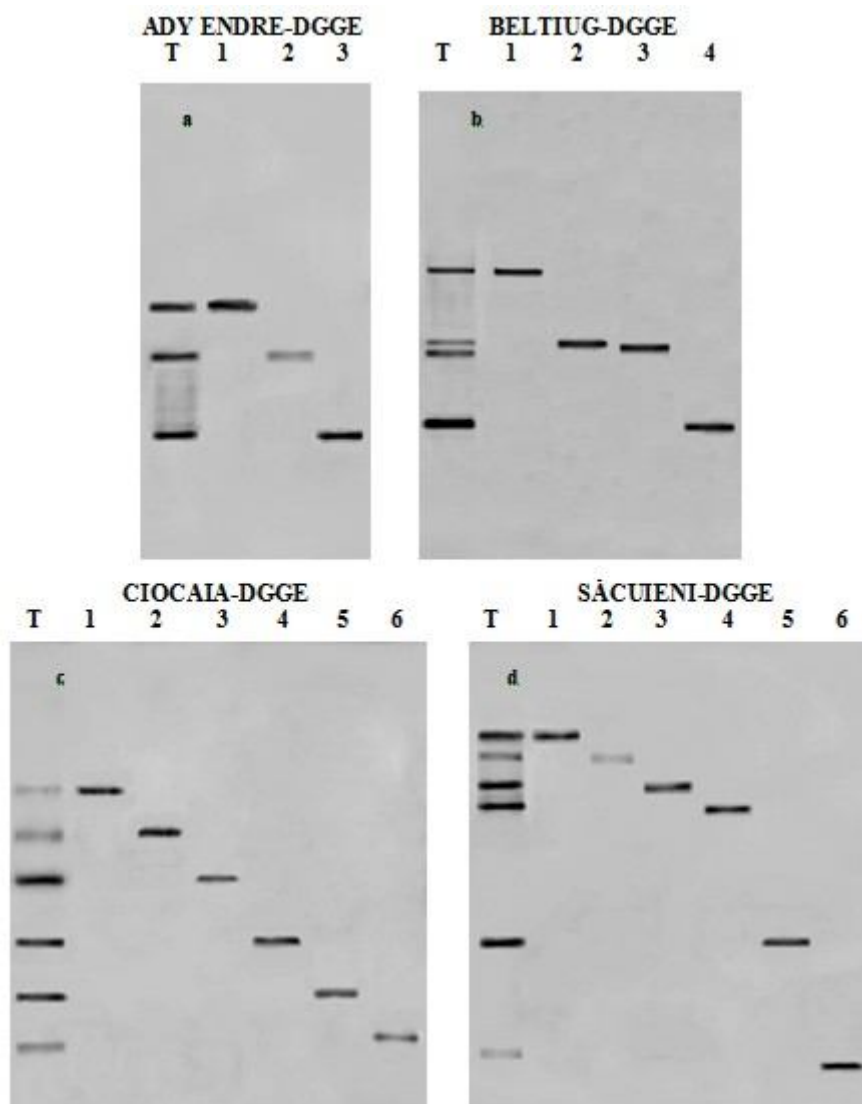


Fig. 4. Profilul DGGE al fragmentelor ADNr 16S amplificate cu perechea de amorse 359F-781R(b) din comunitățile de la: **a** - Ady Endre; **b** - Beltiug; **c** - Ciocaia; **d** - Săcuieni. Figura prezintă atât profilul întregii comunități (T), cât și al fragmentelor izolate din gelul de poliacrilamidă și re-amplificate (indicate prin cifre).

În cazul comunității cianobacteriene de la Marghita (fig. 5; tab. 1), electroforeza în gel cu gradient denaturant a evidențiat o serie de neajunsuri ale acestei metode (Coman și colab., 2011), care în final pot duce la o apreciere incorectă a biodiversității microbiene asociate unui anumit biotop: existența operonilor multipli în același

genom, existența unor domenii multiple de topire în aceeași secvență și hibridarea între fragmente ADN provenite de la taxoni strâns înrudiți.

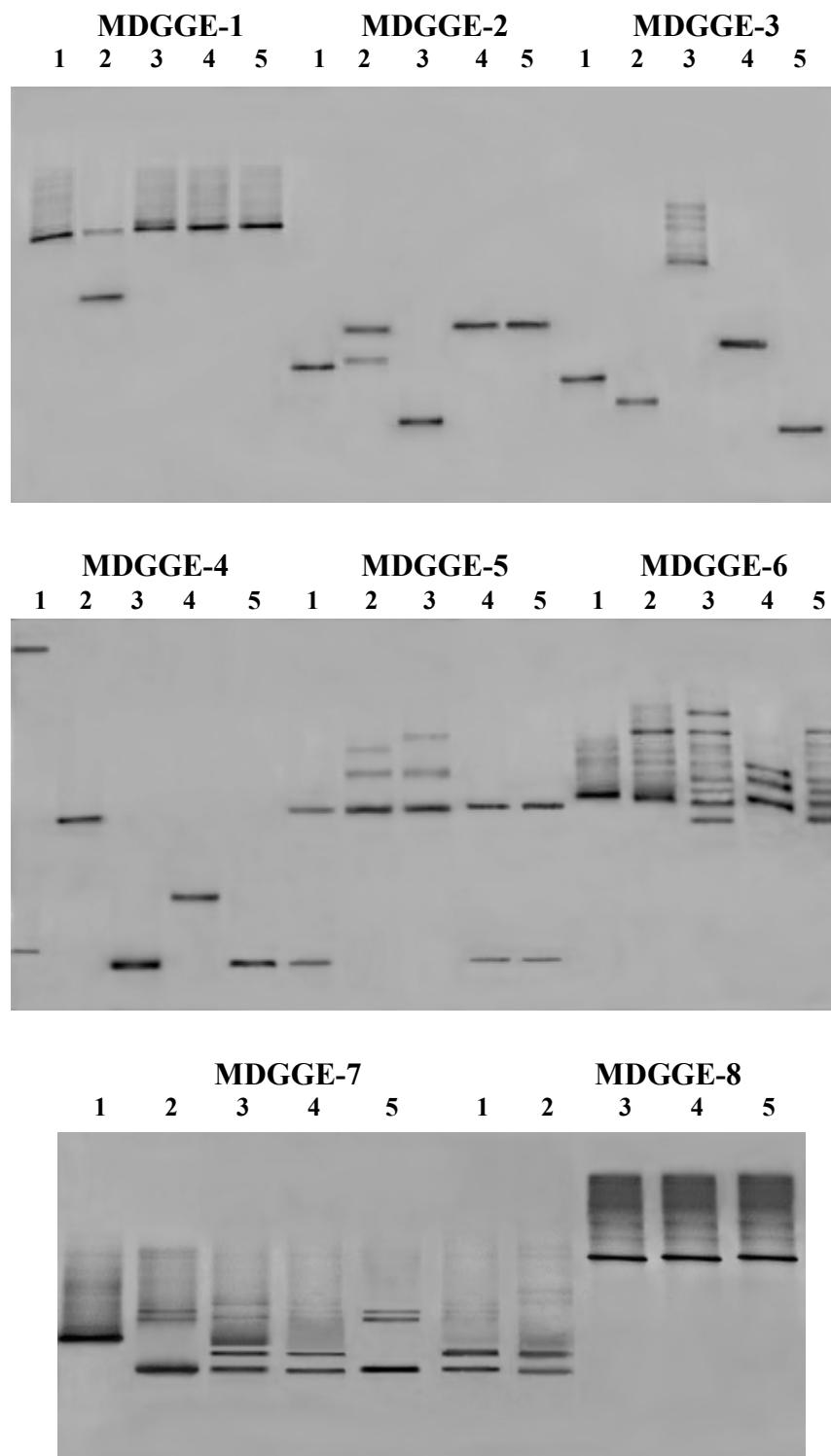


Fig. 5. Profilurile DGGE ale bibliotecilor de clone de la Marghita construite pornind de la cele 8 fragmente izolate inițial din gelul de poliacrilamidă, după DGGE pe ADN genomic al întregii comunități. Pentru fiecare fragment au fost selectate 5 clone, fragmentul parțial ADN_r 16S a fost reamplificat din fiecare clonă și supus din nou electroforezei în gel cu gradient denaturant.

Tabel 1

Similaritatea de secvență a fragmentelor din bibliotecile de clone MDGGE de la Marghita obținute din cele 8 fragmente izolate inițial din gelul de poliacrilamidă după DGGE.

Clona	Cea mai apropiată potrivire GenBank (NCBI)
MDGGE1-1	Uncult. bact. Geyserite B1 (identic cu M1-3); ns.*
MDGGE1-2	<i>Leptolyngbya</i> sp. CCMEE6116
MDGGE1-3	Uncult. bact. <i>Geyserite</i> B1
MDGGE1-4	Uncult. bact. <i>Geyserite</i> B1
MDGGE1-5	Uncult. bact. Geyserite B1 (identic cu M1-3);ns
MDGGE2-1	<i>Phormidium pseudopristleyi</i> ANT.ACEV5.4
MDGGE2-2	<i>Phormidium</i> sp. NIVA-CYA202
MDGGE2-3	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02
MDGGE2-4	Uncult. cyanobact. clone R8-R60
MDGGE2-5	Uncult. cyanobact.clone R8-R60 (identic cu M2-4);ns
MDGGE3-1	<i>Plectonema</i> sp. HPC-49
MDGGE3-2	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02
MDGGE3-3	<i>Oscillatoriales</i> cyanobact. BC007
MDGGE3-4	<i>Phormidium</i> sp. NIVA-CYA202
MDGGE3-5	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02
MDGGE4-1	Uncult. cyanobact. clone 02D2Z20
MDGGE4-2	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02
MDGGE4-3	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02
MDGGE4-4	<i>Phormidium animale</i> CCALE140
MDGGE4-5	<i>Leptolyngbya</i> sp. N62DM (identic cu M4-3); ns
MDGGE5-1	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02 (ident. M7-2+M7-3);ns
MDGGE5-2	Uncult. bact. <i>Geyserite</i> B1
MDGGE5-3	Uncult. bact. Geyserite B1(identic cu M10-2); ns
MDGGE5-4	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02 (ident. M7-2+M7-3);ns
MDGGE5-5	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02 (ident. M7-2+M7-3);ns
MDGGE6-1	Uncult. bact. Geyserite B1
MDGGE6-2	Uncult. bact. Geyserite B1
MDGGE6-3	Uncult. bact. Geyserite B1
MDGGE6-4	Uncult. bact. Geyserite B1
MDGGE6-5	Uncult. bact. Geyserite B1
MDGGE7-1	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02
MDGGE7-2	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02
MDGGE7-3	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02
MDGGE7-4	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02 (identic cu M7-3); ns
MDGGE7-5	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02 (identic cu M7-2); ns
MDGGE8-1	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB30S02 (identic cu M7-3); ns
MDGGE8-2	could not be sequenced
MDGGE8-3	Uncult. bact. <i>Geyserite</i> B1
MDGGE8-4	Uncult. bact. Geyserite B1 (identic cu M8-3); ns
MDGGE8-5	Uncult. bact. Geyserite B1 (identic cu M8-3); ns

*ns- nesecvențat

Rezultatul interogării BLAST (tab. 2) indică faptul că majoritatea taxonilor identificați prin metoda DGGE și secvențare aparțin cianobacteriilor filamentoase din grupul Oscillatoriales. Astfel, au fost observate următoarele genuri cianobacteriene: **Ady Endre:** *Leptolyngbya*, *Phormidium*; **Beltiug:** *Oscillatoria*, alte Oscillatoriale; **Ciocaia:** *Arthrospira*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Phormidium*; **Marghita:** *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Plectonema*, alte Oscillatoriale; **Săcuieni:** *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Geitlerinema*, *Microcoleus*.

Tabel 2

Identitatea fragmentelor ADNr 16S amplificate din benzile excizate din gelul de poliacrilamidă după DGGE

Comunitatea	Nr. fragm. DGGE obs.	Fragmentul	Cea mai apropiată potrivire GenBank (NCBI)	Identitate (%)
Ady Endre	3	AE DGGE-1	<i>Leptolyngbya compacta</i> GSE-PSE28-08A	98
		AE DGGE-2	<i>Phormidium corium</i> 0416	98
		AE DGGE-3	Uncult. <i>Leptolyngbya</i> sp. isol. DGGE band 3-5	98
Beltiug	4	B DGGE-1	Uncult. cyanobacterium clone TDNP-wbc97_251_1_123	96
		B DGGE-2	<i>Oscillatoria</i> sp. LEGE06018	96
		B DGGE-3	<i>Oscillatoria</i> sp. MMG-3	97
		B DGGE-4	<i>Oscillatoriales</i> cyanobacterium BC007	97
Ciocaia	6	C DGGE-1	<i>Arthrospira platensis</i> Sp_11	98
		C DGGE-2	<i>Oscillatoria</i> sp. LEGE06018	99
		C DGGE-3	<i>Lyngbya birgei</i> CCC 333	95
		C DGGE-4	<i>Phormidium</i> sp. 195_A12	97
		C DGGE-5	Uncult. bacterium clone clone JW56-B11	94
		C DGGE-6	Uncult. bacterium clone clone JW56-B11	96
Săcuieni	6	S DGGE-1	<i>Leptolyngbya</i> sp. CR_10M	99
		S DGGE-2	<i>Leptolyngbya</i> sp. GSE-PSE28-08A	96
		S DGGE-3	Uncult. cyanobacterium clone Mat-CYANO-S22	100
		S DGGE-4	<i>Phormidium</i> cf. <i>formosum</i> P-FW	98
		S DGGE-5	<i>Geitlerinema</i> sp. CR_13M	98
		S DGGE-6	<i>Microcoleus</i> sp. SAG2212	99

b) Investigarea biodiversității prin metoda ARISA

Biodiversitatea relativă a cianobacteriilor din comunitățile investigate a fost determinată prin numărarea vârfurilor ("peak"-urilor) din electroforegrama rezultată în urma electroforezei capilare (fig. 6), care corespund, cel puțin teoretic, unor taxoni cianobacterieni. Astfel, au fost observate 5 fragmente la Ciocaia, 6 la Săcuieni, 7 la Ady Endre, 8 fragmente la Beltiug și 13 la Marghita. Lungimea fragmentelor ITS amplificate variază de la aproximativ 310 pb până la aproximativ 780 pb.

c) Investigarea biodiversității prin metoda ARDRA

După evaluarea profilelor de restricție și secvențare (tab. 3), a fost observat faptul că majoritatea taxonilor identificați aparțin, cel mai probabil, cianobacteriilor filamentoase din grupul Oscillatoriales.

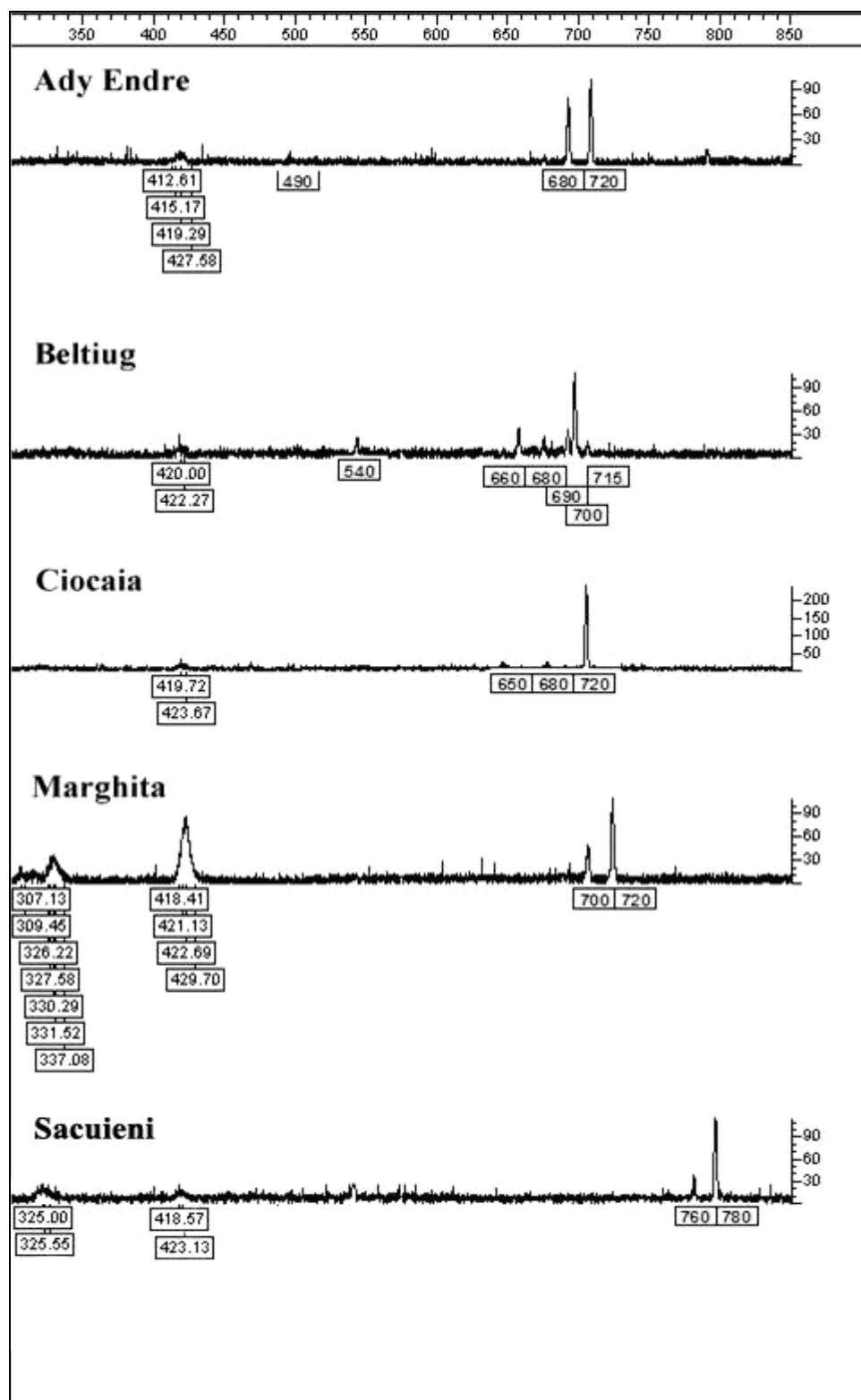


Fig. 6. Profilul ARISA al fragmentelor ITS cianobacteriene amplificate din ADN genomic al comunităților investigate

Tabel 3

Identitatea secvențelor parțiale ADNr 16S obținute prin metoda ARDRA din ADN genomic al celor 5 comunități cianobacteriene investigate

Clona	Taxonul cu cel mai mare grad de similaritate	Identitate %
ADY ENDRE		
AE1	<i>Leptolyngbya compacta</i> GSE_PSE28_08A	99
AE3	<i>Leptolyngbya laminosa</i> ETS_08	98
AE21	<i>Spirulina laxissima</i> SAG 256.8	97
AE23	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB32S02	97
BELTIUG		
B1	<i>Leptolyngbya</i> sp. CR_L26	96
B2	<i>Oscillatoria</i> sp. LEGE06018	95
B4	<i>Oscillatoria acuminata</i>	97
B5	<i>Oscillatoriales cyanobacterium</i> BC007	96
B11	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> T-27	95
B13	Uncultured <i>Gemmatimonas</i> sp. A1631	96
B26	Uncultured <i>Gemmatimonas</i> sp. A1631	95
CIOCAIA		
C1	<i>Oscillatoria earlei</i> NTAP016	92
C2	<i>Arthrospira platensis</i> Sp-11	97
C3	<i>Leptolyngbya</i> sp. LEGE 07319	99
C7	<i>Phormidium animale</i> PMC239.04	99
C16	<i>Phormidium</i> sp. 195-A12	99
MARGHITA		
M1	<i>Gemmatimonadetes bacterium</i> 100M2_B10	90
M2	<i>Leptolyngbya antarctica</i> TM1FOS73	93
M4	<i>Phormidium pseudopristleyi</i> ANT.ACEV5.3	98
M5	<i>Phormidium</i> sp. MBIC10025	96
M6	<i>Oscillatoriales cyanobacterium</i> BC007	96
M12	Uncultured bacterium GBII-5	92
M21	<i>Phormidium</i> sp. 195-A12	98
M24	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> T-27	92
M29	<i>Microcoleus steenstrupii</i> 148-2A	97
M36	<i>Leptolyngbya</i> sp. CR_L14	95
M40	Uncultured <i>Gemmatimonas</i> sp. A1631	92
M43	<i>Microcoleus</i> sp. HTT-U-KK5	95
M44	Uncultured <i>Gemmatimonas</i> sp. A1631	92
SĂCUIENI		
S1	<i>Leptolyngbya</i> sp. CR_10M	96
S2	<i>Phormidium pseudopristleyi</i> ENCB-AD17	97
S3	<i>Leptolyngbya</i> sp. GSE-PSE28-08A	97
S5	<i>Microcoleus</i> sp. HTT-U-KK5	99
S6	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> T27	93
S16	<i>Leptolyngbya</i> sp. BX10	95
S20	<i>Geitlerinema</i> sp. CR_13M	97

Astfel, în urma ARDRA au fost observate următoarele genuri cianobacteriene probabile (tab. 3): **Ady Endre:** *Leptolyngbya*, *Spirulina*; **Beltiug:** *Leptolyngbya*, *Oscillatoria*; **Ciocaia:** *Oscillatoria*, *Arthrospira*, *Phormidium*; **Marghita:** *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Microcoleus*; **Săcuieni:** *Microcoleus*, *Phormidium*, *Leptolyngbya*, *Geitlerinema*.

Tabel 4

Numărul taxonilor și identitatea genurilor cianobacteriene identificate în comunitățile investigate

Comunitatea	Număr taxoni cianobacterieni identificați		Genuri cianobacteriene identificate
Ady Endre	DGGE	3	<i>Leptolyngbya</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Spirulina</i>
	ARDRA	4	
Beltiug	DGGE	4	<i>Leptolyngbya</i> , <i>Oscillatoria</i>
	ARDRA	4	
Ciocaia	DGGE	4	<i>Arthrospira</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Phormidium</i>
	ARDRA	5	
Marghita	DGGE	8	<i>Leptolyngbya</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Microcoleus</i> , <i>Plectonema</i>
	ARDRA	8	
Săcuieni	DGGE	5	<i>Microcoleus</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Leptolyngbya</i> , <i>Geitlerinema</i>
	ARDRA	6	

d) Concluzii

Abordarea moleculară s-a bazat pe analiza, independentă de tehnicile de cultivare a microorganismelor în laborator, genei pentru ARNr 16S și a regiunii ITS (Internal Transcribed Spacer) ce desparte această genă de cea pentru ARNr 23S.

Utilizarea celor 3 metode moleculare (DGGE, ARISA și ARDRA) în paralel a dus la identificarea unui număr mai mare de taxoni cianobacterieni în comunitățile investigate comparativ cu aplicarea unei tehnici singulare (tab. 4).

Deși comunitățile investigate au început să se dezvolte în anii 1970 doar, abundența taxonilor este similară, în unele cazuri chiar mai mare, altor comunități cianobacteriene din izvoare termale.

Taxonii cianobacterieni identificați în comunitățile investigate aparțin ordinului *Oscillatoriales*, predominând genurile *Phormidium* și *Leptolyngbya*. *Mastigocladus laminosus*, specii ale genului *Symploca*, precum și *Geitlerinema thermale*, identificați pe baza caracterelor morfologice, nu au fost evidențiați folosind

metodele moleculare, punând sub semnul întrebării acuratețea abordării clasice, morfologice, în studiile de biodiversitate microbiană.

Speciile aparținând genului *Leptolyngbya* prezintă o distribuție destul de limitată în izvoare termale la nivel global. Acestea au mai fost întâlnite doar în Groenlanda, Mexic și Tailanda, la o temperatură cuprinsă între 40°C și 74°C și un pH de 7-9. În comunitățile din Câmpia de Vest a României, genul *Leptolyngbya* a fost întâlnit la Ady Endre, Belciug, Marghita și Săcuieni.

Genul *Phormidium* prezintă o distribuție mult mai abundentă, speciile acestui gen putând fi întâlnite pe toate continentele. În România, specii de *Phormidium* termofile au fost observate în comunitatea de la Ady Endre, Ciocaia, Marghita și Săcuieni.

Speciile de *Arthrospira* sunt destul de neobișnuite în izvoarele termale datorită condițiilor restrictive din aceste medii precum și datorită faptului că aceste specii sunt planctonice. În cazul comunității de la Ciocaia, identificarea unei secvențe parțiale ADNr 16S ca provenind de la *Arthrospira platensis* poate fi asociată cu existența taxonului în comunitatea cianobacteriană. Dat fiind faptul că este prima semnalare a unei specii de *Arthrospira platensis* în izvoare termale, acest fapt trebuie confirmat prin studii ulterioare.

Singurele izvoare termale de pe Glob în care au fost întâlnite specii de *Spirulina* sunt în Argentina și în Mexic, la o temperatură de 35°C-38°C și un pH mai mare de 9. În studiul de față, în comunitatea de la Ady Endre a fost identificat un taxon cu un procent ridicat de identitate a unui fragment ADNr 16S cu *Spirulina laxissima*. Acest taxon este semnalat, probabil, pentru prima dată în Europa în izvoare termale, alături de alte specii aparținând genurilor *Lyngbya* (Ciocaia), *Plectonema* (Marghita) și *Geitlerinema* (Săcuieni).

În cazul genurilor identificate în comunitățile termofile din Câmpia de Vest a României în urma acestui studiu și care sunt semnalate pentru prima dată în Europa este necesară o monitorizare pe viitor a comunităților din care provin, alături de epuizarea tuturor surselor din literatură care ar putea menționa acest lucru, pentru a verifica veridicitatea informațiilor.

Microcoleus steenstrupii, întâlnită în comunitatea de la Marghita, este cunoscută în general ca fiind o specie deșertică. Însă, datorită faptului că a mai fost întâlnită și în izvoare termale din Islanda și datorită identității secvențelor parțiale

ADNr 16S de 96%, putem spune cel mai probabil că acest taxon se dezvoltă și în comunitatea de la Marghita, fiind a doua semnalare de acest gen din lume.

IX. Sunt implicate comunitățile cianobacteriene asociate izvoarelor geotermale în formarea stromatolitelor moderne?

Comunitățile microbiene actuale au un rol deosebit de important în studiile evolutive. Uneori, ele pot fi considerate adevărate sisteme analoage celor ce existau pe suprafața Terrei în urma cu miliarde de ani.

În Câmpia de Vest a României, asociate izvorului geotermal de la Ciocaia, au fost descoperite formațiuni sedimentare recente, stratificate, cel mai probabil stromatolite actuale (fig. 7). Acest fapt reprezintă un pas important în studiile de evoluție și viață incipientă pe Terra deoarece permite investigarea procesului de mineralizare și fosilizare într-o comunitate microbiană ce se dezvoltă într-un mediu diferit de cel marin.

Pentru a confirma natura stromatolitică a acestor formațiuni, au fost prelevate 3 eșantioane (S1, S2, S3) (fig. 7) în vederea investigării compoziției chimice, a morfologiei acestor microbialite și a biodiversității cianobacteriilor.

Analiza elementală (EDX - "Energy Dispersive X-ray analysis") (fig. 10, 11) a indicat faptul că în probele investigate, atât în straturile superficiale, cât și în profunzime, predomină O (între 41,1%-50,4%), C (între 15,8%-33,6%) și Ca (între 16,5%-30,1%). Pe lângă acestea, au mai fost identificate și alte elemente, însă cu o pondere sub 5%: Ba, Sr, Zr, Fe, Na, Mg, S.

Pe baza observațiilor de mai sus putem afirma că formațiunea sedimentară este formată cel mai probabil prin depunerea de CaCO_3 sub forma grupurilor calcit și aragonit (calcit - CaCO_3 ; magnezit - MgCO_3 ; siderit - FeCO_3 ; stronțianit - SrCO_3 ; witerit - BaCO_3).

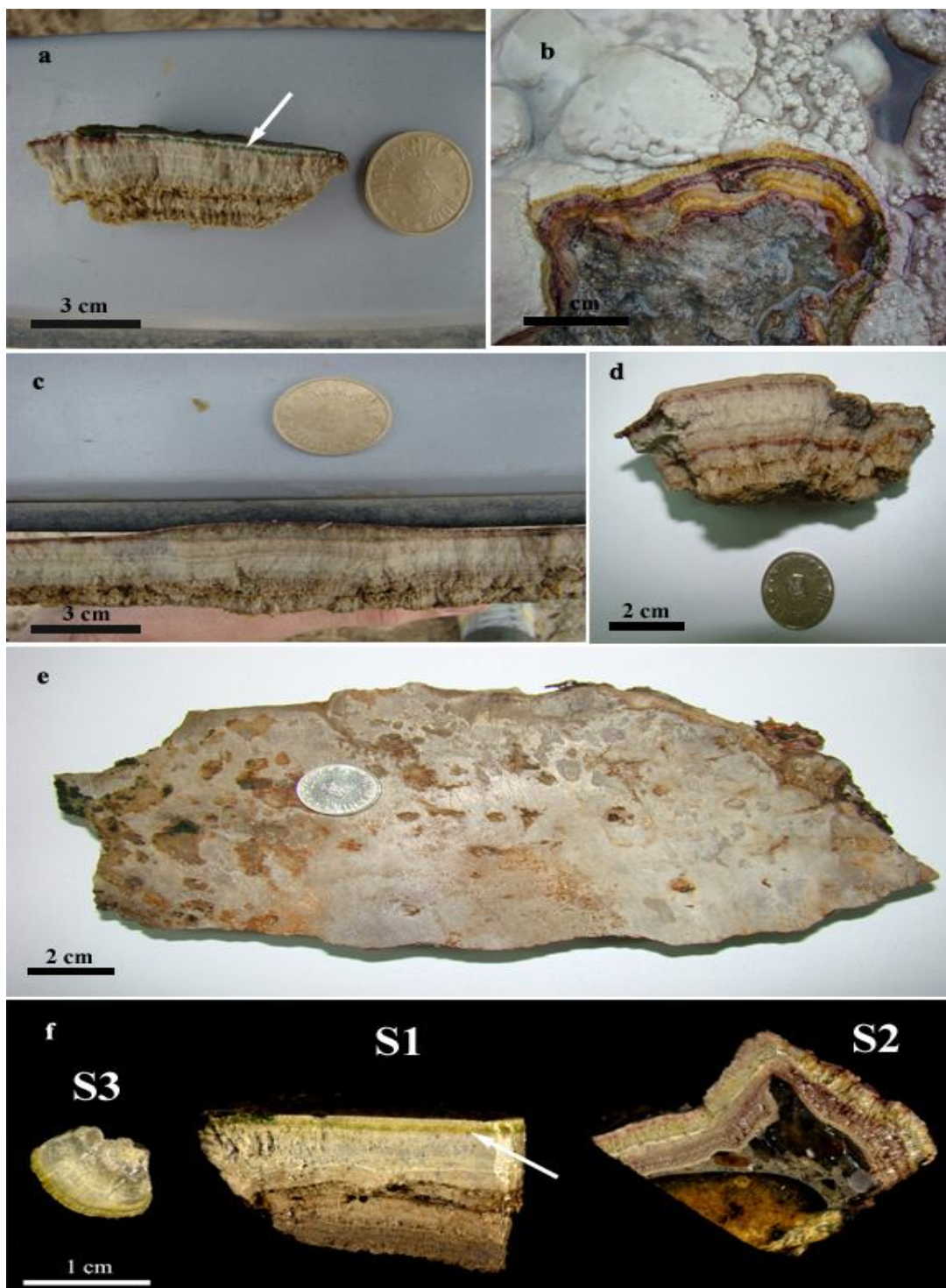


Fig. 7. Structura eşantioanelor prelevate din apropierea izvorului geotermal de la Ciocaia. a - fractură; săgeata indică un biofilm, cel mai probabil cianobacterian, care începe să fie înglobat în CaCO_3 ; b - fotografia unui stromatolit așa cum apare în teren după fracturare; c-e - probe prelevate din teren; c-d - fracturi; e - vedere de sus a rocii; f - structura stromatolitelor observată în secțiune transversală; săgeata indică biofilmul cianobacterian acoperit de CaCO_3 . Cercurile de culoare roșie indică zonele din care a fost prelevat material pentru izolarea ADN.

Observațiile de microscopie optică a secțiunilor fine indică existența mai multor straturi paralele, cu o grosime ce variază de la câțiva μm până la sute de μm , în toate cele 3 eșantioane analizate (fig. 8 și 9).

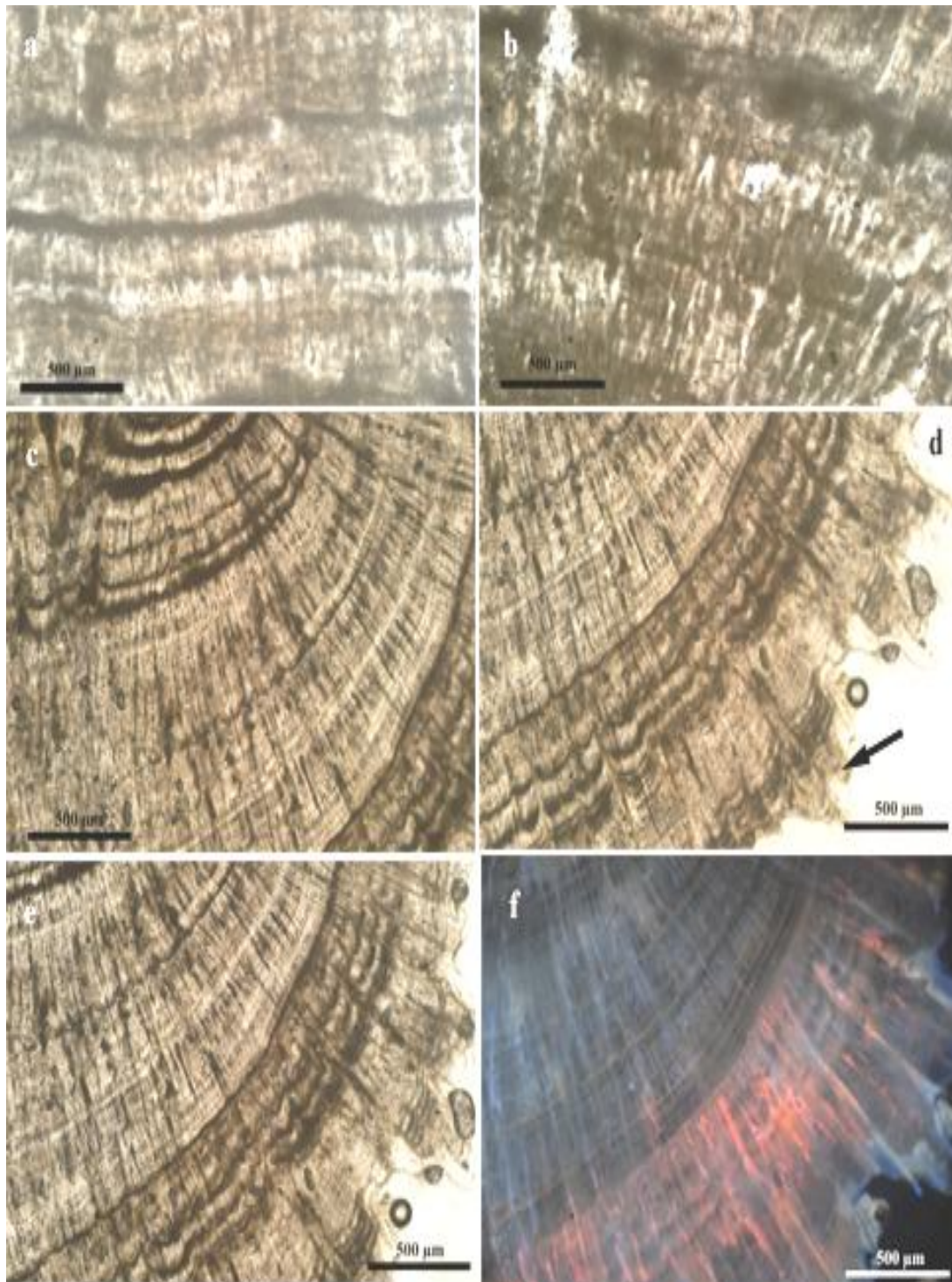


Fig. 8. Investigarea prin microscopie optică a secțiunilor obținute din eșantioanele stromatolitice S1 (a-b) și S3 (c-f). Se poate observa o compactare a straturilor spre interiorul stromatolitului și dezvoltarea acestuia în stratul superficial la nivelul centrilor de nucleație (precum cel indicat prin săgeată în fig. d). Microscopia optică de fluorescență (f) indică urme ale unor pigmenți clorofilieni, aparținând cel mai probabil unor cianobacterii.

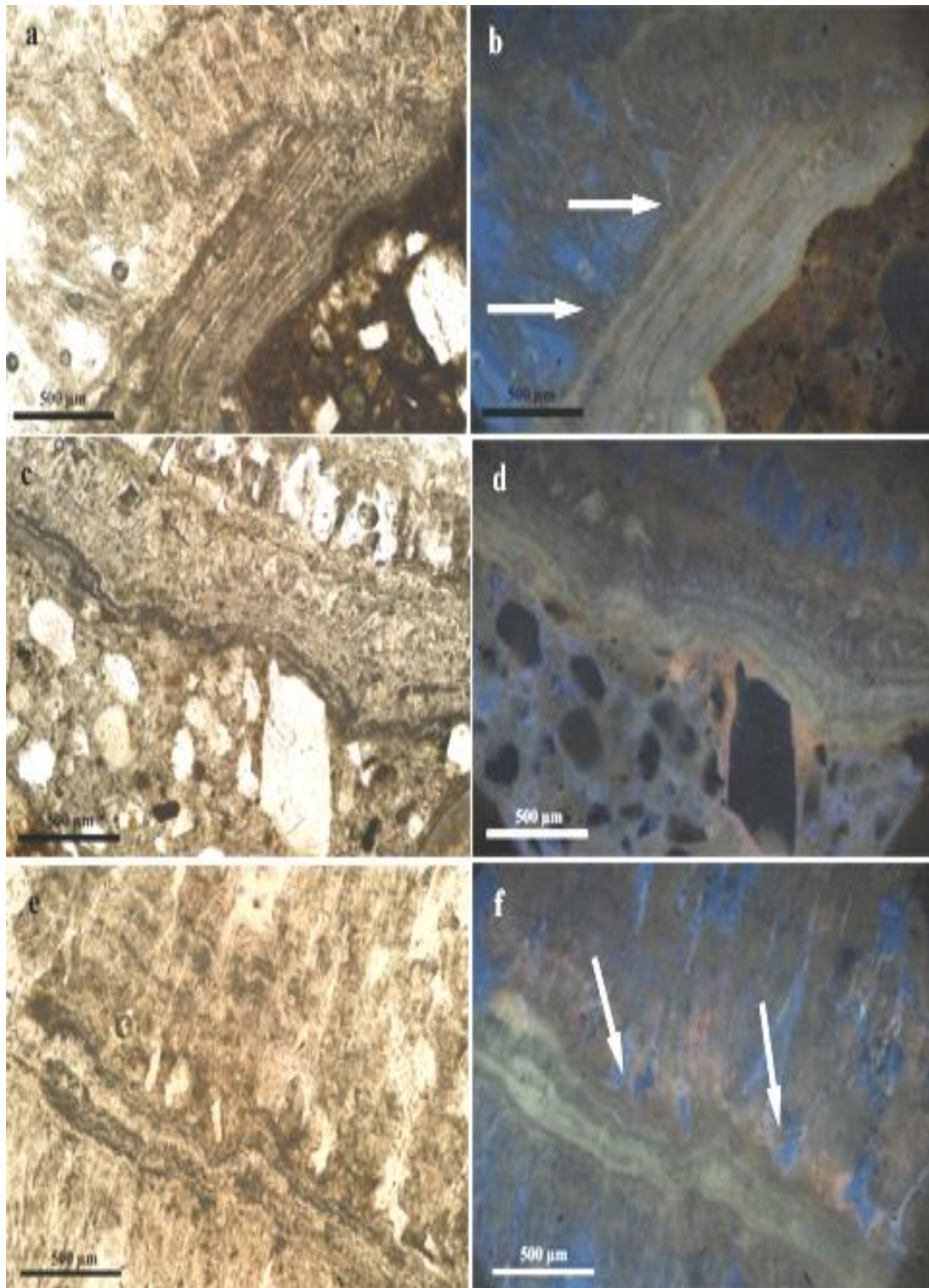


Fig. 9. Investigarea prin microscopie optică a secțiunilor obținute din eșantionul stromatolitic S2. Se poate observa o compactare a straturilor spre interiorul stromatolitului și dezvoltarea acestuia în stratul superficial la nivelul centrilor de nucleație (indicați prin săgeți). Microscopia optică de fluorescență (f) indică urme ale unor pigmenți clorofilieni, aparținând cel mai probabil unor cianobacterii.

Orientarea biofilmului bacterian este în majoritatea cazurilor paralelă cu cristalele de CaCO_3 , uneori formând un adevărat manșon în jurul acestora (fig. 12-14). Filamentele cianobacteriene au o grosime de aproximativ $2,5 \mu\text{m}$ și o lungime de câțiva zeci de μm (fig. 12g). În unele cazuri, acestea se întrepătrund, formând o rețea fibroasă (fig. 12h).

Pe lângă cianobacterii, au mai fost observate și alte bacterii, unele filamentoase (cu un diametru sub $1 \mu\text{m}$) (fig. 12f-g; fig. 14g-h) sau bacilare (fig. 12h; fig. 14h).

Pe baza analizelor morfologice putem afirma cu certitudine că microbialitele descoperite la Ciocaia fac parte din categoria stromatolitelor moderne ("stromatolite vii"), astfel de formațiuni existând în foarte puține locuri pe Glob. Acestea reprezintă o descoperire majoră, ele fiind un obiect de studiu foarte important pentru investigarea procesului de organomineralizare și pentru studiile de evoluție a vieții pe planeta noastră.

Deși cele 5 comunități cianobacteriene investigate sunt similare din punct de vedere al biodiversității cianobacteriilor, doar la Ciocaia a fost observat un fenomen de organomineralizare. Așadar, putem spune că, alături de activitatea cianobacteriilor, un rol foarte important în procesul de organomineralizare este deținut de factorii abiotici, în cazul de față concentrația ionilor HCO_3^- (7 g/l) și Ca^{2+} (55 mg/l).

Stromatolitele de la Ciocaia prezintă o formă laminară, fiind formate prin depunere de CaCO_3 preponderent sub forma grupelor calcit și aragonit.

A fost observată o scădere drastică a taxonilor cianobacterieni în stromatolite. Din cei 5 taxoni cianobacterieni din comunitatea microbială incipientă, lipsită de o mineralizare evidentă, doar unul singur, aparținând genului *Leptolyngbya*, a putut fi identificat și în stromatolite.

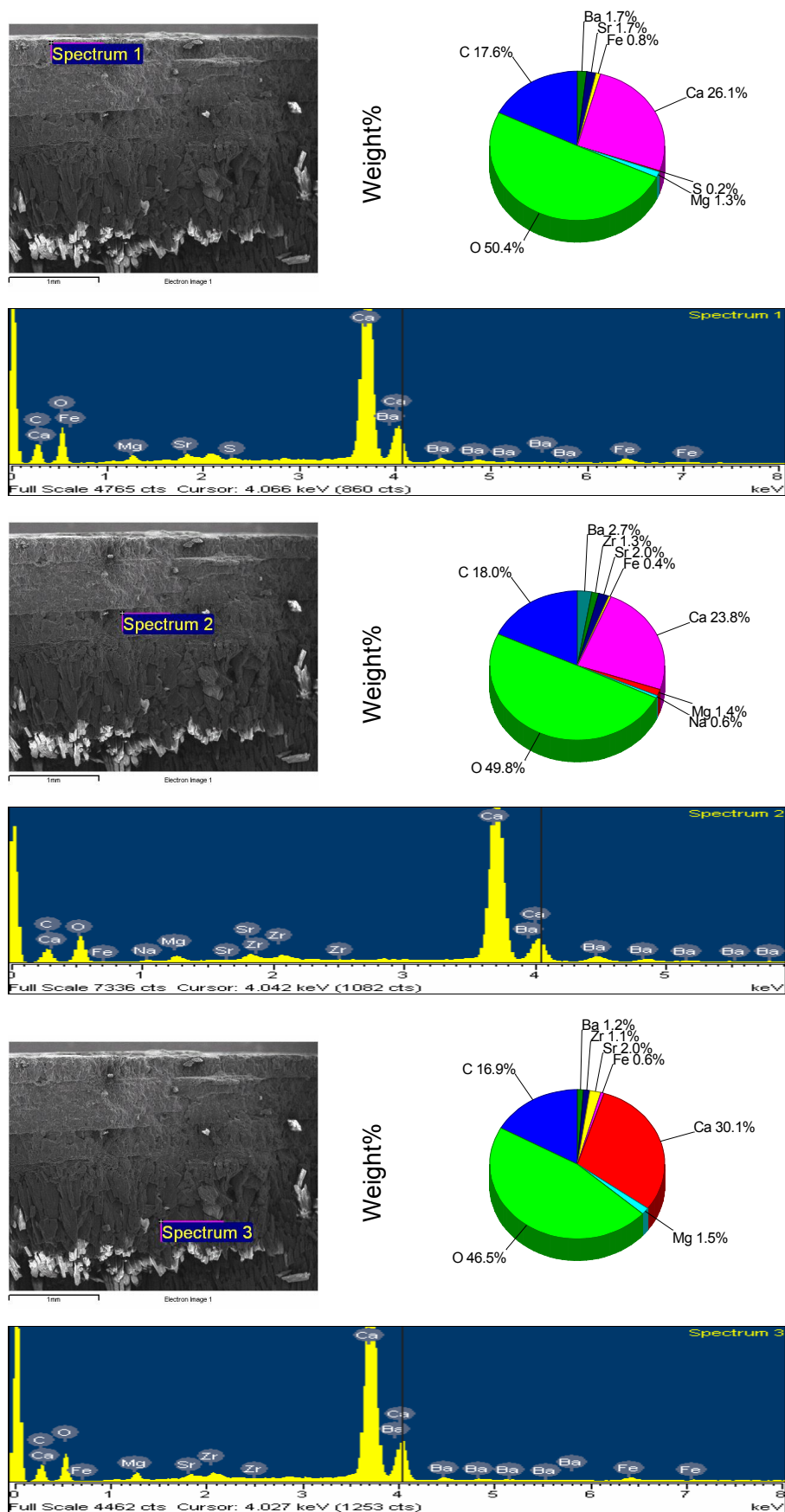


Fig. 10. Analiza elementală (EDX) a eșantionului S1 asociat izvorului geotermal de la Ciocia.

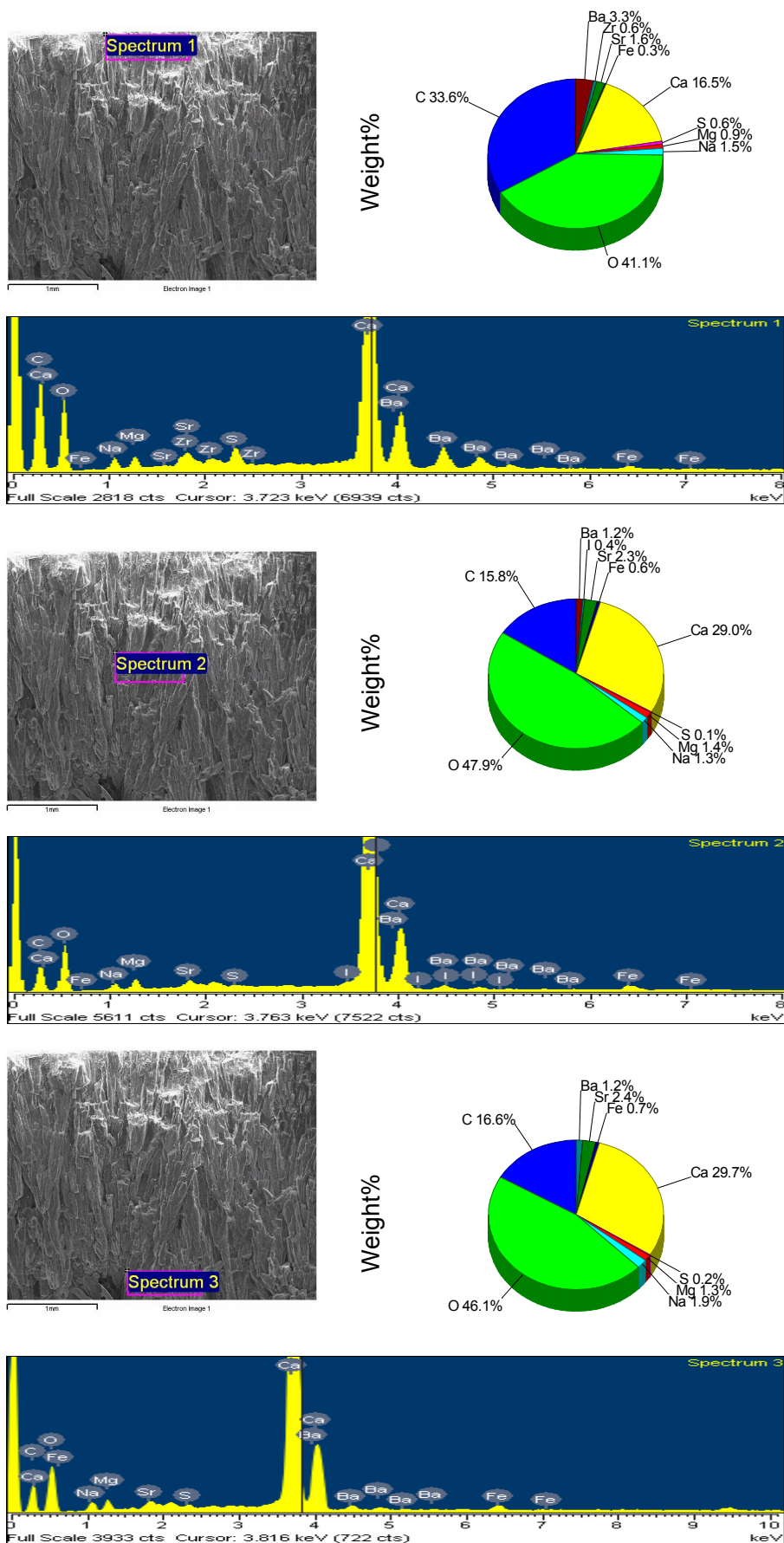


Fig. 11. Analiza elementală (EDX) a eșantionului S2 asociat izvorului geotermal de la Ciocaia.

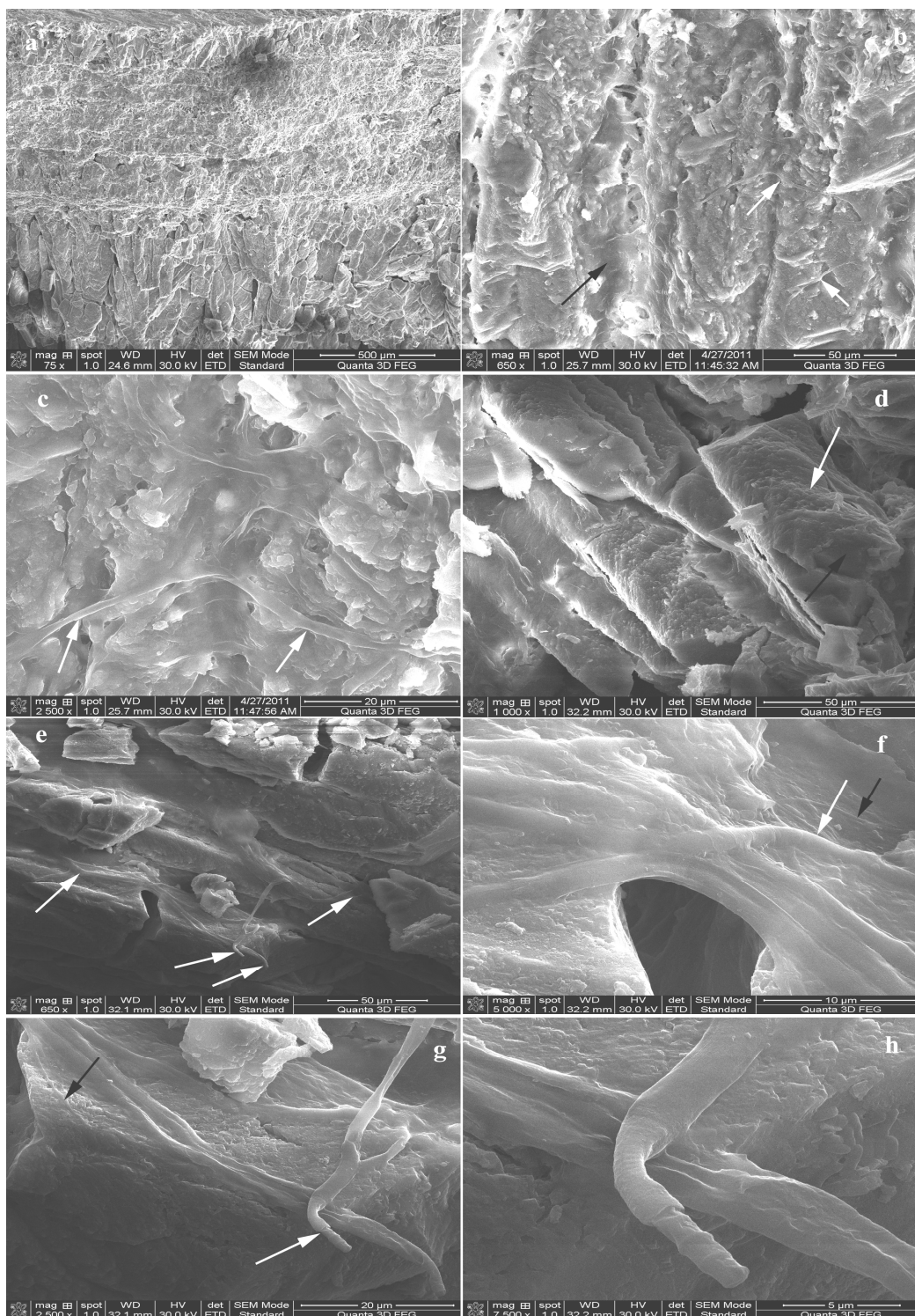


Fig. 12. Structura eșantionului S1 asociat forajului de la Ciocaia observată în microscopie electronică scanning (SEM). **a** - fractură transversală prezentând structura în profunzime, **b-d** - biofilm/filamente (săgeți albe) fosilizate în jurul cristalelor de CaCO_3 (săgeți negre); **e-f** - filamente cianobacteriene/bacteriene înglobate în matrița de substanțe extrapolimere (EPS) și fosilizate; g-h - detalii ale unui filament cianobacterian înconjurat de un manșon de EPS.

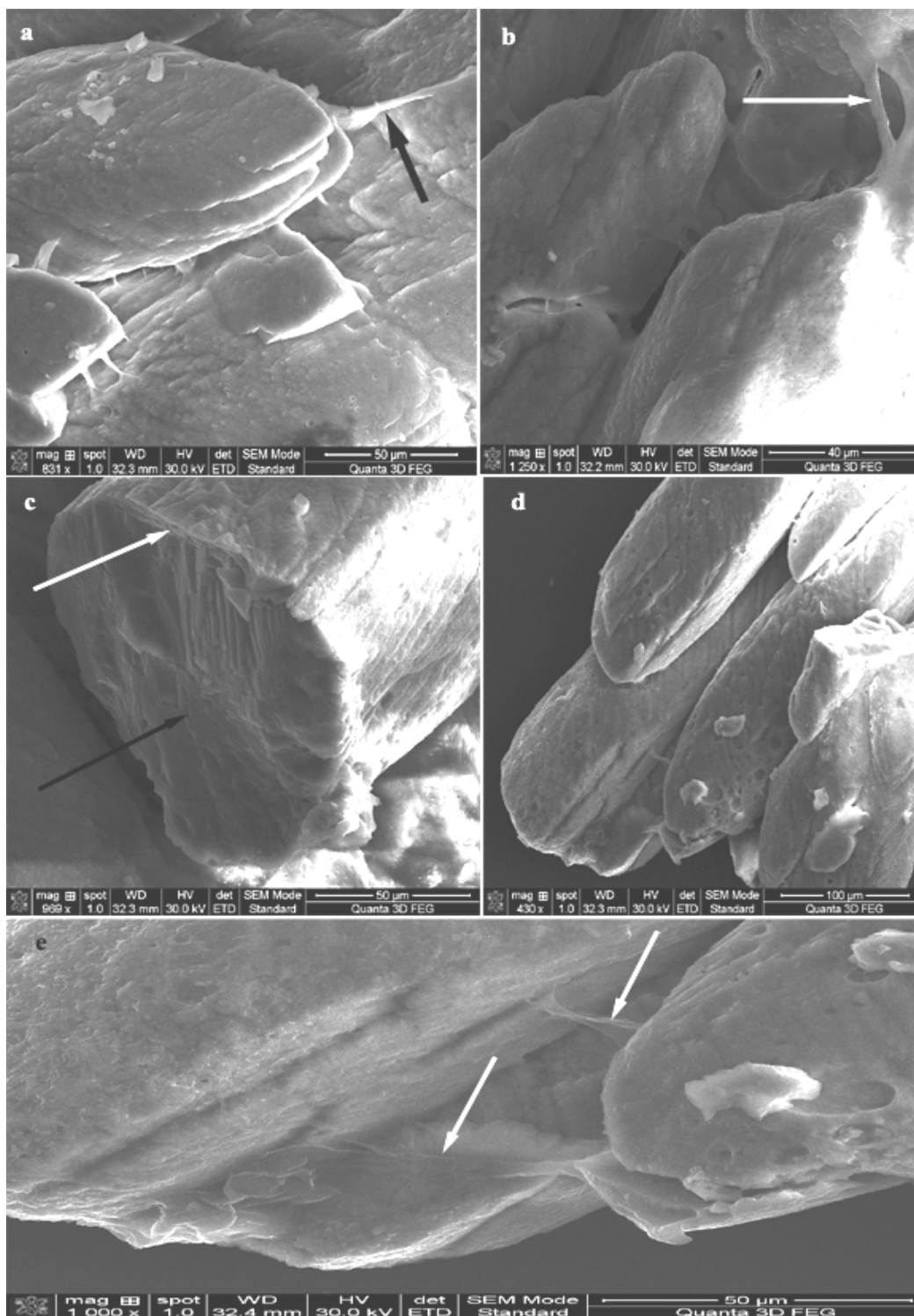


Fig. 13. Structura eşantionului S2 asociat forajului de la Ciocaia observată în microscopie electronică scanning (SEM). **a** - săgeata indică un biofilm bogat în EPS și fosilizat, **b-c** - biofilm/filamente (săgeți albe) fosilizate în jurul cristalelor de CaCO_3 (săgeți negre); **e** - săgețile indică biofilmuri microbiene fosilizate.

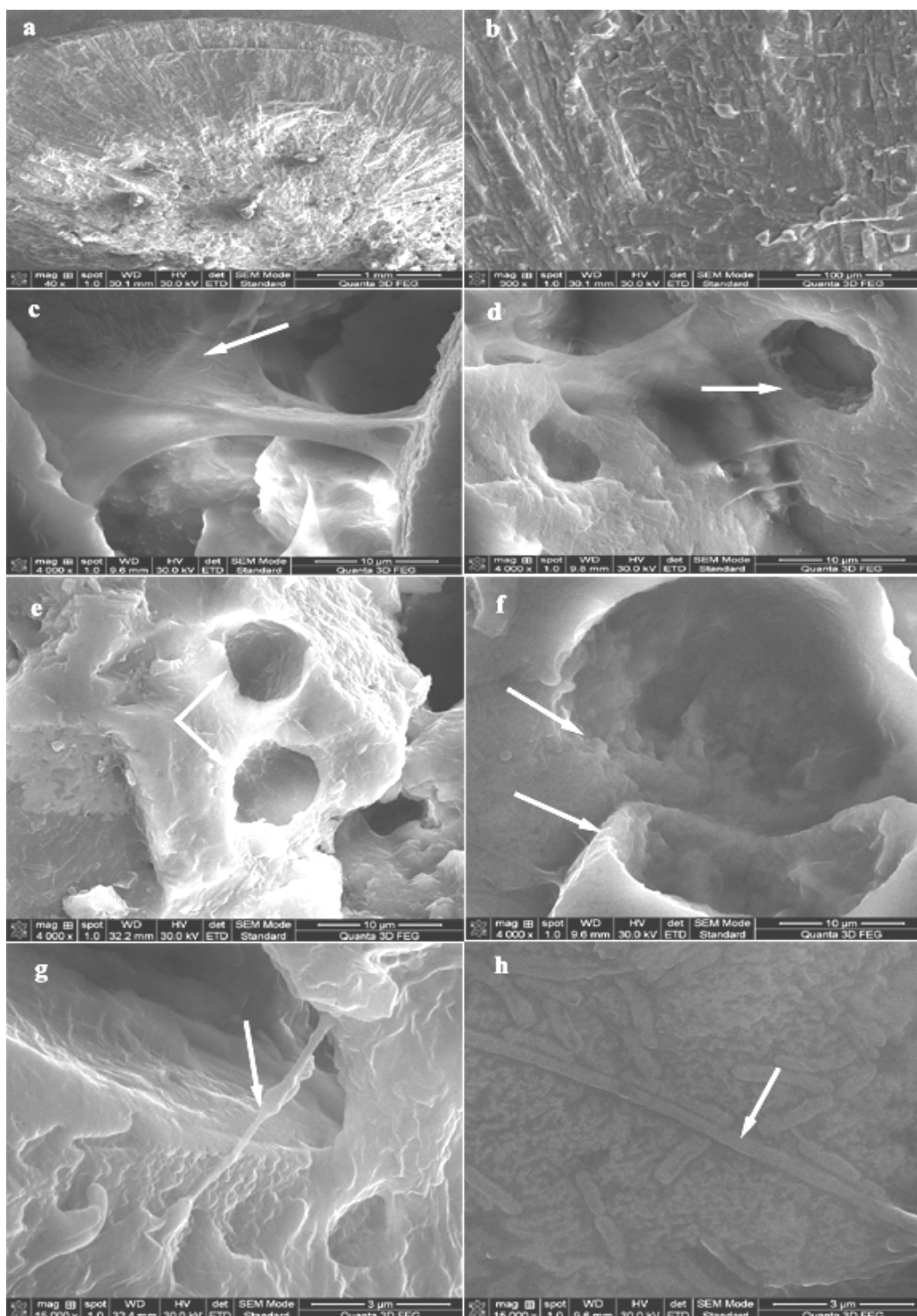


Fig. 14. Structura eşantionului S3 asociat forajului de la Ciocaia observată în microscopie electronică scanning (SEM). **a-b** - fractură transversală prezentând structura în profunzime, **c** - biofilm microbial bogat în EPS, fosilizat; se pot observa numeroși bacili atașați EPS; **d-f** - manșoane de EPS fosilizate, dezvoltate cel mai probabil în jurul unor cristale de CaCO_3 (desprinse în momentul pregătirii probelor); **g-h** - filamente bacteriene.

X. Limite și perspective

Studiul de față poate fi continuat pe baza următoarelor recomandări:

1) Studiarea mai multor izvoare din Câmpia de Vest a României pentru o mai bună înțelegere a diversității microbiene în aceste biotopuri în timp și spațiu.

2) Utilizarea și a altor tehnici moleculare pentru o mai bună rezoluție; acestea includ diferite metode de construire a bibliotecilor de clone, folosirea unor amorse cu specificitate de grup, precum și studii *in situ* prin FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) sau alte metode de acest gen.

3) Efectuarea unor studii de fiziologie pe baza unor culturi din diferite comunități, fiind de observat efectul radiațiilor UV, a diferiților compuși chimici și a altor factori fizici sau chimici asupra creșterii. Efectul răspunsului fiziologic al cianobacteriilor la acești factori de stres poate fi observat prin diferite studii de proteomică sau transcriptomică.

XI. Concluzii

Ideea generală a acestei teze de doctorat a constituit-o abordarea prin mijloace moleculare a biodiversității. Ținta studiului a fost reprezentată de comunitățile de cianobacterii termofile asociate unor izvoare geotermale (termominerale), rezultate în urma unor foraje în Câmpia de Vest a României.

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu permit formularea următoarelor concluzii finale:

a. Microscopia electronică de baleiaj (SEM) a evidențiat o structură stratificată a biofilmului, cu un strat superficial compact, format exclusiv din cianobacterii filamentoase, urmat – în profunzime – de un strat lax median și un ultim strat cu numeroase bacterii asociate filamentelor cianobacteriene.

b. Biodiversitatea cianobacteriilor asociate izvoarelor termominerale este relativ scăzută și diferită în cele 5 comunități investigate, cu un maxim de taxoni cianobacterieni în comunitatea de la Marghita (8 taxoni); utilizarea mai multor metode moleculare în paralel a dus la identificarea mai multor taxoni cianobacterieni în comunitățile investigate, comparativ cu folosirea unei tehnici singulare.

c. Secvențarea regiunilor țintă din gena ARNr 16S au evidențiat că majoritatea taxonilor din comunitățile cianobacteriene studiate aparțin ordinului Oscillatoriales, cu următoarele genuri evidențiate: *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Leptolyngbya*, *Plectonema*, *Geitlerinema* și *Microcoleus*;

d. Microbialitele descoperite la Ciocaia (jud. Bihor) pot fi încadrate în categoria formațiunilor stromatolitice recente, cu rol important în investigarea procesului de organomineralizare și în studiile de evoluție a vieții pe planeta noastră.

e. Biodiversitatea cianobacteriilor în microbialite este foarte scăzută, fiind identificat doar genul *Leptolyngbya*.

Bibliografie selectivă

- Amann, R., Fuchs, B. M. (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology*, **6**:339-348.
- Avaniss-Aghajani, E., Jones, K., Holtzman, A., Aronson, T., Glover, N., Boian, M., Froman, S., Brunk, C.F. (1996) Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**:98–102.
- Colwell, R.R., Seidler, R.J., Kaper, J., Joseph, S.W., Garges, S., Lockman, H., Maneval, D., Bradford, H., Roberts, N., Remmers, E., Huq, I., Huq, A. (1981) Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O1 in Maryland and Lona estuaries. *Applied and Environmental Microbiology*, **4**:555-558.
- Coman, C., Bica, A., Drugă, B., Barbu-Tudoran, L., Dragoș, N. (2011) Methodological constraints in the molecular biodiversity study of a thermomineral spring cyanobacterial mat: a case study. *Antonie van Leeuwenhoek*, **92**:271-281.
- Fisher, M.M., Triplett, E.W. (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:4630-4636.
- Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbauer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludvigsen, A., Bachleitner, M., Fischer, U., Schleifer, K.H. (1993) Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATPSynthase β -Subunit genes. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**:285–305.
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (2005) The molecular phylogeny of bacteria based on conserved genes. In: Sapp, J. (Ed.) *Microbial phylogeny and evolution: concepts and controversies*. Oxford University Press, pp 70-98.
- Muralitharan, G., Thajuddin, N. (2011) Rapid differentiation of phenotypically and genotypically similar *Synechococcus elongatus* strains by PCR fingerprinting. *Biologia*, **66**: 238 - 243.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase

- chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**:695-700.
- Mwirichia, R., Muigai, A.W., Tindall, B., Boga, H.I., Stackebrandt, E. (2010) Isolation and characterisation of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya. *Extremophiles*, **14**:339-348.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **86**:2766–2770.
- Rossello'-Mora, R., Amann, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**:39–67.
- Rainey, F.A., Ward, N., Sly, L.I., Stackebrandt, E. (1994) Dependence on the taxon composition of clone libraries for PCR amplified, naturally occurring 16S rDNA on the primer pair and the cloning system used. *Experientia*, **50**:796–797.
- Schopf, J.W. (1992) Paleobiology of the Archaean. In: Schopf, J.W. and Klein, C. (eds.) *The Proterozoic Biosphere: A Multidisciplinary Study*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 25–39.
- Schopf, J.W. (2002) The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. In: Whitton, B.A. and Potts, M. (Eds.) *The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, New York, pp 13-35.
- Wacey, D. (2009) *Early Life on Earth; A Practical Guide*. Springer Science Business Media.
- Walsh, M.M. (1992) Microfossils and possible microfossils from the early Archean Onverwacht Group, Barberton Mountain Land, South Africa. *Precambrian Research*, **54**:271–293.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, **51**:221–271.