



ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ:

4.3. Биологически науки (Генетика)

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за придобиване на ОНС „Доктор“

на тема

**„Метагеномен и молекулярно-генетичен
анализ на микробни съобщества около
Българската полярна база на о-в
Ливингстън“**

Докторант:

Веселин Валериев Дойчинов

Научен ръководител:

доц. д-р Светослав Георгиев Димов

Януари, 2024

Дисертационният труд съдържа 138 страници и е онагледен с 14 таблици и 17 фигури. Библиографската справка съдържа 253 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Катедрения съвет на Катедра „Генетика“, Биологически ф-т на СУ „Св. Климент Охридски“, проведено в разширен състав със Заповед № РД-38-69 / 5.2.2024 г. на г-н Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ на 8 февруари 2024 г.

Експерименталната работа и биоинформатичните анализи са проведени на Българската антарктическа база „Св. Климент Охридски“ на о-в Ливингстън, Антарктика, както и в Катедра „Генетика“, Биологически ф-т на СУ „Св. Климент Охридски“.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на от часа в Заседателната зала на Биологически ф-т на СУ „Св. Климент Охридски“ пред Научно жури, утвърдено със Заповед № на г-н Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ в състав:

Редовни членове:

1. проф. д-р Петя Койчева Христова
2. доц. д-р Яна Йорданова Евстатиева
3. проф. дбн. Искра Витанова Иванова
4. проф. дбн. Севдалин Георгиев Ангелов
5. акад. Драга Иванова Тончева

Резервни членове

проф. д-р Таня Василева Стратева, дм

Административен секретар:

г-жа Екатерина Афенлиева

Материалите по защитата са на разположение на Интернет-страницата на СУ „Св. Климент Охридски“.

БИХ ИСКАЛ ДА ИЗРАЗЯ СВОЯТА ДЪЛБОКА БЛАГОДАРНОСТ КЪМ:

- ✓ *На Национални център за полярни изследвания, който финансира част от изследванията в настоящия труд в рамките на Проект № 70-25-72 от 03.08.2021 г.*
- ✓ *На Фонд „Научни изследвания“ на СУ „Св. Климент Охридски“ който финансира част от изследванията в настоящия труд в рамките на Проект № 80-10-8 от 10.05.2022 г.*
- ✓ *Членовете на 30-та и 31-та Български антарктически експедиции, без чиято помощ научните изследвания в настоящия дисертационен труд не биха били възможни;*
- ✓ *Колегите от Катедра „Генетика“ на Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ за тяхната подкрепа и съдействие по време на докторантурата ми;*
- ✓ *Гл. ас. д-р Ралица Илиева за помощта при получаването на чисти култури от антарктическите изолати на микроорганизми;*

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ.....	6
Съкращения на кирилица.....	6
Съкращения на латиница	6
ВЪВЕДЕНИЕ	8
1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ.....	11
2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	13
3.РЕЗУЛТАТИ	14
3.1. Резултати от метагеномния анализ на микробните съобщества в пробите	14
3.1.1. Оценка на качеството на секвенирането и брой получени ASVs	14
3.1.2 Таксономична анотация	15
3.1.3 Анализи на алфа разнообразието	20
3.1.4. Анализ на бета разнообразието	22
3.2. Анализ на антарктическите изолати	Error! Bookmark not defined.
3.2.1. Частични растежни характеристики на антарктическите изолати	Error!
Bookmark not defined.	
3.2.2. Резултати от целогеномно секвениране на антарктически бактериални	
изолати	Error! Bookmark not defined.
3.3. Анализ на взаимодействията между отделните домейни микроорганизми.....	33
4. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ.....	38
4.1. Обща анализ на данните за алфа- и бета- разнообразията.....	38
4.2. Микробиологичен състав на пробите от покривки от потопени скали	39
4.3. Микробиологичен състав на покривка от повърхността на камък в областта на научната база	41
4.4. Микробиологичен състав в седимента от литоралната зона на езерото Тодорина Буза	41

4.5. Микробиологичен състав на почвената проба под растение близо до безименното езеро.....	42
4.6. Микробиологичен състав на проба от покривка от повърхността на макроводорасло	44
4.7. Микробиологичен състав на литотелми от Хана Пойнт	44
4.8. Микробиологичен състав на соленоводните проби	45
4.9. Микробиологичен състав на сладководните проби	46
4.10. Изследване на антагонистични отношения между отделните домейни микроорганизми.....	47
5. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ.....	53
5.1. Изводи	53
5.2. Приноси	55
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	56
НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	58
СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНАТА ЛИТЕРАТУРА.....	59

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на кирилица

бд	Базови двойки
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
МПА	мезопектонен агар
ПВР	полимеразна верижна реакция
РНК	рибонуклеинова киселина
рРНК	рибозомна дезоксирибонуклеинова киселина

Съкращения на латиница

ANI	average nucleotide identity
ASV	amplicon sequencing variant
BLAST	basic local alignment search tool
bp	base pair
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
EMP	earth microbiome project
ESV	exact sequence variant
ITS	internal transcribed spacer
MPS	massively parallel sequencing
NCBI	national center for biotechnology information
NGS	next generation sequencing
OTU	operational taxonomic unit
PCoA	principal coordinate analysis

PCR	polymerase chain reaction
PBS	primer binding site
R2A	peasoner's 2a agar
SNP	single nucleotide polymorphism
WGS	whole genome sequencing

ВЪВЕДЕНИЕ

В нашето ежедневие сме заобиколени от безкрайно разнообразие от микроорганизми, включително бактерии, еукариоти и археи. Тези микроорганизми имат също толкова разнообразни местообитания по целия свят. Голям брой от тях засягат важни аспекти от човешкия живот и намират приложение в области като производствените биотехнологии (напр. използването на *Saccharomyces cerevisiae* за производството на пиво), фармацевтичните биотехнологии (напр. производството на инсулин от модифицирани *Escherichia coli*), екобиотехнологиите (пречистване на замърсени екосистеми и производство на тор от много различни микроорганизми), козметичната индустрия и множество други. От друга страна, много сходни на тези микроорганизми са патогени, които предизвикват широка гама от заболявания при хората. Но безспорно най-важната роля на микроорганизмите е тази, която не засяга човечеството пряко – микроорганизмите са ключова част от всяка екосистема на планетата. Това се дължи на тяхната способност да рециклират най-важните елементи за всяка жива система – въглерод, кислород и азот. За да можем да оценим влиянието на антропогенната дейност върху микробиологичния свят, ние трябва да знаем от какво се състои този свят. Тези факти изправят едно значимо предизвикателство пред човечеството – как да характеризираме и идентифицираме микроорганизмите около нас. В отговор на този въпрос ние търсим нови начини да използваме тези организми, да предотвратим или намалим негативните ефекти, които някои от тях имат върху нас и откриваме какви мерки трябва да предприемем, за да запазим тяхното разнообразие, на което разчитат всички по-висши форми на живот.

Особен интерес представляват микроорганизмите, които се развиват в Антарктида – най-студеният континент в света със средни годишни температури вариращи от $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ на Антарктическият полуостров до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ към вътрешното плато и който е подложен на чести цикли на замръзване и размразяване (Campbell and Claridge 1987). Валежите, влажността на въздуха и концентрацията на сол в басейните от течна или замразена вода са ниски и зависят от близостта до Южния океан около континента (Campbell and Claridge 1987). 99,6% от сушата е покрита със сняг или лед, въпреки че се наблюдават сезонни вариации в това съотношение (Convey 2017). Единствените части от континента, които не са редовно

покрити със сняг, са редки крайбрежни зони, нунатаки¹ и планински върхове. Липсата на органични хранителни вещества и течна вода, особено във вътрешното плато, е основният ограничаващ фактор за живота. Освен това високата слънчева радиация представлява пречка за развитието на микробния живот на континента (Wynn-Williams 1990). Това обяснява защо биоразнообразието е най-изразено в крайбрежните региони, особено на Антарктическият полуостров, който притежава много по-гостоприемна среда за живот (Campbell and Claridge 1987, Convey 2017). Като цяло, провеждането на микробни анализи на континента е изправено пред набор от логистични и методологични затруднения.

Минали представи за Антарктика я описват като стерилна екосистема, с липсващо или минимално микробно разнообразие, но проучванията, проведени още преди настъпване на метагеномните изследвания, доказват обратното. Въпреки че континентът често се възприема като една изолирана и недокосната от човека екосистема, антропогенният ефект върху биоразнообразието е факт, който е неизбежен при извършването на антарктически проучвания и експедиции. Ние трябва да сме наясно с това точно как антропогенният фактор влияе на микроорганизмовия профил на континента, за да можем да предприемем адекватни мерки, за да намалим неговия ефект и да запазим биоразнообразието. Това е възможно само ако имаме представа за микроорганизмите, които се срещат на континента.

До средата на 80-те години микробиологичната таксономия е разчитала предимно на биохимични, физиологични и морфологични критерии за идентифициране на микроорганизмите (Franzmann 1996). Оценката за еволюционното значение на тези свойства е било до голяма степен произволно и се е основавало единствено на това, което микробиолозите са били способни да наблюдават по това време. Развитието на секвенирането, на обратната транскрипция (Lane, Pace et al. 1985) и полимеразната верижна реакция (ПВР)(PCR) (Edwards, Rogall et al. 1989) създадоха възможност за използване на ДНК последователности от микроорганизми за установяване на по-надеждна филогенетична връзка между тях. Тази промяна на парадигмата към молекулярни техники наложи преразглеждане на класифицираните по това време таксони и установи техниките за секвениране на ДНК като стандарт за бъдещата идентификация на видове и филогенетично групиране. Днес способността за анализиране на генетична информация и

¹ Нунатаките са скалист елемент от склон, планина или връх, който не е покрит от сняг.

манипулиране на ДНК молекулите са се превърнали в доказано ценни инструменти за изследователите. Днес множество разработки и иновации в областта на секвенирането правят лесно достъпно едновременното идентифициране на голям брой микроорганизми в директни полеви проби, които съдържат ДНК с различен произход. Първата разработка на тези методи е „масовото паралелно секвениране“ (MPS), първоначално наричано „секвениране от ново поколение“ (NGS), което разчита на едновременното секвениране на множество къси ДНК фрагменти. Терминът „метагеном“ описва именно генетичната информация не на един организъм, а на всички организми в една проба. Едно от най-големите предимства на директното метагеномно секвениране, е че то премахва нуждата от култивиране и изолиране на чисти колонии от един микроорганизъм, което отнема време и често не е възможно за много от микроорганизмите. След разработването на геномните методи за класификация на микроорганизмите, концепцията за много от родовете, които са били докладвани от антарктически местообитания, са се променили (Franzmann 1996).

В контекста на тези изследвания се формира и научния интерес към темата на настоящия дисертационен труд – да се идентифицират микроорганизмите около Българската антарктическа база „Св. Климент Охридски“ на остров Ливингстън, част от Южните Шетландски острови и Морския Антарктически регион. Това е първото генетично проучване на микроорганизмите около базата „Св. Климент Охридски“ и бе постигнато чрез метагеномни и геномни методи за идентифициране с помощта на платформата за секвениране на компанията Illumina. Малък брой метагеномни анализи се извършват в България и проучвания от този тип са критично важни за развитието на генетиката като научната област в страната. В допълнение бяха изолирани и някои нови изолати бактерии с помощта на набор селективни хранителни среди, таксономично определени доколкото е възможно, а техните геноми - секвенирани.

1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

За осъществяването на настоящия дисертационен труд бяха поставени две основни цели:

I. Определяне на състава на микробиотите в различни местообитания и екологични ниши около Българската антарктическа база „Св. Климент Охридски“ на о-в Ливингстън;

II. Изолиране и таксономично определяне на нови изолати микроорганизми от различни местообитания и екологични ниши около Българската антарктическа база „Св. Климент Охридски“ на о-в Ливингстън, които в бъдеще да бъдат изследвани за потенциал за приложение в различни биотехнологични процеси.

За тяхното осъществяване бяха поставени следните експериментални задачи:

- 1. Събиране на проби за изолиране на ДНК от различни местообитания и екологични ниши около Българската антарктическа база „Св. Климент Охридски“ на о-в Ливингстън;*
- 2. Изолиране на висококачествена ДНК за провеждане на метагеномни анализи;*
- 3. Провеждане на ампликон-базирани метагеномни секвенирания с праймери за еубактерии, гъби и архебактерии на платформата Illumina;*
- 4. Биоинформатичен анализ на секвенционните данни;*
- 5. Анализ на алфа-разнообразието на микробиомите в различните местообитания и екологични ниши;*
- 6. Анализ на бета-разнообразието на микробиомите около Българската антарктическа база „Св. Климент Охридски“;*

7. *Функционален анализ на микробните съобщества;*
8. *Депозиране на резултатите от проведеното метагеномно секвениране в базата данни на NCBI;*
9. *Посяване на материал от различни местообитания и екологични ниши на различни среди за култивиране с цел изолиране на нови щамове микроорганизми и получаване на чисти култури от тях;*
10. *Видово определяне на новоизолираните щамове микроорганизми с помощта на секвениране на целите гени, кодиращи 16S рРНК;*
11. *Целогеномно секвениране на геномите на новополучените изолати антарктически микроорганизми с помощта на платформата Illumina;*
12. *Асемблиране на геномите на новоизолираните щамове микроорганизми;*
13. *Анализ на секвенираните геноми на новоизолираните щамове микроорганизми;*
14. *Депозиране на секвенираните геноми в базата данни на NCBI.*

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В процеса на работа по дисертационния труд бяха използвани следните групи методи и техники:

1. Класически микробиологични техники

2 Молекулярно-генетични методи, включващи:

Изолиране на тотална ДНК чрез кит с цел последващ метагеномен анализи

Изолиране на ДНК от бактериални изолати чрез кит с цел целогеномно секвениране

Определяне на концентрацията на изолираната ДНК чрез флуориметър

Качествено и количествено определяне на ДНК чрез електрофореза

3. Методи за размножаване на 16s рРНК чрез ПВР

Праймери за ПВР, използвани в настоящото изследване

ПВР размножаване на целите еубактериални гени, кодиращи 16S рРНК с цел видово определяне на новоизолираните антарктически изолати

Намножаване на вариабилните райони на еубактерии, архебактерии и гъби с цел провеждане на ампликон-базирани метагеномни изследвания

4 Масово паралелно секвениране на ДНК чрез Illumina платформата

Целогеномно секвениране

Метагеномно ампликон-базирано секвениране

5 Биоинформатични методи

Обработка на данните, получени от ампликон-базираното метагеномно секвениране

Биоинформатична обработка на данни от целогеномно секвениране

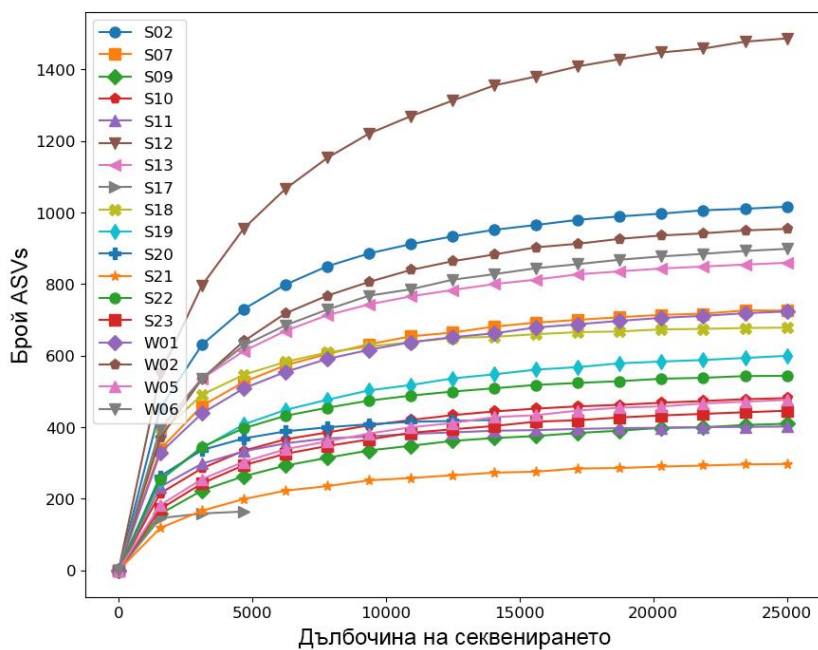
6. Статистически методи за изследване на антагонизма между отделните групи микроорганизми

3. РЕЗУЛТАТИ

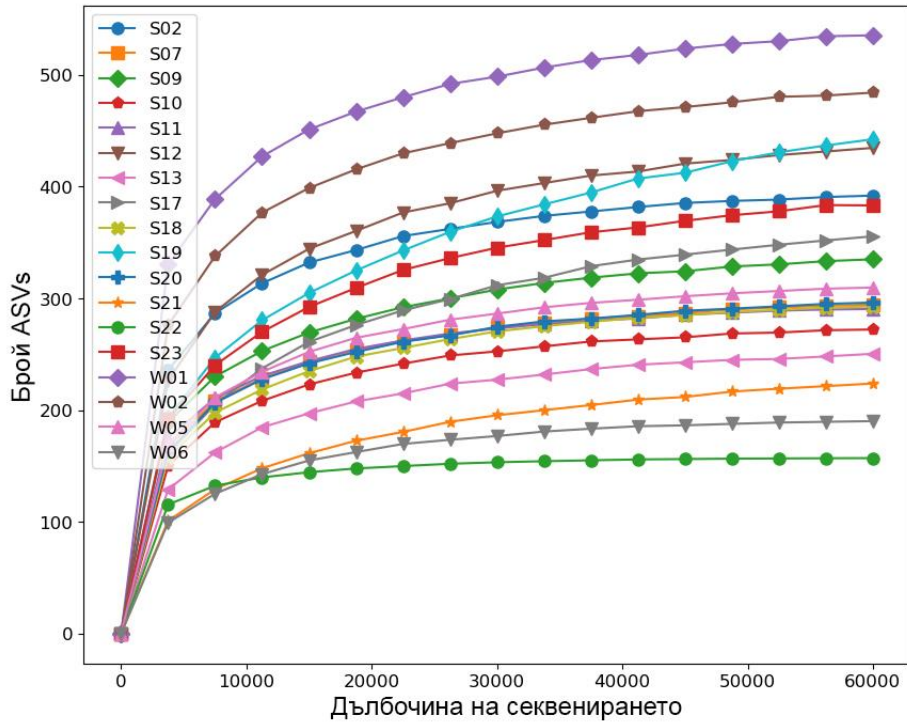
3.1. Резултати от метагеномния анализ на микробните съобщества в пробите

3.1.1. Оценка на качеството на секвенирането и брой получени ASVs

С помощта на праймери за бактериалните 16S бяха получени общо 5583 ASVs, като само 4 ASV бяха общи за всички проби. 2696 ASV бяха получени с помощта на гъбните праймери, като 5 от тях бяха общи за всички проби. По-голямата част от ASVs, получени с помощта на специфичните за археите праймери, бяха таксономично идентифицирани като бактерии. Rarefaction кривите на бактериите и гъбите са представени на Фигура 1 и Фигура 2. Те показват, че е постигната адекватна дълбочина на секвениране и за двете групи във всички проби. Стойностите за Q20 и Q30 преди филтриране и премахване на шума бяха съответно над 97% и 91% за всички проби.



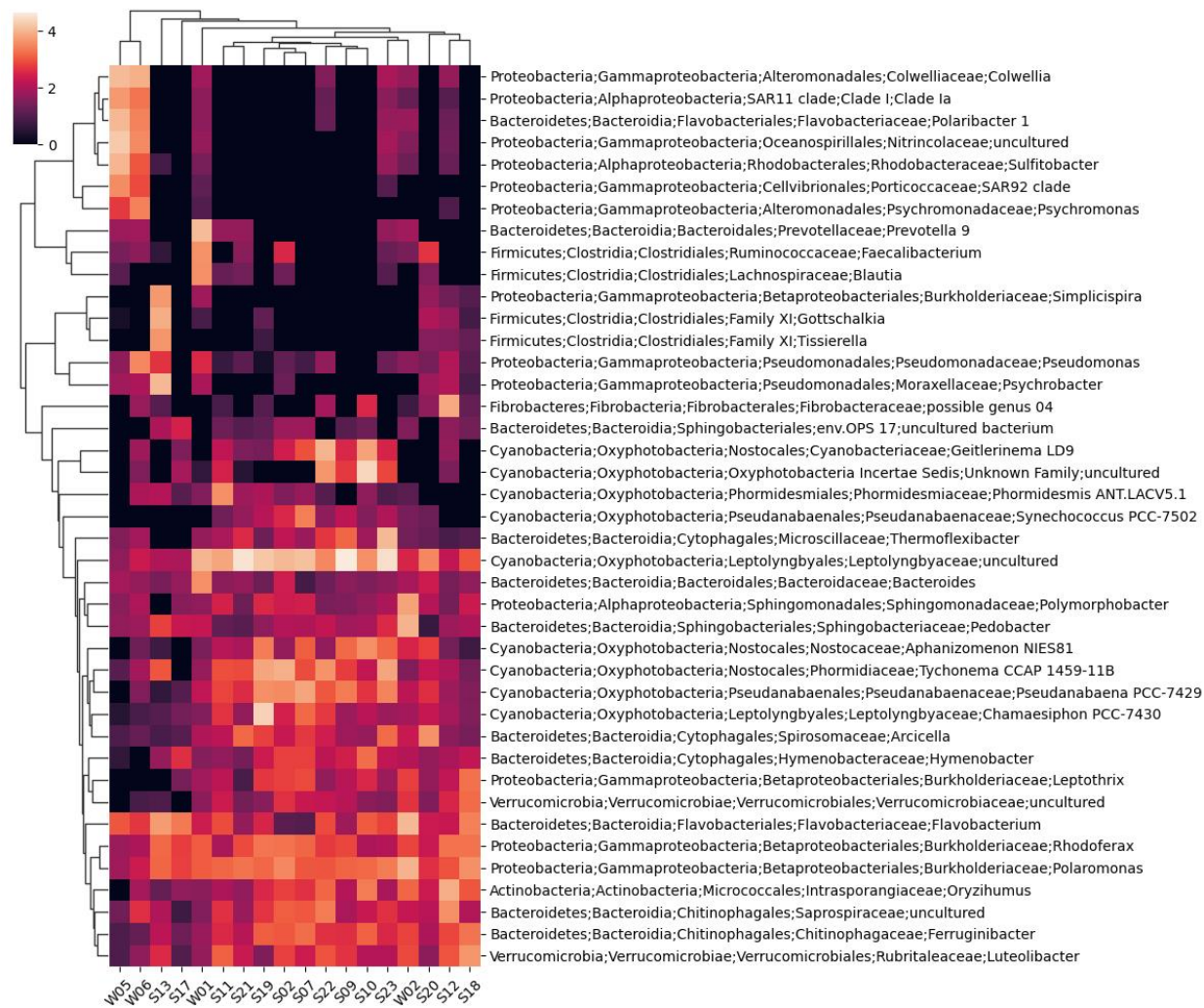
Фигура 1. Rarefaction крива за бактериите. Богатството (брой на бактериални ASV) на отделните проби, нанесено спрямо различни дълбочини на секвениране.



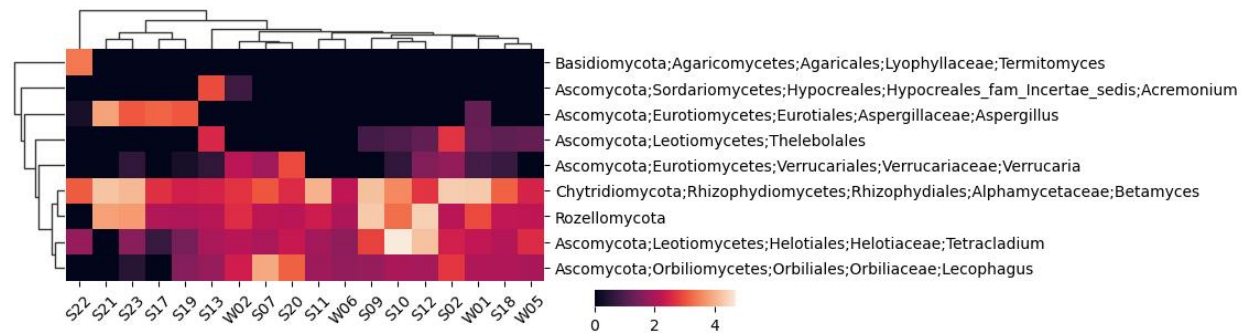
Фигура 2. Rarefaction крива за гъбите. Богатството (брой на бактериални ASV) на отделните проби, нанесено спрямо различни дълбочини на секвениране.

3.1.2 Таксономична анотация

Таксономичните групи, представляващи най-малко 4% от бактериалните прочити във всяка проба, са показани с помощта на клъстерна топлинна карта на Фигура 3. Подобна топлинна карта е представена за гъбите на Фигура 4, но с праг от 1%. Равномерното разпределение и богатството на бактериалните и гъбните съобщества са представени в кривите за ранг на изобилие съответно на Фигура 5 и Фигура 6. Фигура 7 показва относителното изобилие на доминиращите бактериални класове за всяка проба и типа, към който принадлежат.



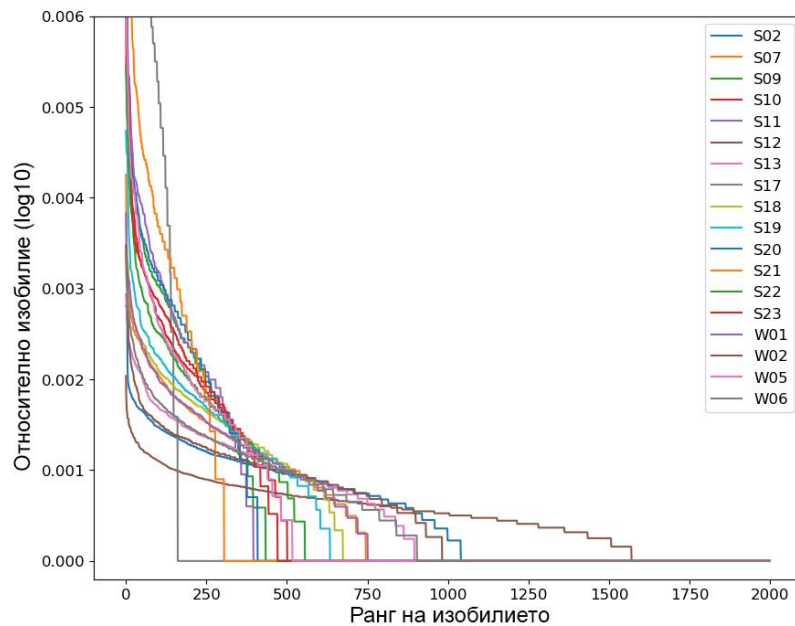
Фигура 3. Клъстерна топлинна карта, конструирана с помощта на Брей-Къртис разстояния между бактериалните таксони, които представляват поне 4% от последователностите във всяка от пробите.



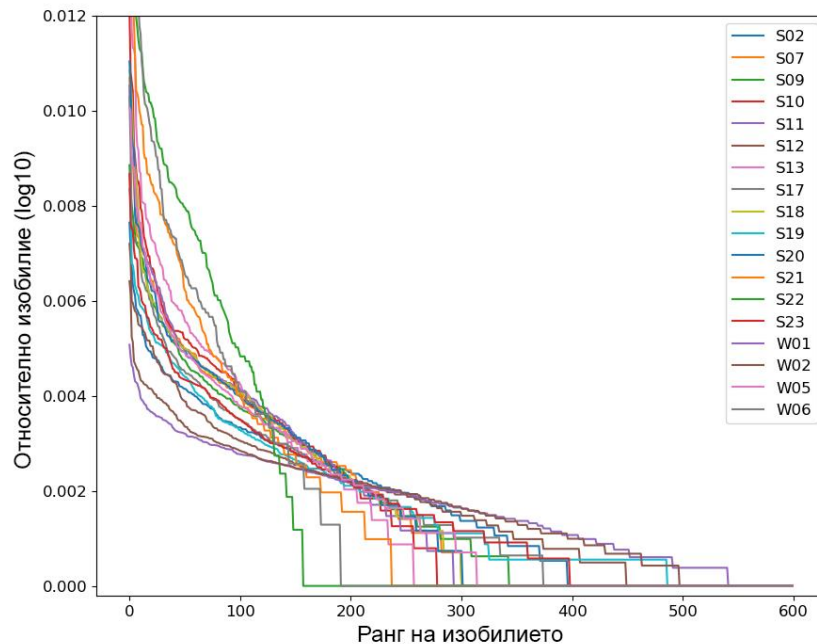
Фигура 4. Клъстерна топлинна карта, конструирана с помощта на Брей-Къртис разстояния между гъбните таксони, които представляват поне 1% от последователностите във всяка от пробите.

Бяха идентифицирани общо 1894 уникални бактериални таксона, 1156 от които бяха анотирани до ниво вид. Само две ASVs не можаха да бъдат причислени към тип. Най-

големият брой идентифицирани бактериални таксони и аотирани видове принадлежи на проба S12, докато най-ниският е в проба S17. За гъбите са идентифицирани общо 244 уникални таксона, 173 от които са аотирани до ниво вид. Най-големият брой идентифицирани бактериални таксони и аотирани видове принадлежат на проба S19, докато най-ниските са в проба W06.

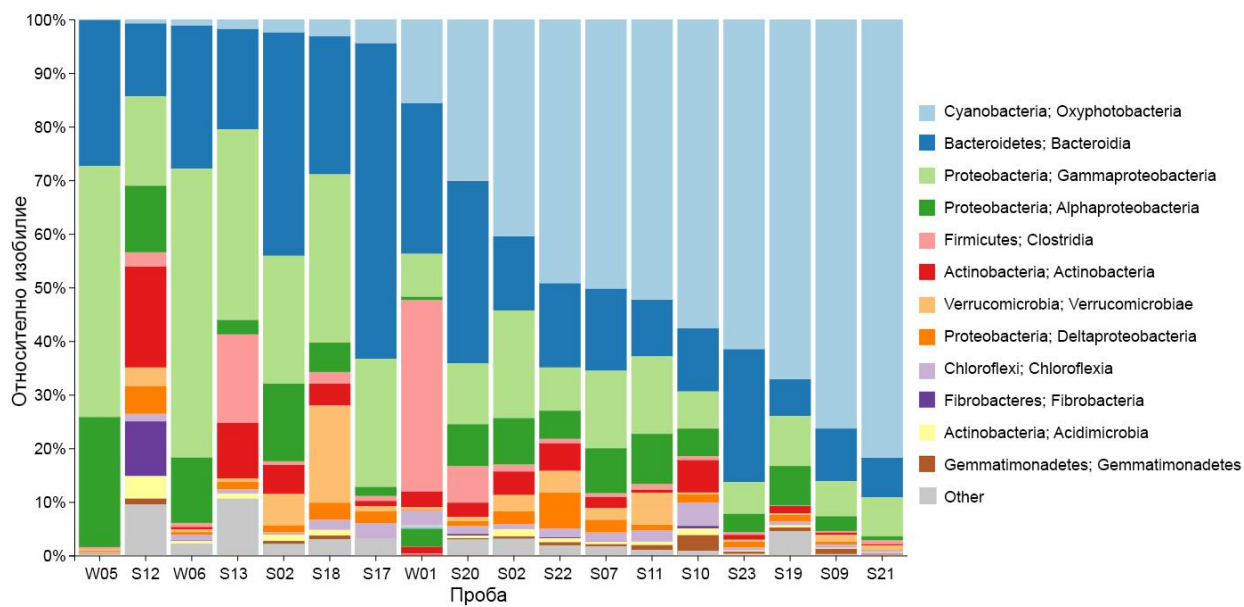


Фигура 5. Криви на ранг на изобилие за бактериите. Относителното изобилие (\log_{10}) на бактериалните ASVs в пробите, нанесено спрямо техния ранг на изобилие. Стръмните криви показват общност с ниска равномерност, т.е. няколко ASV представляват по-голямата част от последователностите. Богатството на една общност може също да бъде оценено чрез ранга на изобилието.



Фигура 6. Криви на ранг на изобилие за гъби. Относителното изобилие (\log_{10}) на гъбните ASVs в пробите, нанесено спрямо техния ранг на изобилие. Стръмните криви показват общност с ниска равномерност, т.е. няколко ASV представляват по-голямата част от последователностите. Богатството на една общност може също да бъде оценено чрез ранга на изобилието.

Проба W06 е изолирана от повърхността на скала в рамките на изследователската база и показва най-ниската бактериална равномерност и богатство от всяка бактериална общност. Само три организма съставляват повече от 50% от последователностите в тази проба. S12 е проба от почва под растителност и показва най-голямото богатство от всяка бактериална общност. Проба S09 е взета от микробните покривки върху потопени камъни и показва много висока равномерност на гъбни видовете, но ниско изобилие като цяло.



Фигура 7. Диаграма, показваща относителното изобилие на доминиращите бактериални класове и типа, към който принадлежат.

Най-видната група в повечето проби са цианобактериите от семейство *Leptolyngbyaceae*, която в една от пробите представлява 79% от показанията. Цианобактериите представляват повече от 50% от показанията на всички бактерии в микробните покривки върху потопени камъни. Други доминиращи групи в повечето проби включват класовете Bacteroidetes, Gammaproteobacteria и Alphaproteobacteria. Bacteroidetes представляват до 59% от показанията в пробата от микробни покривки върху потопени от базата (S17). Водните проби имат много високо съдържание на Грам-отрицателни бактерии - до 71%. Класът *Clostridiales* представлява 36% от показанията от лагуната, много повече, отколкото във всяка друга проба. 50%-98% от гъбните показания не могат да бъдат приписани към тип. Секвенирането с помощта на специфични за археите праймери дава относително малък брой прочити, като те представляват <1% от последователностите в повечето проби, докато останалите са идентифицирани като бактерии. Това не е така за пробите от морска вода, където археите представляват съответно 41% и 8% от показанията за проби W05 и W06. *Candidatus Nitrosopumilus*, *Nitrosarchaeum* и Marine Group II представляват по-голямата част от последователностите от морските проби. S07 и S12 също имат малко по-високо изобилие от археи със съответно 3% и 4% от всички прочити, като археите там са доминирани от рода *Woesearchaeales*.

3.1.3 Анализи на алфа разнообразието

Показателите за алфа разнообразие за бактерии и гъби са показани съответно в Таблица 1 и Таблица 2.

Таблица 1. Индекси на алфа разнообразие на всички проби в изследването, базирани на бактериалните показания.

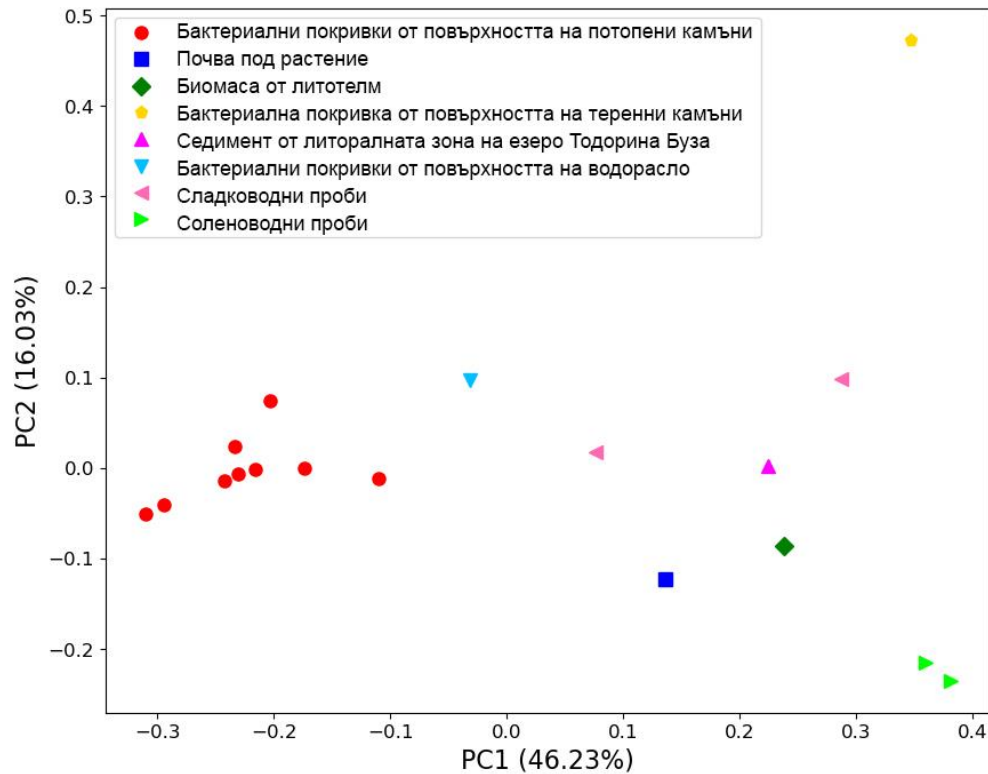
	richness	Шанън	Симпсън	chao1	ace	goods coverage	faith pd
S02	1065	7.470	0.969	1070.884	1071.221	1.000	74.103
S07	760	6.665	0.939	762.935	763.534	1.000	62.509
S09	445	3.035	0.543	446.375	448.276	1.000	49.169
S10	513	5.207	0.871	515.619	515.698	1.000	47.562
S11	405	5.910	0.929	405.875	407.058	1.000	47.661
S12	1592	8.487	0.985	1595.281	1596.486	1.000	89.834
S13	906	7.760	0.987	907.324	908.300	1.000	52.236
S17	169	5.784	0.954	169.667	170.608	0.999	28.950
S18	694	7.762	0.988	697.889	697.478	1.000	52.832
S19	646	5.880	0.948	647.774	648.614	1.000	46.071
S20	422	5.601	0.893	424.294	425.636	0.999	45.472
S21	307	2.180	0.390	307.036	307.468	1.000	39.399
S22	562	6.201	0.960	562.294	563.108	1.000	64.900
S23	487	4.010	0.776	491.138	491.869	1.000	49.020
W01	772	7.122	0.976	776.636	777.081	1.000	56.188
W02	1006	6.462	0.945	1009.288	1010.519	1.000	65.424
W05	531	5.460	0.942	533.528	535.345	1.000	41.971
W06	948	7.551	0.982	961.892	963.056	0.999	68.004

Таблица 2. Индекси на алфа разнообразие на всички проби в изследването, базирани на показанията на гъбите.

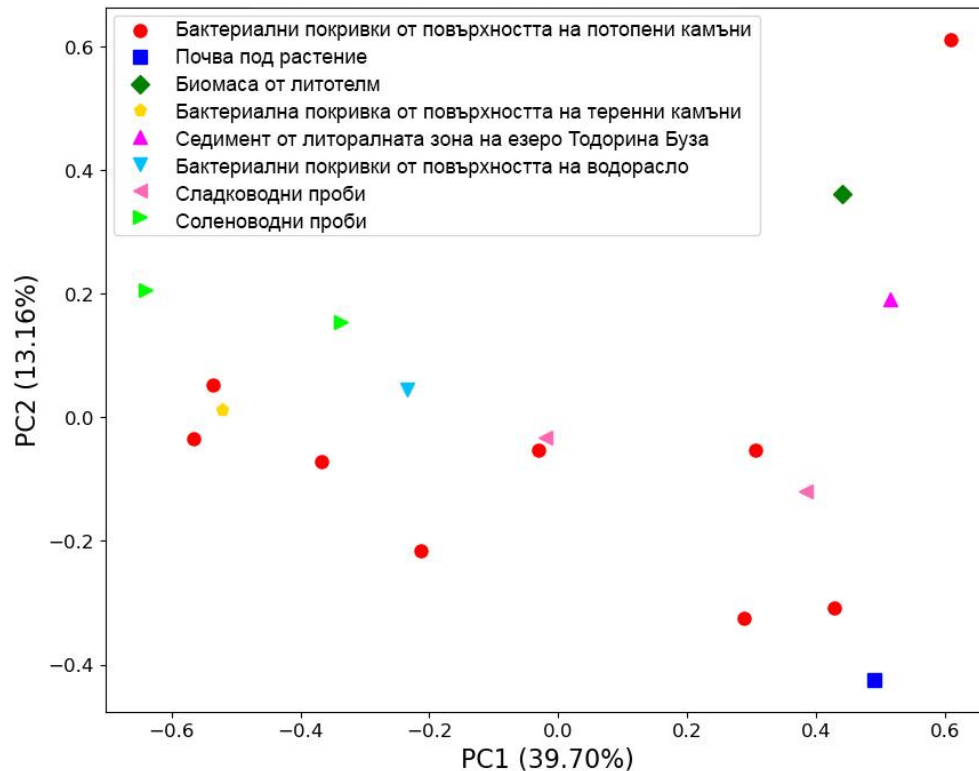
	richness	Шанън	Симпсън	chaol	ace	goods coverage	faith pd
S02	397.000	0.912	5.219	397.000	397.269	1.000	59.609
S07	301.000	0.834	4.147	301.000	301.255	1.000	46.483
S09	343.000	0.935	5.214	343.000	343.000	1.000	54.016
S10	278.000	0.813	3.756	278.000	278.000	1.000	47.546
S11	293.000	0.899	4.616	293.000	293.000	1.000	49.715
S12	450.000	0.923	5.283	450.000	450.297	1.000	73.568
S13	257.000	0.842	3.688	257.000	257.000	1.000	47.903
S17	387.000	0.718	3.449	388.950	391.773	1.000	72.876
S18	300.000	0.857	3.912	300.000	300.000	1.000	50.124
S19	488.000	0.869	4.591	488.006	488.922	1.000	98.081
S20	302.000	0.825	3.844	302.000	302.255	1.000	49.148
S21	240.000	0.643	2.833	240.120	240.865	1.000	65.513
S22	157.000	0.733	3.607	157.000	157.000	1.000	30.662
S23	399.000	0.887	4.730	399.000	399.268	1.000	98.842
W01	545.000	0.971	6.623	545.118	546.274	1.000	79.676
W02	497.000	0.878	5.043	497.000	497.000	1.000	74.793
W05	314.000	0.899	4.546	314.000	314.000	1.000	59.378
W06	191.000	0.609	2.604	191.000	191.000	1.000	36.959

3.1.4. Анализ на бета разнообразието

Бета разнообразието на бактериите е представено с помощта на принципен координационен анализ (PCoA) и претеглени UniFrac разстояния на Фигура 8.



Фигура 8. Графика на PCoA, използваща претеглени UniFrac разстояния между пробите за бактериалните показания.



Фигура 9. Графика на PCoA, използваща претеглени UniFrac разстояния между пробите за гъбните показания.

Всички проби от каменните покривки за бактерии се групират заедно въз основа на претеглени UniFrac разстояния. Основният двигател за това групиране е голямото изобилие от фотосинтезиращи цианобактерии от семейството *Oxyphotobacteria*. Проба S12 е взета от почва под растителност до безименното езеро и има най-високото алфа разнообразие от всички проби. Това е една от причините тя да не може лесно да се групира с никое от другите микробни общности на база бета разнообразието. Пробите от солена вода също се групират силно на база на бета разнообразието за бактериите. Гъбните съобщества не показват така силна групировка на база източника на пробата.

4.2. Анализ на антарктическите изолати

4.2.1. Растежни и морфологични характеристики на антарктическите изолати

Като цяло бяха изолирани 21 чисти култури. Някои от растежните им характеристики спрямо хранителната среда и температурата са дадени на Таблица 3. Морфологичните характеристики на клетките са дадени на Таблица 4. Морфологичните характеристики на колонииите са дадени на Таблица 5. Снимки на културите са представени на Фигура 10.

Таблица 3. Антарктическите изолати, температурата на култивиране и хранителната среда, на които са отглеждани. С „+“ е отбелязано наличието на растеж, с „-“ липсата на растеж, а в празните квадрати липсват данни за тези условия.

	Температура				Хранителна среда
	4°C	18°C	37°C	42°C	
AL01	+	+	-	-	МПА
AL14	+	+	+	-	МПА
AL21	+	+	-	-	МПА
AL15	+	+	+	-	МПА
AL10	+	+	+	-	МПА
AL16	+	+	+	+	МПА + 5 %NaCl
AL04			+	+	МПА + 5 %NaCl
AL06	+	+	-	-	Гаузе
AL18	+	+	+	-	Гаузе
AL11	+	+	+	+	Гаузе
AL13	+	+	-	-	Гаузе
AL12	+	+	-	-	R2A
AL08	+	+			R2A
AL17	+	+	-	-	R2A
AL03	+	+	-	-	R2A
AL07	+	+	+	-	R2A
AL19	+	+	+	-	R2A
AL20	+	+			R2A
AL09	+	+	+	-	R2A
AL02	+	+	+	-	R2A
AL05	+	+	-	-	R2A

Растеж в диапазона от 4°C до 18°C се е наблюдавало при всички изолати. Растеж при 37°C е имало при 58% от изолатите. Растеж при 42°C е имало само при 16% от изолатите. Само два от изолатите са се развили в пълния температурен диапазон на проучването – AL16 и AL11.

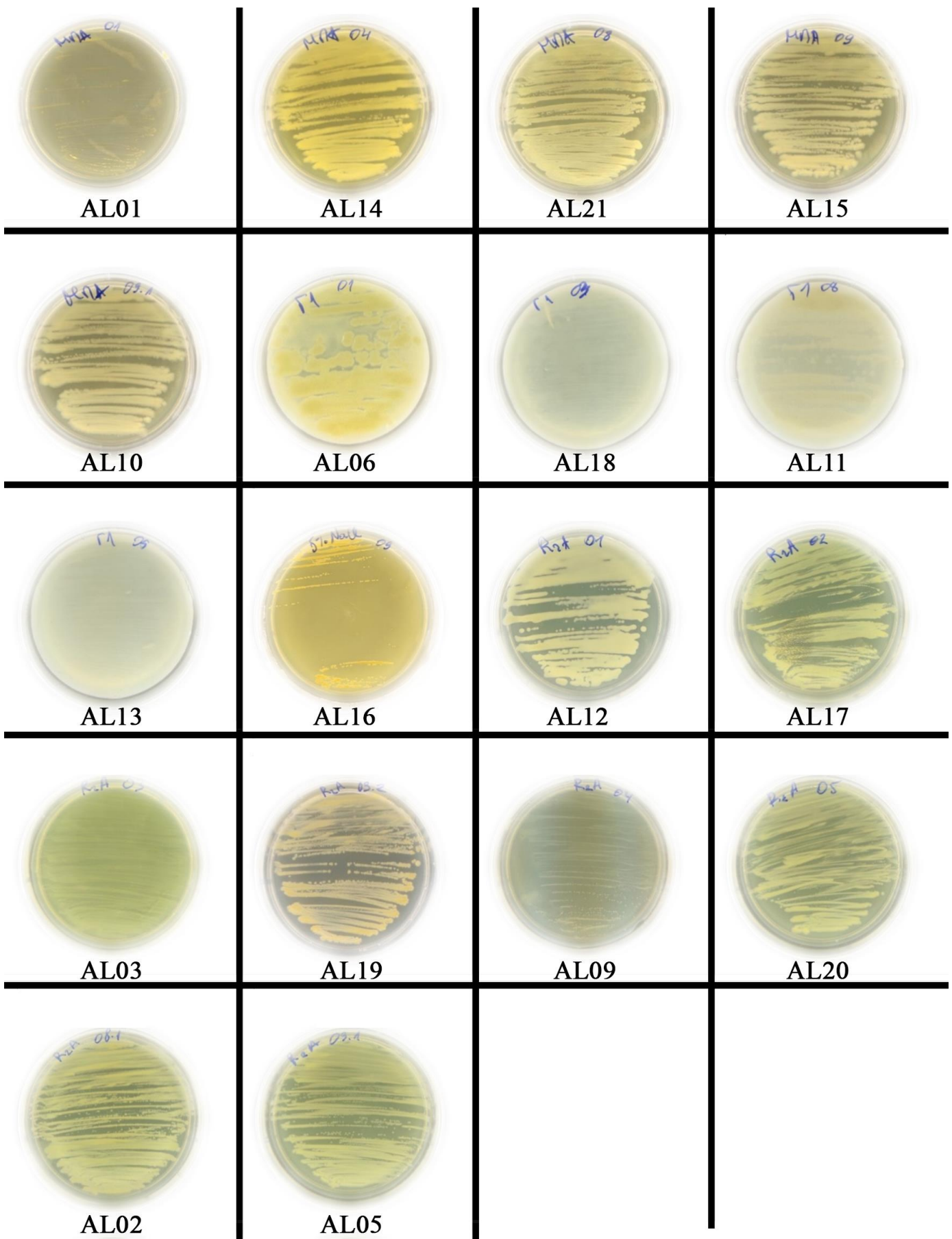
Таблица 4. Клетъчна морфология на антарктическите бактериални изолати.

Щам	Форма	Размер (µm)	Грам	Спори
AL01	Пръчки	1.2 / 0.7	+	-
AL14	Пръчки	1.4 / 0.6	+	-
AL21	Пръчки	1.6 / 0.5	-	-
AL15	Пръчки	2.1 / 0.8	-	-
AL10	Пръчки	1.8 / 0.6	-	-
AL16	Стафилококи	0,5	+	-
AL06	Пръчки	2.1 / 0.6	-	-
AL18	Пръчки	1,5 / 0.5	-	-
AL11	Пръчки	2.2 / 0.4	-	-
AL13	Пръчки	2.4 / 0.8	-	-
AL12	Пръчки	1.8 / 0.7	+	-
AL17	Пръчки	1.7 / 0.6	-	-
AL03	Пръчки	1.6 / 0.5	-	-
AL19	Пръчки	1.5 / 0.8	+	-
AL20	Пръчки	2.0 / 0.8	+	-
AL09	Пръчки	2.7 / 0.6	-	-
AL02	Пръчки	2.3 / 0.6	-	-
AL05	Пръчки	1.6 / 0.6	+	-

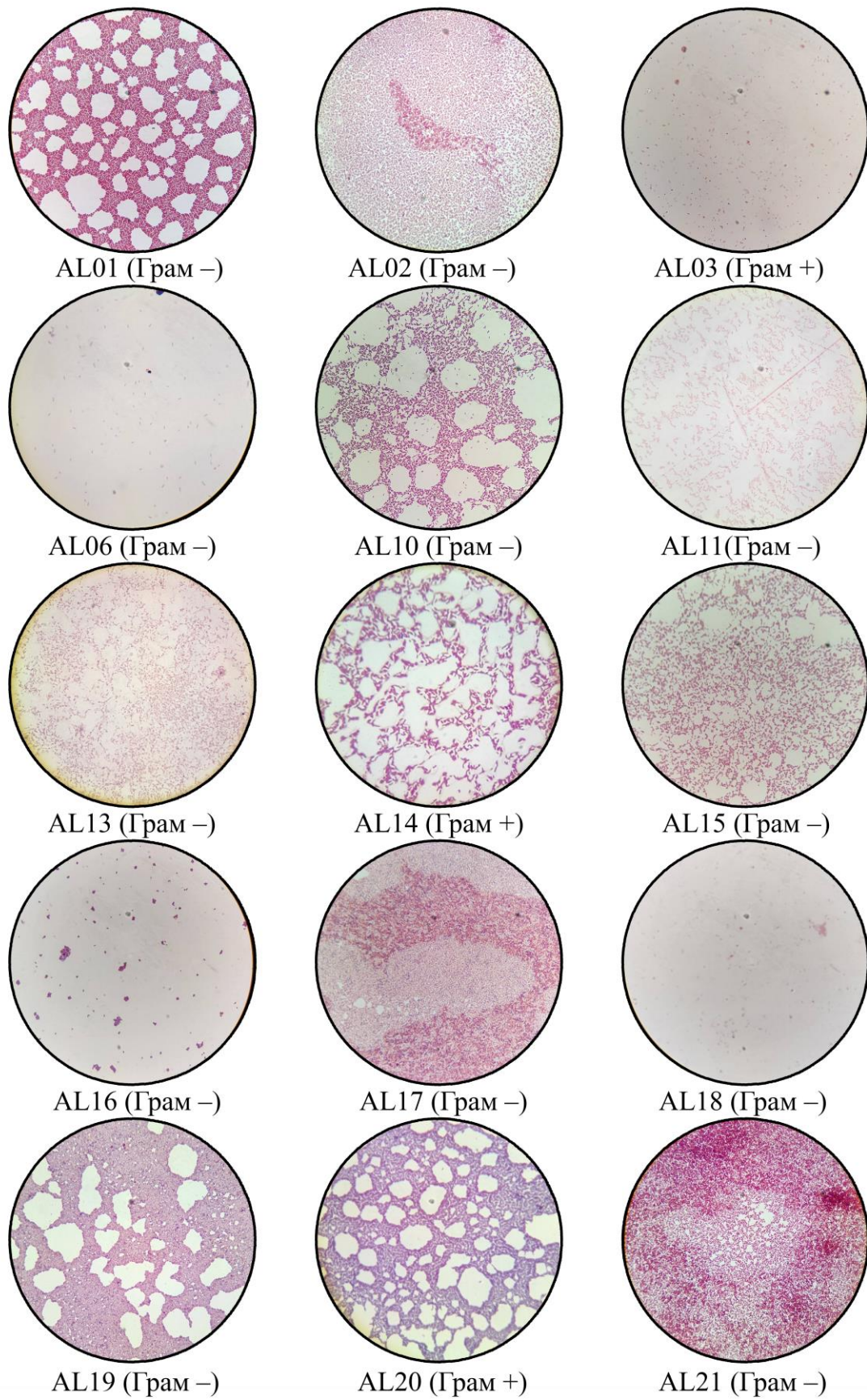
Всички клетки имат пръчковидна форма с изключение на щам AL16. Малко над половина от щамовете се оцветяват като грам положителни. Няма спорулиращи клетки.

Таблица 5. Макроморфолоични характеристики на антарктическите бактериални изолати.

Щам	Форма	Размер	Край	Повърхност	Отблясък	Цвят	Структура	Консистенция
AL01	кръгла	малки	равен	гладка	бляскава	оранжев	еднородна	отделя се лесно от агара
AL14	кръгла	точкови	равен	гладка	бляскава	белезникав	еднородна	отделя се лесно от агара
AL21	кръгла	точкови	равен	гладка	бляскава	белезникав	еднородна	отделя се лесно от агара
AL15	кръгла	точкови	равен	гладка	бляскава	белезникав	еднородна	отделя се лесно от агара
AL10	кръгла	точкови	равен	гладка	бляскава	белезникав	еднородна	отделя се лесно от агара
AL16	кръгла	точкови	равен	гладка	бляскава	жълтеникав	еднородна	отделя се лесно от агара
AL06	кръгла	малки	равен	гладка	бляскава	белезникав	еднородна	отделя се лесно от агара
AL18	кръгла	точкови	равен	гладка	матова	бял	еднородна	отделя се лесно от агара
AL11	кръгла	малки	равен	гладка	бляскава	бял	еднородна	отделя се трудно от агара
AL13	кръгла	точкови	равен	гладка	матова	бял	еднородна	отделя се лесно от агара
AL12	кръгла	точкови	равен	гладка	бляскава	бял	еднородна	отделя се лесно от агара
AL17	кръгла	точкови	равен	гладка	бляскава	белезникав	еднородна	отделя се лесно от агара
AL03	кръгла	точкови	равен	гладка	бляскава	белезникав	еднородна	отделя се лесно от агара
AL19	кръгла	малки	равен	гладка	бляскава	оранжев	еднородна	отделя се лесно от агара
AL20	кръгла	точкови	равен	гладка	бляскава	бял	еднородна	отделя се лесно от агара
AL09	кръгла	точкови	равен	гладка	бляскава	бял	еднородна	отделя се лесно от агара
AL02	кръгла, изпъкнала	точкови	плътен	гладка	бляскава	бял	еднородна	отделя се лесно от агара
AL05	кръгла	точкови	равен	гладка	бляскава	бял	еднородна	отделя се лесно от агара



Фигура 10. Снимки на чистите култури от антарктически бактерии.



Фигура 11. Микроскопски снимки след оцветяване по грам на антарктическите бактерии.

4.2.2. Резултати от целогеномно секвениране на антарктически бактериални изолати

Всички 21 изолата бяха подложени на 16S рРНК ампликон секвениране. На база получените таксономични резултати от BLAST, и по-конкретно процентът сигурност за таксономично ниво вид, ние идентифицирахме потенциални нови видове. Ампликон секвенирането надеждно идентифицира организмите до ниво род, но за разграничаването на видове, или още по-малко щамове, трябва да се внимава при интерпретацията на такива резултати. За да потвърдим наличието на нови видове и в огледа на бъдещи изследвания с тези щамове, 13 от тях бяха избрани за целогеномно секвениране. При избора на щамовете също се съобразихме със скоростта на растеж, тъй като много от тях се развиваха изключително бавно, както и с морфологичните им характеристики. Секвенирането на целия геном показва, че изолатите принадлежат към 7 бактериални рода, но само два от тях имаха достатъчно високо ниво на сигурност за най-близкия вид, а останалите 11 вероятно принадлежат към нови видове, които все още не са описани (Таблица 6). Данните от секвенираните геноми са представени на Таблица 7 и са качени в базата данни на National Center of Biotechnology Information National Institute of Health в САЩ, където са достъпни за изследователската общност (Таблица 8).

Таблица 6. Резултати от видовото и родовото определяне на бактериалните изолати, чиито геноми са секвенирани на базата на Average Nucleotide Identity (ANI). П – поток от разтопена ледникова вода, ЛО – локва от разтопена ледникова вода, ЛА – лагуна пред базата, М – морска вода.

	Най-вероятен вид	p стойност	P крит < 0.0351	ANI %	Нов вид	Източник
AL01	<i>Janthinobacterium tructae</i>	0.061	He	96.22	Да	П
AL03	<i>Pseudomonas migulae</i>	0.527	He	85.1	Да	Л
AL04	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	0.033	He	97.86	Да	М
AL05	<i>Arthrobacter</i> sp. U41 NZ CP015732	0.512	He	85.55	Да	П
AL07	<i>Pseudarthrobacter</i> sp. NBSH8	0.12	He	94.23	Да	Л
AL08	<i>Arthrobacter</i> sp. U41	0.512	He	85.54	Да	П
AL10	<i>Pseudomonas yamanorum</i>	0.502	He	85.83	Да	П
AL12	<i>Arthrobacter</i> sp. U41	0.39	He	88.55	Да	Л
AL15	<i>Pseudomonas yamanorum</i>	0.502	He	85.82	Да	П
AL16	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	0.00433	Да	99.9	He	П
AL19	<i>Exiguobacterium antarcticum</i>	0.0206	Да	98.75	He	Л
AL20	<i>Pseudarthrobacter</i> sp. NBSH8	0.118	He	94.28	Да	Л
AL21	<i>Pseudomonas yamanorum</i>	0.48	He	86.56	Да	ЛА

Таблица 7. Данни от целогеномното секвениране на антарктическите изолати.

Щам	Размер на генома	Брой контигии	N50 на контигиите	L50 на контигиите	Брой скелети	N50 на скелети	L50 на скелети	GC съдържание	Брой гени
AL05	3.9 мб	76	191.8 кб	7	70	223.8 кб	5	65.6%	3696
AL08	4 мб	335	191.8 кб	7	321	213.7 кб	6	65.5%	3915
AL12	4 мб	66	134.1 кб	10	55	199 кб	7	67%	3804
AL19	3.1 мб	70	105.5 кб	9	68	105.5 кб	9	47%	3206
AL01	6.1 мб	77	243 кб	10	65	264.7 кб	8	62.5%	5425
AL07	3.9 мб	108	119.3 кб	8	107	119.3 кб	8	64.5%	3722
AL20	3.9 мб	115	119.3 кб	8	-	-	-	64.5%	3726
AL04	4.5 мб	113	94 кб	14	106	110 кб	13	41%	4108
AL21	6.2 мб	120	134.1 кб	16	110	142.6 кб	14	60.5%	5678
AL03	5.9 мб	102	157.8 кб	13	99	165 кб	12	59%	5512
AL10	6.4 мб	132	128.4 кб	16	108	131.5 кб	13	60%	5804
AL15	6.4 мб	145	130.8 кб	14	130	131.5 кб	13	60%	5827
AL16	2.5 мб	28	375.6 кб	3	27	431.7 кб	3	31.5%	2470

Няколко от културите спадат към род *Pseudomonas*, който обхваща голям брой грам положителни видове с разнообразен метаболизъм и които се срещат по целия свят (Wu, Jin et al. 2015). Най-близкият идентифициран вид до две от културите е *P. yamanorum*, който е изолиран преди от субарктични среди (Arnau, Sánchez et al. 2015). *Arthrobacter* е друг род грам положителна бактерия, която се среща по целия свят, включително в антарктическа морска вода, цианобактерийни подложки и изпражнения на пингвини (Busse, Wieser et al.). Различни видове от *Pseudarthrobacter* и *Janthinobacterium* също са изолирани от антарктически местообитания (Mojib, Farhoomand et al. 2013, Shin, Lee et al. 2020, Chen, Zhang et al. 2022).

Таблица 8. Идентификатори в NCBI на секвенираните геноми.

Щам	Assembly	WGS	BioSample
AL05	GCA_029960715.1	JASBRC000000000	SAMN34230091
AL08	GCA_029960745.1	JASBRA000000000	SAMN34230093
AL12	GCA_029960645.1	JASBQY000000000	SAMN34230095
AL19	GCA_029960585.1	JASBQV000000000	SAMN34230098
AL01	GCA_029960805.1	JASBRF000000000	SAMN34230088
AL07	GCA_029960665.1	JASBRB000000000	SAMN34230092
AL20	GCA_029960595.1	JASBQU000000000	SAMN34230099
AL04	GCA_029960705.1	JASBRD000000000	SAMN34230090
AL21	GCA_029960545.1	JASBQT000000000	SAMN34230100
AL03	GCA_029960815.1	JASBRE000000000	SAMN34230089
AL10	GCA_029960685.1	JASBQZ000000000	SAMN34230094
AL15	GCA_029960625.1	JASBQX000000000	SAMN34230096
AL16	GCA_029960565.1	JASBQW000000000	SAMN34230097

3.3. Анализ на взаимодействията между отделните домейни микроорганизми

Числените стойности за всеки индекс (броят на общите етикети, броят на OTU и индексите на Шанън, Симпсън, Chao1 и ACE) във всяка проба са представени като хистограми по отношение на средните стойности на Фигура 12. За улесняване на тълкуването на резултатите, всяка проба беше обозначена с „+“, ако има по-висока от средната стойност или „-“, ако има по-ниска от средната стойност (Таблица 9). Обобщение на случаите на несъответствия е представено в Таблица 10 като общи числа, както и като проценти.

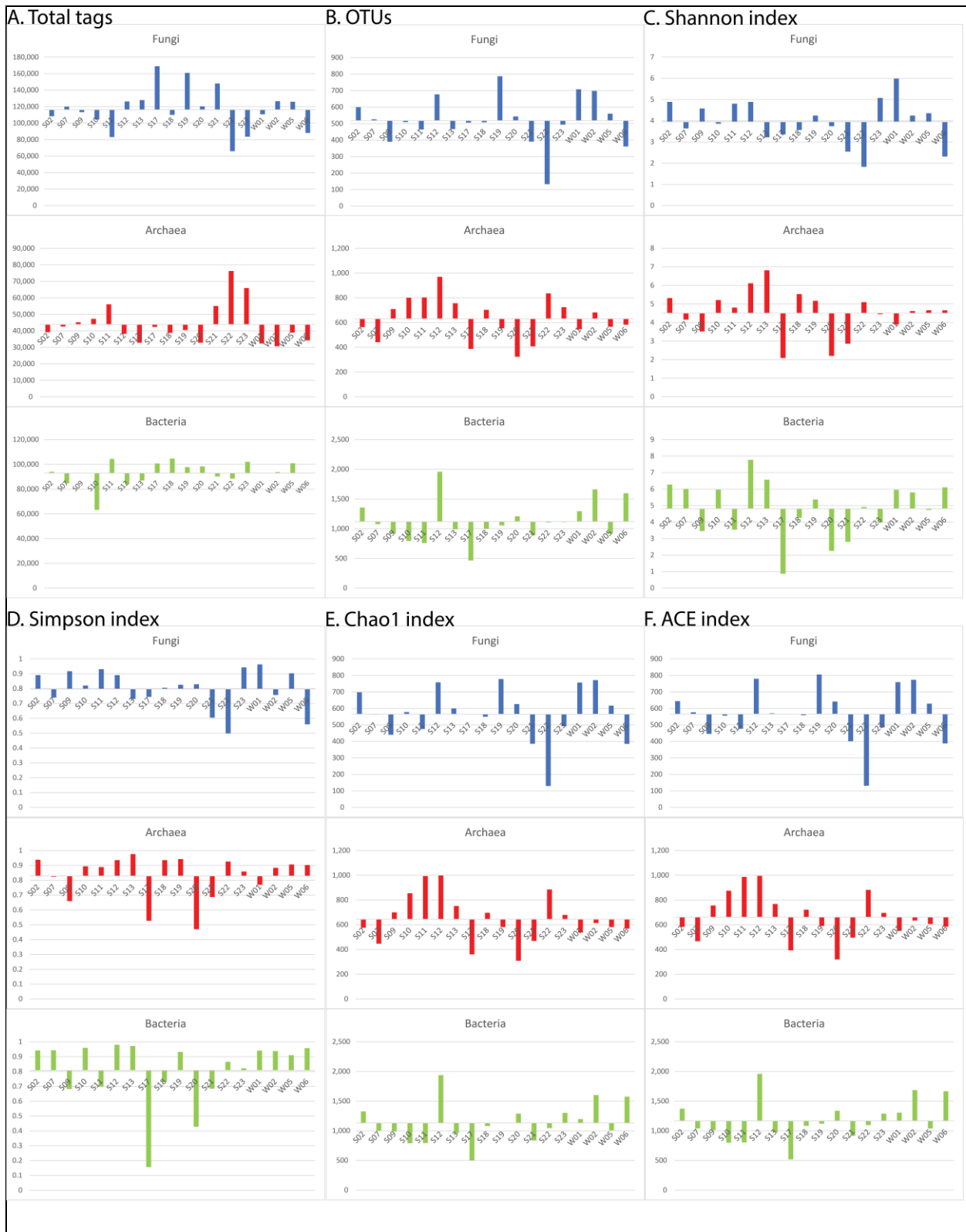
Линейната корелация на Пирсън показва статистически значима отрицателна корелация между ефективните маркери на археи и гъби, но не и между който и да е от другите показатели. (Таблица 11). От друга страна, беше показана много висока положителна корелация между археите и бактериите по отношение както на индексите на разнообразие на Симпсън, така и на Шанън.

Таблица 9. Матрица за сравнение, базирана на по-голямата или по-малка стойност по отношение на средната стойност на индексите.

Проба	Общи етикети			OTUs			Шанън			Симпсън			Chao1			ACE		
	Гъби	Археи	Бактерии	Гъби	Археи	Бактерии	Гъби	Археи	Бактерии	Гъби	Археи	Бактерии	Гъби	Археи	Бактерии	Гъби	Археи	Бактерии
S02	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S07	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
S09	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
S10	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
S11	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
S12	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S13	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
S17	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
S18	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
S19	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
S20	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+
S21	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S22	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
S23	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
W01	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
W02	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
W05	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
W06	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+

Таблица 10. Несъответствия между трите домейна микроорганизми в пробите, включени в това изследване.

Домейни	Общи етикети	OTUs	Шанън	Симпсън	Chao1	ACE
	Брой случаи на несъответствие					
Гъби - Археи	10	12	8	8	8	10
Гъби - Бактерии	10	8	8	9	4	7
Археи - Бактерии	10	10	4	3	10	11
	Процент несъответствия от всички случаите					
Гъби - Археи	56%	67%	44%	44%	44%	56%
Гъби - Бактерии	56%	44%	44%	50%	22%	39%
Археи - Бактерии	56%	56%	22%	17%	56%	61%



Фигура 12. Хистограма на стойностите за всеки индекс във всяка проба по отношение на средните стойности.

Таблица 11. Коефициенти на корелация на Пирсън и Спирман между различните групи микроорганизми. Статистически значимите корелации, според ниво на значимост 0.05, са маркирани с „*“,***.

Корелация на домейните	Коефициент на корелация	Ефективни етикети	OTUs	Шанън	Симпсън	Chao1	ACE
Гъби - Археи	Пирсън	-0.481 *	-0.137	0.071	-0.029	-0.179	-0.202
	Спирман	-0.389	-0.29	0.055	-0.151	-0.115	-0.201
Археи - Бактерии	Пирсън	-0.003	0.29	0.802*	0.833*	0.17	0.108
	Спирман	0.034	0.057	0.688*	0.618*	-0.022	-0.057
Гъби - Бактерии	Пирсън	0.06	0.31	0.187	0.02	0.344	0.341
	Спирман	-0.084	0.375	0.11	-0.136	0.395	0.455

4. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

4.1. Обща анализ на данните за алфа- и бета- разнообразията

Rarefaction кривите за бактериалните и гъбните последователности достигат плато с увеличаване на броя прочити, което показва, че пробите имат достатъчна дълбочина на секвениране и са представителни. Наблюдаваното видово богатство също силно съответства с индексите на богатството Chao1 и Ace. Като цяло, с малки изключения в пробите S09 и S21, пробите показват голямо разнообразие в индексите на Симпсън, Шанън и филогенетичното разнообразие, както за бактериите, така и за гъбите. Бета разнообразието изследвано с помощта на претеглени UniFrac разстояния показва, че бактериалните общности съответстват силно с вида на пробата и мястото на вземане на проби и се групират заедно на базата на няколко таксона, но не се наблюдава такова групиране при гъбите. S17 съдържаше най-висок брой хлоропласти, които отговаряха за 94% от последователностите и при филтриране на тях от първоначалните данни бяха възстановени относително малко количество бактериални ASVs. Това обяснява ниското богатство и изключително стръмния градиент на изобилието на извадката. Проба S17 все още достига плато на Rarefaction кривата и наблюдаваното богатство съответства на индексите на богатството, така че извадката остава представителна за общността.

По-голямата част от гъбичните последователности във всички проби не могат да бъдат приписани към тип. Големият брой неидентифицирани гъбни видове не е необичайно за антарктическите метагеномни изследвания и подчертава бедното ни разбиране на това царство както на арктическия, така и на антарктическия полюс (Bridge and Spooner 2012). Малък брой последователности от правилно секвенирани и охарактеризирани гъби от тези райони са налични в онлайн бази данни до момента, включително UNITE, който беше използван за обучение на класификатора в това изследване. Резултатите бяха сходни при използването на BLAST идентификация. Съществува постоянна необходимост от изясняване на гъбните видове, открити в полярните региони за разкриване на техния потенциал за биотехнологични приложения и дори за възможното съществуване на човешки

патогенни шамове, хванати в пермафрост², които бяха установени от едно проучване (Rosa, Zani et al. 2019, da Silva, Câmara et al. 2022). Все пак, необичайно високият дял на неидентифицирани ASVs около изследователската база “ Св. Климент Охридски“ може да представлява гореща точка на неоткрити гъбни видове, която изисква допълнително проучване.

Много малко археални прочити бяха възстановени в настоящото проучване, като домейнът напълно отсъстваше в някои от пробите. Много малък брой таксони доминират по-голямата част от археите във всички пробите, което също показва ниско богатство в археалните общности. Те представляват още една слабо изучена група организми в Антарктида, въпреки че някои от тях са изследвани за възможно биотехнологично приложение (Cabrera and Blamey 2018).

4.2. Микробиологичен състав на пробите от покривки от потопени скали

Най-разпространеният таксон в пробите от микробни покривки върху потопени не можа да бъде идентифициран до по-ниско таксономично ниво от семейството *Leptolyngbyaceae* и варира от 19 до 78% от показанията. Други родове цианобактерии, които са често срещани в пробите, включват *Tychonema* CCAP 1459-11B, *Pseudanabaena* PCC-7429, *Chamaesiphon* PCC-7430, *Geitlerinema* LD9 и *Aphanizomenon* NIES81. Проба S10 съдържа един организъм, който не можа да бъде идентифициран до по-ниско ниво от *Oxyphotobacteria*, но представлява 34% от последователностите. Проба S11 също съдържа голямо изобилие от рода *Phormidesmis* ANT.LACV5.1. Като цяло, това показва, че бактериалните покривки по камъни в антарктически локви и течащи води, които са формирани от разтопяването на ледници в близост до изследователската база, съдържат голям брой цианобактериални видове, които все още не са идентифицирани. Такива организми могат да притежават биотехнологичен потенциал за производство на пигменти, извънклетъчни полизахариди, антимикробни съединения и други полезни продукти (Prieto-Barajas, Valencia-Cantero et al. 2018, Silva, Silva et al. 2021, Sheikh, Hamid et al. 2022). Тяхната

² Пермафрост е почва или подводен седимент, който седи под 0°C за повече от 2 години.

допълнителна идентификация и изолиране в бъдещи експерименти може да разкрие висок биотехнологичен капацитет.

Останалите видове в тези проби, които не спадат към тим *Cyanobacteria*, изразяват много високо богатство и равномерност на ниво род, с изключение на проба S23, където родът *Thermoflexibacter* представлява 15% от всички прочити. Бактериите обикновено заемат специфична структура в рамките на биофилми и микробни покривки в антарктически сладководни тела - в горните слоеве доминират цианобактериите, които действат като автотрофни производители за микро-общността, докато различни хетеротрофни бактерии асимилират тези продукти в долните слоеве (Davey and Clarke 1992, de Los Ríos, Ascaso et al. 2004, Fernández-Valiente, Camacho et al. 2007, Smith, Schmit et al. 2016).

Само около една четвърт от показанията на гъбите за тези проби могат да бъдат отнесени към даден тип. Гъбичният род *Betamyces* е преобладаващ във всички проби, изолирани от лагуната и локвите от разтопена ледникова вода, със средно 13% от всички прочити. *Betamyces* е род, за който е доказано, че доминира в гъбични общности, образувани върху микропластмаси в сладководни антарктически езера (González-Pleiter, Velázquez et al. 2021). Наличието на този род може да се тълкува като индикатор за повишена микропластмаса във водата. Микропластмасите също са замесени като потенциален вектор за разпространението на устойчиви на антибиотици бактерии (Laganà, Caruso et al. 2019, Dong, Chen et al. 2021). Изненадващо, S10 съдържа много голямо изобилие от един единствен род – *Tetracladium*, който представлява половината от всички гъбни прочити и е доказано, че има биотехнологичен потенциал за производството на пектинолитични ензими (Carrasco, Rozas et al. 2019). Типът *Rozellomycota* също беше идентифициран, но не беше възможна по-задълбочена таксономична аотация и беше открит в значително изобилие единствено в проба S09.

Изобилието на археи в пробите от микробни покривки върху потопени е предимно под 0,1% от прочитите, с изключение на S07, където те достигат 3%. Във всички тези проби доминира род *Woearchaeales* от тип *Nanoarchaeota*. Доказано е, че този род преобладава във водите от разтопени ледници и е възможно по-голямото му изобилие тук да е от подобен източник (Purkamo, Ó Dochartaigh et al. 2022). Доказано е също, че *Woearchaeales* са

симбиотични с метаногенните археи и някои членове на рода са замесени в производството на метан (Kuroda, Narihiro et al. 2022, Ndayisenga, Yu et al. 2022).

4.3. Микробиологичен състав на покривка от повърхността на камък в областта на научната база

Епилитна³ проба S17 от камък в изследователската база се характеризира с голямо изобилие от *Flavobacterium* (37% от последователностите), *Hymenobacter* и до известна степен *Rhodoferrax*. Няколко вида *Flavobacterium* са изолирани от полярни почви и множество ASV от това проучване са причислени към този род (Bernardet and Bowman). Голямото относително изобилие на *Flavobacterium* е основната причина тази проба да покаже толкова голяма разлика в бета разнообразието, което от своя страна може да е резултат от голямото изобилие на хлоропласти, които бяха филтрирани от нея. Хлоропластите сочат към високото наличие на водорасли и прекомерното им изобилие може да промени състава на бактериалната общност, като го насочва към специфичен профил (Eigemann, Hilt et al. 2013). Епилитните общности също могат да имат много уникален набор от присъстващи олиготрофни микроорганизми (Amarelle, Carrasco et al. 2019). *Hymenobacter* е род, чийто типов вид е *H. roseosalivarius* и първоначално е изолиран от пясъчник в сухите долини Макмърдо, Антарктика, но самият род съдържа видове, изолирани от различни сурови среди около света (Buczolits and Busse). Археите и идентифицираните гъби бяха незначителни в тази пробата.

4.4. Микробиологичен състав в седимента от литоралната зона на езерото Тодорина Буза

Седиментна проба S18 от литоралната зона на езерото Тодорина Буза не се групирана най-силно по бета разнообразие до водната проба от същото езеро, което е изненадващо.

³ Епилитите са микроорганизми, които се развиват на повърхността на камъни.

Разликата в бактериалния състав на седимента и водата се свежда до много по-голямото изобилие на род *Luteolibacter* и много по-ниското изобилие на *Pedobacter* и *Polymorphobacter*, както и до известна степен на *Flavobacterium* и *Polaromonas*. Като цяло, пробата от седимента има по-високо алфа разнообразие в сравнение с водната повърхност и може да служи като възможен резервоар на микроорганизми за водата на езерото. Доказано е, че *Flavobacterium* е по-разпространен във водния стълб на плитките антарктически езера, което съответства с високото му присъствие в седимента на тези езера, и подобно смесване може да се случи с другите организми (Picazo, Rochera et al. 2019). Членовете на род *Luteolibacter* са изолирани от арктически почви и антарктически хиперсолени води, което би могло да сочи към смесването на почвени микроорганизми с тези от литоралния седимент (Kim, Pak et al. 2015, Guglielmin, Azzaro et al. 2023). Единственият идентифициран гъбен род, който представлява най-малко 1% от прочитите, е *Betamyces*, докато археалната фракция на прокариотите е незначителна. Важно е да се отбележи, че гъбите не представляват голяма част от биомасата във водните екосистеми, но показват голямо богатство, особено в крайбрежната зона, което частично обяснява голямото изобилие от неидентифицирани прочити (Grossart, Van den Wyngaert et al. 2019).

4.5. Микробиологичен състав на почвената проба под растение близо до безименното езеро

По-голямата част от родовете представляват 1-2% от всички последователности, което отразява високото богатство и равномерност на извадката. Само два рода представляват повече от 10% на прочитите - *Oryzihumus* и възможен род от семейство *Fibrobacteraceae*. Тази проба има най-високото относително изобилие на *Actinobacteria* от всяка проба в това изследване и заедно с високото съдържание на *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* показва подобен бактериален състав на предишни анализи на антарктическата ризосфера⁴ (Teixeira, Peixoto et al. 2010, Prekrasna, Pavlovska et al. 2022). Голямото биоразнообразие може да се причисли като резултат от свойствата на растителната ризосфера, която обикновено

⁴ Ризосферата е част от почвата, която има изменени физични, химични и биологични характеристики, като резултат от наличието на растителна коренова система.

съдържа по-ниско бактериално разнообразие от заобикалящата почва, като резултат от селективни взаимодействия между растението и бактериалните видове (Ling, Wang et al. 2022). Въпреки това е доказано, че чрез задържане на влага, облекчаване на температурния стрес, предотвратяване на изсушаване и осигуряване на хранителни вещества за микроорганизмите антарктическите растения функционират като убежище срещу неблагоприятните условия в студените олиготрофни пустини на Антарктика (Prekrasna, Pavlovska et al. 2022).

Почвената проба също съдържаше един от най-високите дялове на идентифицирани гъбни типове с половината от всички последователности. Гъбите бяха определени предимно като Ascomycota и Rozellomycota. Родът *Tetracladium* представляваше по-голямата част от типа Ascomycota, подобно на пробата от микробна покривка S10. Доказано е, че в земната повърхност тетракладиите са полезни коренови ендوفити и следователно биха могли да играят важна роля в ризосферата на антарктическите растения (Lazar, Mushinski et al. 2022). Rozellomycota са до голяма степен неизвестен тип гъби, които нямат хитинови обвивки и са паразитни по отношение на плесени, водорасли, ракообразни и амеби, които може би съществуват там, като благоприятни организми за растението гостоприемник на ризосферата (Corsaro, Walochnik et al. 2020). Връзката между по-голямото изобилие на идентифицираните гъби и наличието на растителна ризосфера, която създава по-гостоприемна микросреда и създава условия, по-близки до тези в по-умерените региони, е била предложена преди (Yergeau, Newsham et al. 2007). Тези условия биха могли да насърчат развитието на по-космополитни видове, които се идентифицират по-лесно, поради по-голямото изобилие от известни последователности, достъпни за класификатора.

Археите в почвената проба са в голямо изобилие в сравнение с другите сухи проби, като представляват 4% от общите прочити. Повечето от тях отново принадлежат към рода *Woesearchaeales* в рамките на типа Nanoarchaeota. Този род е преобладаващ и в една от пробите от микробни покривки върху потопени камъни - S07. Като се има предвид, че S07 и S12 имат много различни микробиологични профили, голямото разнообразие от среди, от които са били изолирани *Woesearchaeales*, и техният до голяма степен неизвестен метаболизъм, е трудно да се оцени източникът на този конкретен род или неговата функция в общността (Liu, Li et al. 2018).

4.6. Микробиологичен състав на проба от покривка от повърхността на макроводорасло

Пробата от микробна покривка от повърхността на макроводорасло S20 е най-близка по състав до пробите от повърхността на потопените камъни, което се очаква до някаква степен от сходния характер на тези местообитания. По подобен начин пробата съдържа голям дял от *Oxyphotobacteria* с доминиращ организъм от семейство *Leptolyngbyaceae*. Основната разлика в тези две общности е голямото изобилие на рода *Arcicella*, което представлява 26% от прочитите в проба S20, но практически липсва в пробите от каменните повърхности. Доказано е, че голямото изобилие от този род в сладководните езеро е съпътствано с цъфтежа на водорасли и затова повишеното им присъствие на повърхността на водораслите не е изненадващо (Wurzbacher, Attermeyer et al. 2017). *Arcicella* също са били открити преди това на границата скала-вода на антарктическите сладководни екосистеми, въпреки че родът е ограничен до повърхността на водорасли в нашето изследване (Huang, Swain et al. 2013). В пробата не са идентифицирани археи.

Както при останалите проби, малко гъби могат да бъдат причислени към тип. Ascomycota представлява по-голямата част от идентифицираните ASVs, което представлява 3% от всички последователност. Идентифицираните родове от типа включват *Lecophagus*, *Verrucaria* и *Tetracladium*. *Lecophagus* е род, който включва различни хищни гъби, включително *L. antarcticus*, който заразява тардигради (Loeffelholz, Stahl et al. 2021).

4.7. Микробиологичен състав на литотелми от Хана Пойнт

Литотелмите в близост до Hannah Pt. са пукнатини в скалите, които натрупват биомаса предимно от дейността на пингвините, но също така съдържат уловена морска вода. Това допринася за уникален профил на микробната общност, която не показва особено групиране в претегленото UniFrac бета разнообразие с никоя друга проба. Това също е една от пробите с най-високо алфа разнообразие и голямо количество ASV, които не могат да бъдат идентифицирани под нивото семейство. Най-представителните родове включват

Psychrobacter, *Gottschalkia*, *Flavobacterium*, *Simplicispira* и *Tissierella*, които също са били идентифицирани преди това в рамките на пингвиново гуано с помощта на молекулярни техники (Grzesiak, Kaczyńska et al. 2020). *Psychrobacter* включва халотолерантни и психротолерантни видове, обикновено изолирани от антарктическата морска среда (Kirkinci, Edbeib et al. 2021, Wang, Hou et al. 2021). Наскоро беше доказано, че някои щамове на *Psychrobacter* притежават потенциал за производство на адаптиран към студа антибиофилм и полиетилен биоразграждащи ензими и по този начин нови антарктически видове могат да притежават голям биотехнологичен потенциал (Esakkiraj, Bharathi et al. 2022, Zhang, Hou et al. 2022). Членовете на този род също са били предложени като пробиотични кандидати и е възможно те да са част от активния микробиом в чревните пътища на пингвините (Wuertz, Веça et al. 2023). Гъбите не можаха да бъдат идентифицирани до ниво тип, а археите не бяха идентифицирани в пробата.

4.8. Микробиологичен състав на соленоводните проби

Относително високото изобилие на рода *Cowellia* в морските проби е било докладвано преди в проучване на микрослоя на морската повърхност на водите в областта на остров Ливингстън (Martinez-Varela, Casas et al. 2020). Същото проучване посочи голямо изобилие от *Pseudoalteromonas* и *Pseudomonas*, което може да бъде ограничено до най-повърхностния слой на водата и следователно не видяхме толкова голямо изобилие от тези родове. *Cowellia* са род общи морски психротрофи, за които е доказано, че метаболизират широк спектър от въглеродородни съединения и са открити в голямо изобилие при нефтени разливи (Redmond and Valentine 2012). *Sulfitobacter*, неклассифициран род от *Nitrospiraceae*, *Polaribacter*, *SAR11 Clade Ia*, *Pseudomonas* и *Psychromonas* са някои от другите преобладаващи родове в пробата. 98-99% от гъбите не можаха да бъдат причислени към познат тип.

Пробите от морска вода имат най-голям дял археи. Археите от Емона Анкоридж (W06) бяха представени почти напълно от родовете *Nitrosarchaeum* и *Candidatus Nitrosopumilus* от типа Thaumarchaeota, но археите от морска група II от Euryarchaeota също присъстваха в около 5% от последователностите. Доказано е, че Thaumarchaeota (бивша

Морска Група I) е по-изобилна на по-големи дълбочини отколкото археите от MGII (Lincoln, Wai et al. 2014). Въпреки това, те представляват голямата част от археите в пробата от крайбрежната зона, взета от Емона Анкоридж, което може да се дължи на смесване от действието на вълни в близост до брега. Родът *Nitrosarchaeum* не съдържа само видове изолирани от сладководни източници, което може да се дължи на смесване на вода от лагуна или присъствието на неизвестен представител на рода. Както *Nitrosarchaeum*, така и *Candidatus Nitrosopumilus* представляват мезофилни, неутрофилни, аеробни, автотрофни, окисляващи амоняк археи (Qin, Martens-Habbena et al. 2016, Jung, Islam et al. 2018). Членовете на *Candidatus Nitrosopumilus* са сред най-разпространените археи в морската среда и играят ключова роля в морската нитрификация. MGII бяха много по-разпространени в пробата от Джонсън Док (W05), вероятно поради вземането на проби от пелагичната зона. MGII обикновено се срещат в плитките води, където те потенциално играят важна роля в цикъла на въглерода (Zhang, Xie et al. 2015).

4.9. Микробиологичен състав на сладководните проби

Бактериалните общности на двете сладководни проби не се групират заедно на основата на претеглени UniFrac разстояния. В действителност проба W01 се намира далеч от всички други проби на третата ос на PCoA фигурата, която не може да бъде показана тук. Сладководна проба W01 от лагуната се характеризира предимно с родовете *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* и семейството *Lachnospiraceae*, които практически отсъстваха от всяко друго място за вземане на проби. Доказано е, че групата *Bacteroides-Prevotella* е надежден индикатор за фекално замърсяване, свързан с дейността на топлокръвни животни (Okabe, Okayama et al. 2007). Освен това, родът *Faecalibacterium* понастоящем съдържа само един вид – *F. prausnitzii*, която е основната бактерия в човешкото дебело черво, но не е ясно дали идентифицираният ASV в това проучване е нов вид от рода (Miquel, Martín et al. 2013). Членове на семейство *Lachnospiraceae*, както и род *Bifidobacterium*, са едни от най-разпространените микроби в чревния тракт на хора и животни (Lagier, Million et al. 2012, Bunesova, Vlkova et al. 2014, Seshadri, Leahy et al. 2018). Всички тези родове описват 55% от общите последователности и сочат към значително

замърсяване в лагуната, дължащо се на чревни микроорганизми. Това най-вероятно е пряк резултат от известна активност на пингвини в лагуната. Като цяло, W01 има най-голямото относително изобилие на Firmicutes от всички проби в изследването. Цианобактерии от семейство *Leptolyngbyaceae* отново присъстват в относително голямо изобилие. Идентифицираните археи представляват по-малко от 1% от общите последователности. 75% от гъбните последователности от проба W01 не можаха да бъдат идентифицирани до тип, а 21% се класифицираха отново като *Betamyces*.

Бактериалният профил на сладководна проба W02 от езерото Тодорина Буза се отличава с високото изобилие на родовете *Pedobacter* и *Polymorphobacter* и до известна степен *Polaromonas* и *Flavobacterium*. *Pedobacter* и *Polymorphobacter* са космополитни родове, срещащи се в различни местообитания и двата са идентифицирани преди като част от антарктически езерни общности (Margesin and Shivaji). *Polaromonas* е род, който обикновено се изолира от полярните ледници и други места с голяма надморска височина (Darcy, Lynch et al. 2011). Доказано е, че *Pedobacter* има голям биотехнологичен потенциал за производството на различни съединения, включително хитиназа, антиоксиданти, пигменти, антимикуробни агенти и други (Wong, Tam et al. 2011, Correa-Llantén, Amenábar et al. 2012, Song, Seo et al. 2017). 98% от гъбните последователности не можаха да бъдат приписани към тип, докато археите представляваха по-малко от 1% от организмите.

4.10. Изследване на антагонистични отношения между отделните домейни микроорганизми

Тъй като наблюдавахме отрицателна корелация между алфа разнообразието на различните домейни организми, ние предположихме, че те вероятно свидетелстват за антагонистични взаимоотношения. Въпреки че съставът на микробните съобщества е силно повлияни от факторите на околната среда, които бяха изследвани преди (Picazo, Rochera et al. 2019, Kim, Kim et al. 2020) и биха могли да повлияят на наблюдаваните от нас взаимодействия, основната цел на това изследване беше да се изяснят тези антагонистични взаимодействия, като им се направи моментна снимка. За съжаление, цялостни изследвания на антагонистичните взаимодействия на суперкралствата, които биха могли да ни помогнат

да сравним нашите открития, практически липсват. Единственото изключение е изследването на Li et al., което се занимава с антагонизмът между бактерии и гъби в земеделски почви (Li, Garbeva et al. 2020).

Едно от най-вероятните обяснения на това несъответствие е предположението, че трябва да съществува известен антагонизъм между археите и другите два домейна, на свой ред вероятно причинен от суровите и в някои случаи олиготрофни антарктически условия. Ние избрахме да оценим тази антагонистична връзка директно - чрез сравняване на двойки. По-конкретно, ние проверихме колко често в даден набор от проби един домейн показва по-високо представяне от средното, докато другият домейн показва по-ниско представяне от средното. Тези резултати, графично представени на Фигура 12, бяха трудни за количествено определяне, така че беше конструирана по-проста матрица за сравнение, съставена само от „+“ и „-“ (Таблица 9), която от своя страна беше използвана в нашия количествен анализ на връзките на антагонизма (Таблица 10).

Броят на общите тагове, който представлява броят на ефективните тагове след сливане и филтриране на секвенционните прочити, е най-информативният параметър, тъй като той директно отразява разпределението на броя на секвенираните ДНК молекули в пробата. Тези модели на антагонизъм са наблюдавани в 10 от 18 случая (56%) във всичките три биномиални сравнителни групи: гъби срещу археи, гъби срещу бактерии и археи срещу бактерии.

Следващият анализиран параметър беше броят на OTU във всяка проба. Анализирането на броя OTU има предимството да отразява таксономичните групи (He, Caporaso et al. 2015). В този случай несъответствието между археите и гъбите е по-отчетливо - то се наблюдава в две трети от всички проби и дори повече във водните проби - в три четвърти от случаите (двете проби от морска вода и една от пробите от сладка вода). Що се отнася до двойката гъби-бактерии, несъответствието е по-слабо отчетливо, отколкото в случая на общия брой маркери (само в 44% от пробите), докато между археите и бактериите се наблюдават несъответствия в същия процент, както в рамките на общия брой на таговете.

Не могат да се наблюдават такива ясни тенденции в четирите индекса на алфа разнообразие. Въпреки това, по наше мнение, те също трябва да бъдат взети предвид, защото отразяват структурите на микробните общности. Наблюдаваните несъответствия и в трите двойки домейни по отношение на индексите Шанън и Симпсън варират между 17% и 50%. И двете се използват като оценители на богатството и равномерността на видовете, така че ниските проценти могат да се обяснят с високите стойности на OTU за трите домейна в рамките на анализиранияте проби. От друга страна, бяха получени по-интересни резултати за оценителите на богатството Chao1 и ACE (Chao 1984, Chao and Lee 1992, Chao, Ma et al. 1993).

По отношение на индекса Chao1, несъответствие в повече от 50% от случаите се наблюдава само за двойката археи–бактерии. Това наблюдение може да се обясни с факта, че този индекс се основава на singletons и doubletons в пробата, като по този начин се оценяват „пропуснатите“ видове (Kim, Shin et al. 2017), като бактериите са по същество суперцарството с най-голямо количество видове според нашите собствени наблюдения. От друга страна, несъответствия в индексите на ACE се наблюдават съответно в 56% и 61% от случаите за двойките гъби–археи и археи–бактерии. Тази тенденция съответства повече на наблюденията за броя на общите тагове и OTU, тъй като оценителят на богатството на ACE взема предвид както изобилните, така и редките видове и следователно трябва да бъде по-информативен, когато се изследва антагонизма между домейните.

Наличието на умерена, отрицателна корелация между ефективните тагове на гъби и археи, съчетано с липсата на такава отчетлива корелация в останалите показатели, намеква за възможно обяснение на тези резултати. Първо, важно е да се отбележи, че ефективните тагове представляват четенията на последователностите, преди те да бъдат групирани в OTU на базата на 97% сходство. Ако по-голямата част от ефективните етикети, които са свързани с наличието на корелация между две групи, също е присвоена на малък брой OTU, най-вероятно е всички потенциални взаимодействия да са ограничени в рамките на подмножество от вида в извадката и по този начин няма да бъде толкова очевидно в показателите за алфа разнообразие. От друга страна, ако не се наблюдава корелация между броя на ефективните маркери, но такава корелация присъства в показателите за алфа разнообразие, това може да сочи към голям брой видове, допринасящи за взаимодействието.

Виждаме подобна тенденция в някои от взаимодействията между археи и бактерии, където много висока корелация следва липсата на корелация в ефективните етикети в разнообразието.

Наличието на умерена, отрицателна корелация между прочитите на гъби и археи, заедно с липсата на такава отчетлива корелация в останалите показатели, води до едно възможно обяснение на тези резултати. Ако повечето от ДНК прочитите, които са свързани с наличието на корелация между два домена, се групират в малък брой OTUs, то междудоменните взаимодействия трябва да са ограничени до малък брой видове. Именно такава тенденция се наблюдава в корелационния анализ между гъби и археи и затова корелацията е значително по-слаба в останалите показатели. От друга страна, ако не се наблюдава корелация между броя прочити, но такава корелация присъства в останалите показатели, това може да сочи към голяма брой видове, които допринасят за взаимодействието. Виждаме и подобна тенденция в някои от взаимодействията между археи и бактерии, където липсата на корелация в прочитите е последвана от много висока корелация в разнообразието.

Освен това е изключително важно да се подчертае, че дадените проби представляват много различни екологични ниши, обхващащи седименти, солена вода, прясна вода, биомаса и проби от микробни покривки. По-точно, приблизително половината от пробите са от микробни покривки и следователно корелационните резултатите неизбежно ще клонат към специфичните взаимодействия в тези типове общности. Това се потвърждава от бета анализа, където се вижда, че микробните профили се групират силно на база мястото на вземане на проби. По този начин видовете взаимодействия, които се извършват в рамките на индивидуалните места за вземане на проби, неизбежно ще се припокриват от наличието на всякакви макромасщабни взаимодействия, които могат да бъдат приписани на фактори на средата на Антарктида като цяло. Въпреки това, поради липсата на проби за голям брой от източниците, е трудно някои от тях да бъдат изключени от набора данни или да бъде направен индивидуален анализ на отделните местообитания, без да се направи компромис с това колко представителна е извадката за тези местообитания.

Интересен случай е проба S22, получена от микробна покривка върху потопена скала в новото безименно езеро, разположено на няколко метра североизточно от

българската полярна база „Св. Климент Охридски“. Тази проба беше единствената, в която броят на общите маркери и OTU на археите надвишава тези на гъбите и се доближава до тези на бактериите. По-интересното е, че общият брой на археалните етикети е с около 16% по-голям от този на гъбните. Въпреки това, археалните OTUs са над шест пъти по-многобройни от гъбните. Не е изненадващо, че тази проба имаше най-големи стойности на оценители на общността Chao1 и ACE сред археите от всички анализирани проби. Все пак си струва да се отбележи, че това езеро се е образувало съвсем наскоро. По време на последната българска антарктическа експедиция преди COVID-19 през 2018–2019 г. на мястото му е съществувал постоянен ледник и езерото е открито едва по време на експедицията през 2020–2021 г., когато учените се завръщат в българската полярна база (експедицията през 2019–2020 г. е само била логистична за поддръжка на базата). По този начин не можем да кажем дали ледникът се е оттеглил, за да образува езерото една или две години преди вземането на пробата, но наистина това езеро представлява много нова екосистема. Този факт прави правдоподобна спекулацията за наличието на първична последователност на суперкралствата в новоколонизирани антарктически области. Наблюдавано е, че микроорганизмите са първите колонизатори след отдръпването на ледниците в планините (Ciccazzo, Esposito et al. 2016), така че е логично същият процес да се случи и в Антарктида. За съжаление, първичната микробна последователност в голи земи и други екологични ниши е слабо проучена (Ni, Larran et al. 2023). Според нашата хипотеза археите и бактериите са първите, докато на гъбите е необходимо повече време, за да колонизират новата среда. Ако тази хипотеза е вярна, това би обяснило защо в „старите“ екологични ниши в нашето изследване гъбите обикновено доминират над археите. Въпреки че няма данни за изместването на археалните общности в зони с разтопени ледници, проучванията върху бактериалните и гъбичните общности в тези области показват по-бързо изместване на бактериалните общности (Gyeong, Hyun et al. 2021). Въпреки че няма данни за изместването на микроби в новообразувани антарктически езера, значителни и отчетливи промени в едафични и литични бактериални и гъбни общности, свързани с развитието на почвата и криптогамната колонизация, са докладвани (Garrido-Benavent, Pérez-Ortega et al. 2020). Тези наблюдения биха могли да обяснят нашите резултати; обаче, на този етап от изследването би било трудно и до известна степен спекулативно да ги екстраполираме.

Нашето наблюдение е в съгласие с общата логика, че девствените среди първо се колонизират от автотрофи като първични производители, като хетеротрофите се появяват малко по-късно (Lekevičius 2022). Въпреки че подобни изследвания в Антарктида са сравнително оскъдни (Picazo, Rochera et al. 2019, Garrido-Benavent, Pérez-Ortega et al. 2020, Kim, Kim et al. 2020, Gyeong, Hyun et al. 2021), последователността от хетеротрофни микроорганизми след първата колонизация от автотрофни микроорганизми е документирана за среди в Алпите и Андите след отдръпването на ледниците съответно в Италия и Чили (Fernández-Martínez, Pérez-Ortega et al. 2017, Franzetti, Navarra et al. 2017, Franzetti, Pittino et al. 2020).

5. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

5.1. Изводи

1. Rarefaction кривите достигат плато при всички анализирани проби за трите групи организми в това проучване, което показва, че взетите проби са представителни за целите микробни съобщества.

2. Повечето бактериални проби се групират заедно въз основа на претеглените UniFrac разстояния, което показва силна корелация между мястото на взимане на пробите и съставът на бактериалните общества. Това също сочи за наличието на уникални бактериални профили, по-силно асоциирани с факторите на микросредите, от които бяха взети пробите, а не толкова с макрофакторите на остров Ливингстън като цяло.

3. Най-високото алфа разнообразие от всички сухи проби и всички изследвани групи организми беше открито в почвена проба S12, взета от кореновата система на растение и най-вероятно се дължи на ефекта, които ризосферата упражнява върху микробния профил там. Тази проба също имаше най-големият дял археи от сухите проби и най-големият дял идентифицирани гъби.

4. По-голямата част от гъбните последователности не можаха да бъдат таксономично аотирани от класификатора дори до ниво тип. Това показва голямо изобилие от неизвестни гъбни видове, които предстоят тепърва да бъдат описани и представляват голям потенциал за бъдещи проучвания.

5. Гъбните видове *Betamyces* и *Tetracladium* бяха идентифицирани в голям брой от пробите. *Betamyces* е показан да се развива в сладководни антарктически езера, които съдържат микропластмаси и може да бъде интерпретиран като индикатор за тях във водите на проучването. *Tetracladium* е показан да има биотехнологичен потенциал за синтезата на пектинолитични ензими.

6. Археите бяха най-слабо представената група от изследването и не бяха таксономично идентифицирани в някои от пробите, където по-голямата част от последователностите бяха аотирани като бактерии. Изключение бяха морските проби,

където археите достигнаха значителна част от прочитите. Като цяло, малко на брой археални таксони преобладаваха във всички проби, което показва ниско богатство в археалната общност.

7. Пробите от потопени скали съдържаха голямо изобилие и богатство от цианобактерии, много от които не са култивирани до момента. Най-често срещаният таксон беше неизвестен вид цианобактерия от семейство *Leptolyngbyaceae*, който дори се срещаше в много от останалите проби.

8. Епилитна проба S17 от повърхността на камък в изследователската база имаше уникална микробна общност, която не се групира с никоя друга проба според бета разнообразието. Това може да е от много високото количество хлоропласти в тази проба или уникалната среда, в която се намират организмите от нея, в сравнение с останалите проби от проучването.

9. Микробният профил на седимента от езеро Тодорина Буза беше изненадващо различен от профила на езерната вода. Това високо бета разнообразие между двете среди сочи за наличието на известна степен на стратификация в езерото. Наличието на някои общи организми между двете проби и по-високото алфа разнообразие на седимента може да сочи към функцията му като резервоар за микроорганизми на водния стълб.

10. Профилът на микробната общност от повърхността на макроводорасло не се различаваше значително от този на повърхностните проби на потопени камъни. Разликите се свеждаха до видове, които са типични индикатори за цъфтежа на водорасли. Това показва, че макроводораслите не упражняват конкретен селективен натиск върху микробния профил по повърхността им.

11. Литотелмите съдържат уникален микробиологичен профил, които не се групира с никоя друга общност по бета разнообразие и е изключително богат по алфа разнообразие. Много от прочитите не можаха да бъдат таксономично аотирани под нивото семейство, което сочи към наличието на голям брой неизвестни видове.

12. Разпределението на различни индикатори от проучването, както и статистически анализ на корелацията между тези индикатори, сочи към наличието на антагонистични взаимодействия между археите и другите два домейна от това проучване.

13. Резултатите от нашето проучване показват разлики в изобилието и моделите на разпространение сред археите, бактериите и гъбите. Въпреки че това може да е свързано с разликите в изискванията на околната среда, които не са изследвани в нашето проучване, ние вярваме, че антагонистичните взаимодействия могат да играят значителна роля.

5.2. Приноси

1. Това е първото изследване на микробиомите в различни екологични ниши около Българската антарктическа база „Св. Климент Охридски“, осъществено с помощта на методи, които не се основават на култивиране.

2. Бе показано, че в условията на ограничена лабораторна инфраструктура при полеви условия е възможно да се изолира ДНК от различни източници, която е подходяща за ампликон-базирани метагеномни анализи.

3. Бяха изолирани 11 под формата на чисти култури 11 изолата, които принадлежат към неописани към момента нови видове бактерии.

4. За пръв път на о-в Ливингстън бяха наблюдавани данни, сочещи към първична сукцесия на различни домейни микроорганизми в новообразувано езеро.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цел на настоящото изследване беше да бъде характеризирани микробиологичният състав на разнообразните екосистеми в областта и да се изследват микроорганизмите в околността на антарктическата изследователска база „Св. Климент Охридски“. За целта беше избрано масово паралелно ампликон секвениране, като показахме наличието на високо биоразнообразие и на голям брой неизвестни до момента микроорганизми, което също беше потвърдено с пълно геномно секвениране на изолирани култури.

Данни сочат, че лагуната близо до базата показва ясни признаци на замърсяване от различни бактерии, предимно Firmicutes и *Prevotella*. Това се дължи най-вероятно от активната дейността на пингвините и други животни, за които се знае, че посещават водата в лагуната. Важно е да се подчертае, че патогенни видове не бяха открити в лагуната и вероятно наличието на тези микроорганизми не може да е резултат от дейността в базата. Също така тя не представлява директен риск за живеещите в базата.

Гъбичният род *Betamyces* бе открит както в лагуната, така и в близките локви, формирани от разтапянето на ледници. Видове от този род са докладвани преди като опортюнистично растящи върху микропластмаси и приносят антропогенният фактор в областта не може да бъде пренебрегнат. Знае се, че околността в близост до антарктическите изследователски бази съдържат въглеводородни съединения, които са директен резултат от човешката активност. Допълнително близостта на базата до Хана Пойнт, която е една от най-популярните туристическо дестинации в Антарктика и често се посещава от круизни кораби, също най-вероятно би могло да допринесе за увеличените нива на микропластмаси във водата.

Беше разкрит голям потенциал на некултивирани цианобактерии от клас *Oxyphotobacteria*, особено един член от семейство *Leptolyngbyaceae*, който беше доминиращият организъм в почти всички проби от повърхностни микробни покривки по камъни, потопени във вода. Фотоокислителните цианобактерии са един изключително разнообразен таксон и ключови първични производители в студените и олиготрофни условия на Антарктида. Много цианобактерии намират приложение в биотехнологичното производство на антивирусни, антибактериални, антигъбни и дори антиракови субстанции.

Голям дял от неидентифицирани гъби е често срещан резултат на антарктическите метагеномни изследвания, но това беше особено вярно за нашето изследване. Това подчертава нуждата от по-нататъшно изследване на това царство в полярните региони, защото там съществува голямо разнообразие от неизвестни видове. Интересно е, че родът *Tetracladium* е един от идентифицираните микроорганизми и е доказано, че има потенциал за биотехнологични приложения и още изследвания са нужни за откриването на други потенциални полезни гъби.

Археите имаха най-малкия набор от идентифицирани последователности, освен в соленоводните проби, което донякъде не е изненадващо. По-голямата част от разнообразието на археи са изолирани от морета и океани. По-голямата част от последователностите, които бяха намножени с археа-специфични праймери бяха идентифицирани като бактерии. Ако секвенираните последователности са твърде различни от тези, които са достъпни в базата данни и което е напълно възможно при изолиране на археи от Антарктида, то таксономичното определяне също може да бъде некоректно.

Това е първото проучване, което определя микробиологичния състав на средите около антарктическата база „Св. Климент Охридски“, посредством метагеномни технологии. Получените резултати могат да служат като опорна точка за бъдещи метагеномни изследвания. Например за оценяването на промяната на микробиологичния профил във времето, което до момента е слабо изучено в Антарктида, но е от особено значение в огледа на промяната на климата. Трябва да се знае какво е състоянието на околната среда в този момент, за да можем да предприемем адекватни мерки за нейно съхранение. От друга страна сегашните знания за микроорганизмите около о-в Ливингстън могат да бъдат насочени към изследвания за изолиране и охарактеризиране на неизвестните видове, някои от които могат да имат биотехнологичен потенциал, както беше показано в тази работа.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Doytchinov, Vesselin V., and Svetoslav G. Dimov. 2022. "Microbial Community Composition of the Antarctic Ecosystems: Review of the Bacteria, Fungi, and Archaea Identified through an NGS-Based Metagenomics Approach" *Life* 12(6):916. <https://doi.org/10.3390/life12060916>; **IF 3.2, Q2**

Статията е цитирана в:

1. Ordóñez et al., 2022. Antarctic fungi with antibiotic potential isolated from Fort William Point, Antarctica. *Scientific Reports* 12(1):21477, DOI: 10.1038/s41598-022-25911-x
2. Habibi et al., 2023. Metagenomes from Coastal Sediments of Kuwait: Insights into the Microbiome, Metabolic Functions and Resistome. *Microorganisms* 11(2):531, <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020531>
3. Pradel et al., 2023. Microbial response to warming and cellulose addition in a maritime Antarctic soil. *Permafrost and Periglacial Processes* 2023; 1- 14. doi:10.1002/ppp.2182
4. Hong et al., 2023. Metagenomic Survey of Wood Decay Fungi in the Urban Trees of Singapore. *J. Fungi* 9:460, <https://doi.org/10.3390/jof9040460>
5. Decewicz et al. 2023. Structure and functions of a multireplicon genome of Antarctic Psychrobacter sp. ANT_H3: characterization of the genetic modules suitable for the construction of the plasmid-vectors for cold-active bacteria. *Journal of Applied Genetics* <https://doi.org/10.1007/s13353-023-00759-7>
6. Contreras et al., 2023. Commonalities between the Atacama Desert and Antarctica rhizosphere microbial communities. *Front. Microbiol.* 14:1197399, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1197399>
7. Hong et al., 2023. A Metagenomic Survey of Wood Decay Fungi in the Urban Trees of Singapore. *J. Fungi*, 9(4):460; <https://doi.org/10.3390/jof9040460>
8. Quiroga et al., 2024. Microdiverse bacterial clades prevail across Antarctic wetlands. *Molecular Ecology*, 00, 1–13. <https://doi.org/10.1111/mec.17189>
9. Feng et al. 2023. Marine Copepods as a Microbiome Hotspot: Revealing Their Interactions and Biotechnological Applications. *Water* 2023, 15(24):4203; <https://doi.org/10.3390/w15244203>
10. Jiya et al., 2023. Diversity and composition of fungal communities across diverse environmental niches in Antarctica. *Polar Science* 38:100973 <https://doi.org/10.1016/j.polar.2023.100973>
11. Pushkareva et al., 2024., Microbial community composition of terrestrial habitats in East Antarctica with a focus on microphototrophs. *Front. Microbiol.* 14:1323148; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1323148>
12. Varliero et al., 2024. Biogeographic survey of soil bacterial communities across Antarctica. *Microbiome* 12:9 <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01719-3>

Dimov, Svetoslav G., Vesselin V. Doytchinov, Neyko Neykov, Tsvetana Muleshkova, Lyubomir Kenderov, Ralitsa Ilieva, Dimitrina Georgieva Miteva, Meglena Kitanova, Slavi Peykov, and Mihail Iliev. 2024. "Observations on the Antagonistic Relationships between Fungi, Archaea, and Bacteria in Livingston Island (Maritime Antarctica) with the Use of Amplicon-Based Metagenomics" *Diversity* 16(1):56. <https://doi.org/10.3390/d16010056>; **IF 2.4, Q2**

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНАТА ЛИТЕРАТУРА

1. Amarelle, V., V. Carrasco and E. Fabiano (2019). The Hidden Life of Antarctic Rocks. The Ecological Role of Micro-organisms in the Antarctic Environment. S. Castro-Sowinski. Cham, Springer International Publishing: 221-237.
2. Arnau, V. G., L. A. Sánchez and O. D. Delgado (2015). "Pseudomonas yamanorum sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from a subantarctic environment." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **65**(Pt 2): 424-431.
3. Bernardet, J.-F. and J. P. Bowman (2015). Flavobacterium. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: 1-75.
4. Bridge, P. D. and B. M. Spooner (2012). "Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem?" Fungal Ecology **5**(4): 381-394.
5. Buczolits, S. and H.-J. Busse (2015). Hymenobacter. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: 1-11.
6. Bunesova, V., E. Vlkova, V. Rada, J. Killer and S. Musilova (2014). "Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities." Beneficial microbes **5**(4): 377-388.
7. Busse, H.-J., M. Wieser and S. Buczolits Arthrobacter. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: 1-70.
8. Cabrera, M. and J. M. Blamey (2018). "Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments." Biological research **51**.
9. Campbell, I. B. and G. Claridge (1987). Antarctica: soils, weathering processes and environment, Elsevier.
10. Carrasco, M., J. M. Rozas, J. Alcaíno, V. Cifuentes and M. Baeza (2019). "Pectinase secreted by psychrotolerant fungi: identification, molecular characterization and heterologous expression of a cold-active polygalacturonase from Tetracladium sp." Microbial Cell Factories **18**(1): 45.
11. Chao, A. (1984). "Non-parametric estimation of the classes in a population." Scandinavian Journal of Statistics **11**(4): 265-270.
12. Chao, A. and S. M. Lee (1992). "Estimating the Number of Classes Via Sample Coverage." Journal of the American Statistical Association **87**(417): 210-217.
13. Chao, A., M. C. Ma and M. C. K. Yang (1993). "Stopping Rules and Estimation for Recapture Debugging with Unequal Failure Rates." Biometrika **80**(1): 193-201.
14. Chen, Y., H. Zhang, W. Ping, L. Zhu, Y. Xin and J. Zhang (2022). "Pseudarthrobacter albicanus sp. nov., isolated from Antarctic soil." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **72**(1).
15. Ciccazzo, S., A. Esposito, L. Borruso and L. Brusetti (2016). "Microbial communities and primary succession in high altitude mountain environments." Annals of Microbiology **66**(1): 43-60.
16. Convey, P. (2017). "Antarctic ecosystems."
17. Coolen, M. J. L., E. C. Hopmans, W. I. C. Rijpstra, G. Muyzer, S. Schouten, J. K. Volkman and J. S. Sinninghe Damsté (2004). "Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica) during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change." Organic Geochemistry **35**(10): 1151-1167.
18. Correa-Llantén, D. N., M. J. Amenábar and J. M. Blamey (2012). "Antioxidant capacity of novel pigments from an Antarctic bacterium." The Journal of Microbiology **50**(3): 374.
19. Corsaro, D., J. Walochnik, D. Venditti, B. Hauröder and R. Michel (2020). "Solving an old enigma: Morellospora saccamoebae gen. nov., sp. nov. (Rozellomycota), a Sphaerita-like parasite of free-living amoebae." Parasitology Research **119**(3): 925-934.

20. da Silva, T. H., P. E. A. S. Câmara, O. H. B. Pinto, M. Carvalho-Silva, F. S. Oliveira, P. Convey, C. A. Rosa and L. H. Rosa (2022). "Diversity of Fungi Present in Permafrost in the South Shetland Islands, Maritime Antarctic." Microbial Ecology **83**(1): 58-67.
21. Darcy, J. L., R. C. Lynch, A. J. King, M. S. Robeson and S. K. Schmidt (2011). "Global Distribution of Polaromonas Phylotypes - Evidence for a Highly Successful Dispersal Capacity." PLOS ONE **6**(8): e23742.
22. Davey, M. C. and K. J. Clarke (1992). "FINE STRUCTURE OF A TERRESTRIAL CYANOBACTERIAL MAT FROM ANTARCTICA1." Journal of Phycology **28**(2): 199-202.
23. de Los Ríos, A., C. Ascaso, J. Wierzechos, E. Fernández-Valiente and A. Quesada (2004). "Microstructural characterization of cyanobacterial mats from the McMurdo Ice Shelf, Antarctica." Appl Environ Microbiol **70**(1): 569-580.
24. Dong, H., Y. Chen, J. Wang, Y. Zhang, P. Zhang, X. Li, J. Zou and A. Zhou (2021). "Interactions of microplastics and antibiotic resistance genes and their effects on the aquaculture environments." Journal of Hazardous Materials **403**: 123961.
25. Edwards, U., T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde and E. C. Böttger (1989). "Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA." Nucleic Acids Research **17**(19): 7843-7853.
26. Eigemann, F., S. Hilt, I. Salka and H.-P. Grossart (2013). "Bacterial community composition associated with freshwater algae: species specificity vs. dependency on environmental conditions and source community." FEMS Microbiology Ecology **83**(3): 650-663.
27. Esakkiraj, P., C. Bharathi, R. Ayyanna, N. Jha, A. Panigrahi, P. Karthe and V. Arul (2022). "Functional and molecular characterization of a cold-active lipase from *Psychrobacter celer* PU3 with potential antibiofilm property." International Journal of Biological Macromolecules **211**: 741-753.
28. Fernández-Martínez, M. A., S. Pérez-Ortega, S. B. Pointing, T. G. Allan Green, A. Pintado, R. Rozzi, L. G. Sancho and A. de los Ríos (2017). "Microbial succession dynamics along glacier forefield chronosequences in Tierra del Fuego (Chile)." Polar Biology **40**(10): 1939-1957.
29. Fernández-Valiente, E., A. Camacho, C. Rochera, E. Rico, W. F. Vincent and A. Quesada (2007). "Community structure and physiological characterization of microbial mats in Byers Peninsula, Livingston Island (South Shetland Islands, Antarctica)." FEMS Microbiology Ecology **59**(2): 377-385.
30. Franzetti, A., F. Navarra, I. Tagliaferri, I. Gandolfi, G. Bestetti, U. Minora, R. S. Azzoni, G. Diolaiuti, C. Smiraglia and R. Ambrosini (2017). "Temporal variability of bacterial communities in cryoconite on an alpine glacier." Environmental Microbiology Reports **9**(2): 71-78.
31. Franzetti, A., F. Pittino, I. Gandolfi, R. S. Azzoni, G. Diolaiuti, C. Smiraglia, M. Pelfini, C. Compostella, B. Turchetti, P. Buzzini and R. Ambrosini (2020). "Early ecological succession patterns of bacterial, fungal and plant communities along a chronosequence in a recently deglaciated area of the Italian Alps." FEMS Microbiology Ecology **96**(10).
32. Franzmann, P. D. (1996). "Examination of Antarctic prokaryotic diversity through molecular comparisons." Biodiversity & Conservation **5**(11): 1295-1305.
33. Garrido-Benavent, I., S. Pérez-Ortega, J. Durán, C. Ascaso, S. B. Pointing, R. Rodríguez-Cielos, F. Navarro and A. de los Ríos (2020). "Differential Colonization and Succession of Microbial Communities in Rock and Soil Substrates on a Maritime Antarctic Glacier Forefield." Frontiers in Microbiology **11**.
34. González-Pleiter, M., D. Velázquez, M. C. Casero, B. Tytgat, E. Verleyen, F. Leganés, R. Rosal, A. Quesada and F. Fernández-Piñas (2021). "Microbial colonizers of microplastics in an Arctic freshwater lake." Science of The Total Environment **795**: 148640.
35. Grossart, H.-P., S. Van den Wyngaert, M. Kagami, C. Wurzbacher, M. Cunliffe and K. Rojas-Jimenez (2019). "Fungi in aquatic ecosystems." Nature Reviews Microbiology **17**(6): 339-354.
36. Grzesiak, J., A. Kaczyńska, J. Gawor, K. Żuchniewicz, T. Aleksandrak-Piekarczyk, R. Gromadka and M. K. Zdanowski (2020). "A smelly business: Microbiology of Adélie penguin guano (Point Thomas rookery, Antarctica)." Science of The Total Environment **714**: 136714.

37. Guglielmin, M., M. Azzaro, P. Buzzini, D. Battistel, M. Roman, S. Ponti, B. Turchetti, C. Sannino, L. Borruso, M. Papale and A. Lo Giudice (2023). "A possible unique ecosystem in the endoglacial hypersaline brines in Antarctica." Scientific Reports **13**(1): 177.
38. Gyeong, H., C.-U. Hyun, S. C. Kim, B. M. Tripathi, J. Yun, J. Kim, H. Kang, J. H. Kim, S. Kim and M. Kim (2021). "Contrasting early successional dynamics of bacterial and fungal communities in recently deglaciated soils of the maritime Antarctic." Molecular Ecology **30**(17): 4231-4244.
39. Hai, R., Y. Wang, X. Wang, Z. Du and Y. Li (2014). "Impacts of Multiwalled Carbon Nanotubes on Nutrient Removal from Wastewater and Bacterial Community Structure in Activated Sludge." PLOS ONE **9**(9): e107345.
40. He, Y., J. G. Caporaso, X.-T. Jiang, H.-F. Sheng, S. M. Huse, J. R. Rideout, R. C. Edgar, E. Kopylova, W. A. Walters, R. Knight and H.-W. Zhou (2015). "Stability of operational taxonomic units: an important but neglected property for analyzing microbial diversity." Microbiome **3**(1): 20.
41. Huang, J. P., A. K. Swain, R. W. Thacker, R. Ravindra, D. T. Andersen and A. K. Bej (2013). "Bacterial diversity of the rock-water interface in an East Antarctic freshwater ecosystem, Lake Tawani(P)†." Aquatic Biosystems **9**(1): 4.
42. Johnson, J. S., D. J. Spakowicz, B.-Y. Hong, L. M. Petersen, P. Demkowicz, L. Chen, S. R. Leopold, B. M. Hanson, H. O. Agresta, M. Gerstein, E. Sodergren and G. M. Weinstock (2019). "Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis." Nature Communications **10**(1): 5029.
43. Jung, M.-Y., M. A. Islam, J.-H. Gwak, J.-G. Kim and S.-K. Rhee (2018). "Nitrosarchaeum koreense gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon member of the phylum Thaumarchaeota isolated from agricultural soil." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **68**(10): 3084-3095.
44. Kim, B. R., J. Shin, R. Guevarra, J. H. Lee, D. W. Kim, K. H. Seol, J. H. Lee, H. B. Kim and R. Isaacson (2017). "Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities." J Microbiol Biotechnol **27**(12): 2089-2093.
45. Kim, M., S. Pak, S. Rim, L. Ren, F. Jiang, X. Chang, P. Liu, Y. Zhang, C. Fang, C. Zheng and F. Peng (2015). "Luteolibacter arcticus sp. nov., isolated from high Arctic tundra soil, and emended description of the genus Luteolibacter." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **65**(Pt 6): 1922-1928.
46. Kim, S., J.-H. Kim, J.-H. Lim, J.-H. Jeong, J.-M. Heo and I.-N. Kim (2020). "Distribution and Control of Bacterial Community Composition in Marian Cove Surface Waters, King George Island, Antarctica during the Summer of 2018." Microorganisms **8**(8): 1115.
47. Kirkinci, S. F., M. F. Edbeib, H. M. Aksoy, S. Marakli and Y. Kaya (2021). "Identification of Dalapon degrading bacterial strain, Psychrobacter sp. TaeBurcu001 isolated from Antarctica." Polar Science **28**: 100656.
48. Kuroda, K., T. Narihiro, F. Shinshima, M. Yoshida, H. Yamaguchi, H. Kurashita, N. Nakahara, M. K. Nobu, T. Q. P. Noguchi, M. Yamauchi and M. Yamada (2022). "High-rate cotreatment of purified terephthalate and dimethyl terephthalate manufacturing wastewater by a mesophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor and the microbial ecology relevant to aromatic compound degradation." Water Research **219**: 118581.
49. Laganà, P., G. Caruso, I. Corsi, E. Bergami, V. Venuti, D. Majolino, R. La Ferla, M. Azzaro and S. Cappello (2019). "Do plastics serve as a possible vector for the spread of antibiotic resistance? First insights from bacteria associated to a polystyrene piece from King George Island (Antarctica)." International Journal of Hygiene and Environmental Health **222**(1): 89-100.
50. Lagier, J.-C., M. Million, P. Hugon, F. Armougom and D. Raoult (2012). "Human Gut Microbiota: Repertoire and Variations." Frontiers in Cellular and Infection Microbiology **2**.
51. Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin and N. R. Pace (1985). "Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses." **82**(20): 6955-6959.
52. Lazar, A., R. M. Mushinski and G. D. Bending (2022). "Landscape scale ecology of Tetracladium spp. fungal root endophytes." Environmental Microbiome **17**(1): 40.

53. Lekevičius, E. (2022). Appearance of Modern Ecological Pyramids: Summing Up. Biodiversity: Maintenance, Function, Origin, and Self-Organisation into Life-Support Systems. E. Lekevičius. Cham, Springer International Publishing: 197-211.
54. Li, X., P. Garbeva, X. Liu, P. J. A. Klein Gunnewiek, A. Clocchiatti, M. P. J. Hundscheid, X. Wang and W. de Boer (2020). "Volatile-mediated antagonism of soil bacterial communities against fungi." Environmental Microbiology **22**(3): 1025-1035.
55. Lincoln, S. A., B. Wai, J. M. Eppley, M. J. Church, R. E. Summons and E. F. DeLong (2014). "Planktonic Euryarchaeota are a significant source of archaeal tetraether lipids in the ocean." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(27): 9858-9863.
56. Ling, N., T. Wang and Y. Kuzyakov (2022). "Rhizosphere bacteriome structure and functions." Nature Communications **13**(1): 836.
57. Liu, X., M. Li, C. J. Castelle, A. J. Probst, Z. Zhou, J. Pan, Y. Liu, J. F. Banfield and J.-D. Gu (2018). "Insights into the ecology, evolution, and metabolism of the widespread Woese archaeal lineages." Microbiome **6**(1): 102.
58. Loeffelholz, J., L. Stahl, S. Momeni, C. Turberville and J. Pienaar (2021). "Trichoderma infection of limno-terrestrial tardigrades." Journal of Invertebrate Pathology **186**: 107677.
59. Margesin, R. and S. Shivaji (2015). Pedobacter. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: 1-17.
60. Martinez-Varela, A., G. Casas, B. Piña, J. Dachs and M. Vila-Costa (2020). "Large Enrichment of Anthropogenic Organic Matter Degrading Bacteria in the Sea-Surface Microlayer at Coastal Livingston Island (Antarctica)." Frontiers in Microbiology **11**.
61. Miquel, S., R. Martín, O. Rossi, L. G. Bermúdez-Humarán, J. M. Chatel, H. Sokol, M. Thomas, J. M. Wells and P. Langella (2013). "Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health." Current Opinion in Microbiology **16**(3): 255-261.
62. Mojib, N., A. Farhoomand, D. T. Andersen and A. K. Bej (2013). "UV and cold tolerance of a pigment-producing Antarctic Janthinobacterium sp. Ant5-2." Extremophiles **17**(3): 367-378.
63. Ndayisenga, F., Z. Yu, B. Wang, G. Wu, H. Zhang, I. A. Phulpoto, J. Zhao and J. Yang (2022). "Thermophilic-operating environment promotes hydrogen-producing microbial growth in a lignocellulose-fed DF-MEC system for enhanced biohydrogen evolution." Process Safety and Environmental Protection **167**: 213-224.
64. Ni, G., R. Lappan, M. Hernández, T. Santini, A. G. Tomkins and C. Greening (2023). "Functional basis of primary succession: Traits of the pioneer microbes." Environ Microbiol **25**(1): 171-176.
65. Okabe, S., N. Okayama, O. Savichtcheva and T. Ito (2007). "Quantification of host-specific Bacteroides-Prevotella 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater." Applied Microbiology and Biotechnology **74**(4): 890-901.
66. Picazo, A., C. Rochera, J. A. Villaescusa, J. Miralles-Lorenzo, D. Velázquez, A. Quesada and A. Camacho (2019). "Bacterioplankton Community Composition Along Environmental Gradients in Lakes From Byers Peninsula (Maritime Antarctica) as Determined by Next-Generation Sequencing." **10**(908).
67. Picazo, A., C. Rochera, J. A. Villaescusa, J. Miralles-Lorenzo, D. Velázquez, A. Quesada and A. Camacho (2019). "Bacterioplankton Community Composition Along Environmental Gradients in Lakes From Byers Peninsula (Maritime Antarctica) as Determined by Next-Generation Sequencing." Frontiers in Microbiology **10**.
68. Prekrasna, I., M. Pavlovska, N. Miryuta, A. Dzhulai, E. Dykyi, P. Convey, I. Kozeretka, T. Bedernichek and I. Parnikoza (2022). "Antarctic Hairgrass Rhizosphere Microbiomes: Microscale Effects Shape Diversity, Structure, and Function." Microbes and Environments **37**(2).
69. Prieto-Barajas, C. M., E. Valencia-Cantero and G. Santoyo (2018). "Microbial mat ecosystems: Structure types, functional diversity, and biotechnological application." Electronic Journal of Biotechnology **31**: 48-56.
70. Purkamo, L., B. Ó Dochartaigh, A. MacDonald and C. Cousins (2022). "Following the flow—Microbial ecology in surface- and groundwaters in the glacial forefield of a rapidly retreating glacier in Iceland." Environmental Microbiology **24**(12): 5840-5858.

71. Qin, W., W. Martens-Habbena, J. N. Kobelt and D. A. Stahl (2016). "Candidatus nitrosopumilus." Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria: 8818-8827.
72. Redmond, M. C. and D. L. Valentine (2012). "Natural gas and temperature structured a microbial community response to the <i>Deepwater Horizon</i> oil spill." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(50): 20292-20297.
73. Rosa, L. H., C. L. Zani, C. L. Cantrell, S. O. Duke, P. Van Dijck, A. Desideri and C. A. Rosa (2019). Fungi in Antarctica: Diversity, Ecology, Effects of Climate Change, and Bioprospection for Bioactive Compounds. Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications. L. H. Rosa. Cham, Springer International Publishing: 1-17.
74. Seshadri, R., S. C. Leahy, G. T. Attwood, K. H. Teh, S. C. Lambie, A. L. Cookson, E. A. Eloë-Fadrosh, G. A. Pavlopoulos, M. Hadjithomas, N. J. Varghese, D. Paez-Espino, N. Palevich, P. H. Janssen, R. S. Ronimus, S. Noel, P. Soni, K. Reilly, T. Atherly, C. Ziemer, A.-D. Wright, S. Ishaq, M. Cotta, S. Thompson, K. Crosley, N. McKain, R. J. Wallace, H. J. Flint, J. C. Martin, R. J. Forster, R. J. Gruninger, T. McAllister, R. Gilbert, D. Ouwerkerk, A. Klieve, R. A. Jassim, S. Denman, C. McSweeney, C. Rosewarne, S. Koike, Y. Kobayashi, M. Mitsumori, T. Shinkai, S. Cravero, M. C. Cucchi, R. Perry, G. Henderson, C. J. Creevey, N. Terrapon, P. Lapebie, E. Drula, V. Lombard, E. Rubin, N. C. Kypides, B. Henrissat, T. Woyke, N. N. Ivanova, W. J. Kelly and c. Hungate project (2018). "Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection." Nature Biotechnology **36**(4): 359-367.
75. Sheikh, T., B. Hamid, Z. Baba, S. Iqbal, A. Yattoo, S. Fatima, A. Nabi, R. Kanth, K. Dar, N. Hussain, A.-I. Alturki, K. Sunita and R. Sayyed (2022). "Extracellular polymeric substances in psychrophilic cyanobacteria: A potential bioflocculant and carbon sink to mitigate cold stress." Biocatalysis and Agricultural Biotechnology **42**: 102375.
76. Shin, Y., B.-H. Lee, K.-E. Lee and W. Park (2020). "Pseudarthrobacter psychrotolerans sp. nov., a cold-adapted bacterium isolated from Antarctic soil." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **70**(12): 6106-6114.
77. Silva, T. R. e., L. C. F. Silva, A. C. de Queiroz, M. S. Alexandre Moreira, C. A. de Carvalho Fraga, G. C. A. de Menezes, L. H. Rosa, J. Bicas, V. M. de Oliveira and A. W. F. Duarte (2021). "Pigments from Antarctic bacteria and their biotechnological applications." Critical Reviews in Biotechnology **41**(6): 809-826.
78. Smith, H. J., A. Schmit, R. Foster, S. Littman, M. M. M. Kuypers and C. M. Foreman (2016). "Biofilms on glacial surfaces: hotspots for biological activity." npj Biofilms and Microbiomes **2**(1): 16008.
79. Song, Y.-S., D.-J. Seo and W.-J. Jung (2017). "Identification, purification, and expression patterns of chitinase from psychrotolerant Pedobacter sp. PR-M6 and antifungal activity in vitro." Microbial Pathogenesis **107**: 62-68.
80. Teixeira, L. C. R. S., R. S. Peixoto, J. C. Cury, W. J. Sul, V. H. Pellizari, J. Tiedje and A. S. Rosado (2010). "Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica." The ISME Journal **4**(8): 989-1001.
81. Wang, Y., Y. Hou, Q. Wang and Y. Wang (2021). "The elucidation of the biodegradation of nitrobenzene and p-nitrophenol of nitroreductase from Antarctic psychrophile Psychrobacter sp. ANT206 under low temperature." Journal of Hazardous Materials **413**: 125377.
82. White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." PCR protocols: a guide to methods and applications **18**(1): 315-322.
83. Wong, C. M. V. L., H. K. Tam, S. A. Alias, M. González, G. González-Rocha and M. Domínguez-Yévenes (2011). "Pseudomonas and Pedobacter isolates from King George Island inhibited the growth of foodborne pathogens." Polish Polar Research(1): 3-14.
84. Wu, W., Y. Jin, F. Bai and S. Jin (2015). Chapter 41 - Pseudomonas aeruginosa. Molecular Medical Microbiology (Second Edition). Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton and J. Schwartzman. Boston, Academic Press: 753-767.
85. Wuertz, S., F. Beça, E. Kreuz, K. M. Wanka, R. Azeredo, M. Machado and B. Costas (2023). "Two Probiotic Candidates of the Genus Psychrobacter Modulate the Immune Response and Disease Resistance after Experimental Infection in Turbot (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus 1758)." Fishes **8**(3): 144.

86. Wurzbacher, C., K. Attermeyer, M. T. Kettner, C. Flintrop, N. Warthmann, S. Hilt, H.-P. Grossart and M. T. Monaghan (2017). "DNA metabarcoding of unfractionated water samples relates phyto-, zoo- and bacterioplankton dynamics and reveals a single-taxon bacterial bloom." Environmental Microbiology Reports **9**(4): 383-388.
87. Wynn-Williams, D. D. (1990). Ecological Aspects of Antarctic Microbiology. Advances in Microbial Ecology. K. C. Marshall. Boston, MA, Springer US: 71-146.
88. Yergeau, E., K. K. Newsham, D. A. Pearce and G. A. Kowalchuk (2007). "Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats." Environmental Microbiology **9**(11): 2670-2682.
89. Zhang, A., Y. Hou, Q. Wang and Y. Wang (2022). "Characteristics and polyethylene biodegradation function of a novel cold-adapted bacterial laccase from Antarctic sea ice psychrophile *Psychrobacter* sp. NJ228." Journal of Hazardous Materials **439**: 129656.
90. Zhang, C. L., W. Xie, A.-B. Martin-Cuadrado and F. Rodriguez-Valera (2015). "Marine Group II Archaea, potentially important players in the global ocean carbon cycle." Frontiers in Microbiology **6**.