

Diversitatea și activitatea metabolică a microbiomului peșterilor de gheață ca răspuns la schimbările climatice și poluarea antropică (CAVICE)

RAPORT ȘTIINȚIFIC

Etapa III - 2018

Studiul impactului variațiilor temporale ale climatului și al poluării antropice asupra diversității totale și active a microbiomului din gheața de peștera

Ghețarul Scărișoara conține unul dintre cele mai vechi blocuri de gheață perenă din peșteri, constituind un model pentru investigarea structurii, distribuției și activității comunităților microbiene din acest tip de habitat și corelarea acestora cu parametrii geochimici și palaeoclimatici. În vederea caracterizării impactului climatic și al poluării antropice asupra microbiomului din habitatele glaciare din peșteri, proiectul urmărește studiul diversității structurale și funcționale ale comunităților de microorganisme procariote din gheața de peșteră. Obiectivele și activitățile prevăzute în etapa III (Faza 2018) a proiectului și rezultatele obținute de echipa IBB au cuprins:

| Obiectiv 2018 | Activități | Rezultate |
|---|--|---|
| Studiul impactului variațiilor temporale ale climatului și al poluării antropice asupra diversității totale și active a microbiomului din gheața de peștera | 1.1. Analiza datelor izotopice în corelație cu cele cronologice ale sedimentelor de gheață | Reconstituirea climatului din ultimii cca. 1000 de ani în zona peșterilor Scarisoara și Svarthamar |
| | 1.2. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor generate de tulpini bacteriene izolate din gheața | Obținerea de nanoparticule de Au/Ag/Fe cu aplicabilitate biotehnologică |
| | 1.3 Analiza integrativă a impactului climei și poluării asupra microbiomului din peșterile de gheață | Identificarea răspunsului comunităților bacteriene din gheața perenă a peșterilor la variațiile climatice și poluarea antropică |

1.1. Analiza datelor izotopice în corelație cu cele cronologice ale sedimentelor de gheață

În cadrul proiectului s-a analizat compoziția izotopică a gheții și a calcitului criogenic în scopul reconstituirii condițiilor climatice din ultimii cca. 1000 de ani. S-au extras două carote de gheață din Peștera Ghețarul de la Scărișoara și din Ghețarul Focul Viu și s-au analizat rapoartele izotopilor $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ și $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ din gheață și calcit pentru a reconstitui schimbările de temperatură și cantitatea de precipitații pentru perioada de iarnă (Scărișoara) și vară (Focul Viu).

Calcitul criogenic din Peștera Ghețarul de la Scărișoara

Compoziția izotopică a precipitațiilor în zona peșterii variază între 6 ‰ pentru $\delta^{18}\text{O}$ și -22 ‰ pentru $\delta^2\text{H}$ în perioada verii, și -17.8 ‰ pentru $\delta^{18}\text{O}$ și -22 ‰ pentru $\delta^2\text{H}$ în timpul iernii, cu o medie de -9.1 ‰ pentru $\delta^{18}\text{O}$ și -62 ‰ for $\delta^2\text{H}$. Astfel, s-a constatat o corelație pozitivă între temperatura aerului și compoziția izotopică a precipitațiilor, precum și apa de percolație din peșteră. Valorile medii din carota de gheață din ultimii 1000 de ani sunt -10,3 ‰ pentru $\delta^{18}\text{O}$ și -71 ‰ pentru $\delta^2\text{H}$. Valorile izotopice din apă din carota de gheață prezintă valori scăzute până în anul 900 AD, valori mai mari între 900 și 1300

AD (Perioada Medievală Caldă, MWP) și, din nou, valori mai mici după 1300 AD (Little Ice Age, LIA) înregistrând minimul după 1800 AD. De asemenea, compoziția izotopică a CCC prezintă valori ușor mai mari în MWP și mai scăzute în LIA, sugerând eventual o influență climatică. Observațiile moderne sunt scurte pentru a putea calibra acest semnal presupus. Mai mult, termometria izotopică a arătat că fracționarea cinetică care domină în timpul înghețării apei conduce la o temperatură de formare neobișnuită reconstituită de +20°C. Cu toate acestea, valorile $\delta^{13}\text{C}$ și $\delta^{18}\text{O}$ în CCC au valori mai mari pentru probele din MWP decât cele din LIA. CCC rezultă din depunerea de CaCO_3 din $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2$, ulterior fiind un produs de dizolvare a rocilor cu acid carbonic. Principala sursă de CO_2 pentru a forma acidul carbonic este CO_2 din sol este produs prin respirația rădăcinilor. Studiile anterioare au arătat că $\delta^{18}\text{O}$ din acest CO_2 este în echilibru cu $\delta^{18}\text{O}$ din apă, astfel încât valorile mai mari (mai mici) ale $\delta^{18}\text{O}$ din CCC ar putea reflecta condiții mai calde (mai reci) în timpul MPM (LIA). Interpretarea valorilor $\delta^{13}\text{C}$ ale CCC nu este chiar simplă. Valorile mai ridicate ale $\delta^{13}\text{C}$ în solul cu CO_2 sunt determinate de limitarea umidității la plante, fie datorită umidității scăzute, fie datorită condițiilor mai înalte de evaporare. În timp ce în MWP era mai cald în zona de studiu, există date contradictorii privind precipitațiile, cu studii care sugerează atât condiții mai uscate, cât și mai umede, astfel încât este dificil de interpretat datele noastre privind izotopii de carbon. În afară de influența climatică directă, adâncimea solului ar fi putut avea un rol important, deoarece solurile mai adânci, așa cum se credea în pădurile de mesteacăn care dominau în timpul MWP, ar fi avut mai multă îmbogățire în izotopii grei cu adâncime decât solurile LIA (formată în principal din păduri de molid). Mai mult, seceta / temperaturile mai mari ar putea influența, de asemenea, cinetica reacției, care poate fi suficient de mare pentru a suprapune orice semnal de sol în $\delta^{13}\text{C}$.

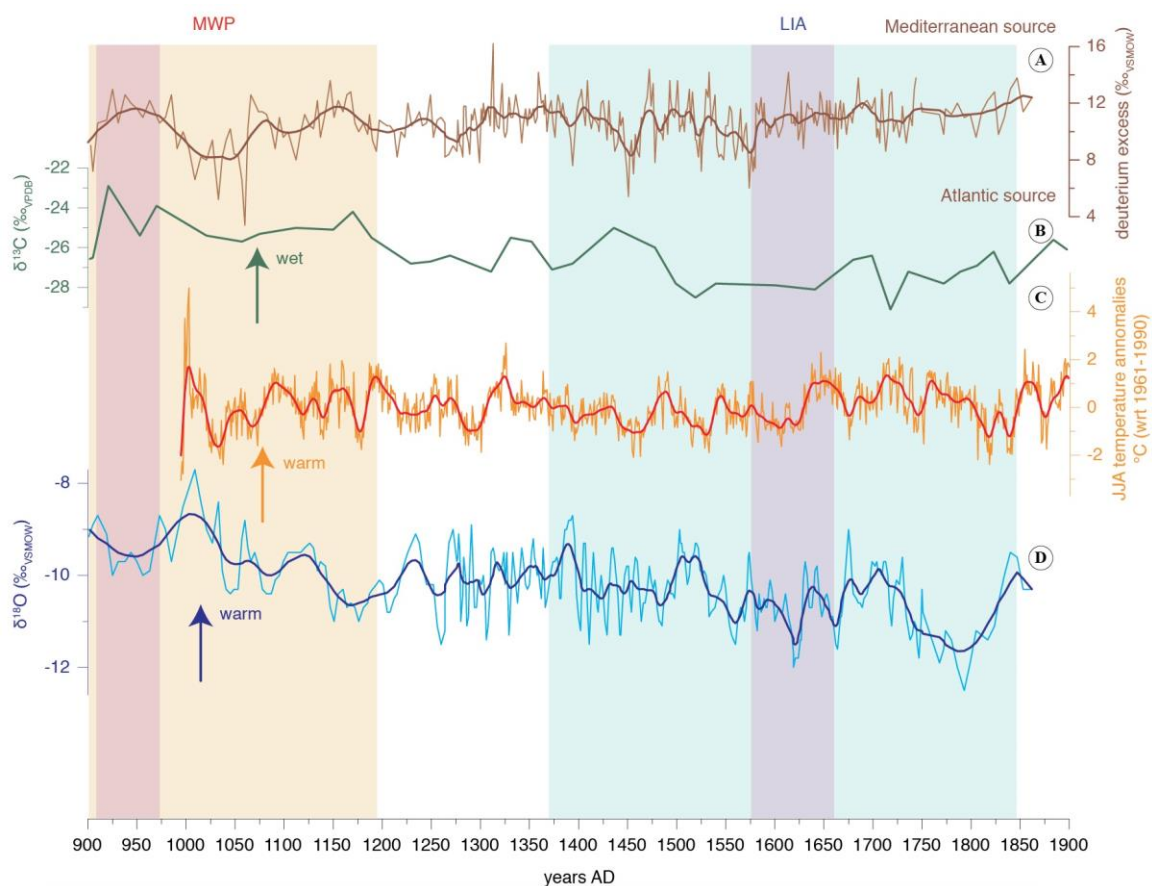


Fig. 1. Variabilitatea climatică în ultimii 1000 de ani în Peștera Ghețarul de la Scărișoara: A) sursa precipitațiilor, B) cantitatea de precipitații, C) temperatura de vară, D) temperatura de iarnă

Focul Viu

O corelație aproape perfectă a fost identificată între $d^{18}O$ (și d^2H) din gheață și măsurătorile instrumentale de temperatură din timpul verii la trei stații locale situate la vest, nord și est de locația peșterii și am folosit această corelație pentru a reconstitui variabilitatea temperaturii de vară în ultimii ~ 1100 de ani. Rezultatele noastre arată variabilitate pe scară centenară de-a lungul acestei perioade, sugerând că temperaturile de vară au fost probabil similare în Perioada Medievală caldă (MWP) și Mica Eră Glaciară (LIA). Spre deosebire de temperaturile de iarnă reconstituite din Peștera Ghețarul de la Scărișoara din apropiere, se observă în mod clar temperaturi mai scăzute în timpul LIA, comparativ cu MWP, ceea ce sugerează cunoscutul contrast de temperatură între cele două perioade ca rezultat al condițiilor climatice de iarnă. La scara decadală, atât în timpul MWP cât și în LIA, temperaturile de vară au fluctuat cu o periodicitate de ~ 20/30 de ani, minimumul și maximumul corespunzând fluctuațiilor înregistrate de temperaturile de la suprafața Oceanului Atlantic. Atât periodicitatea, cât și variabilitatea observată sunt similare cu cele ale Oscilației Atlantice Multidecadale, sugerând că valorile $d^{18}O$ și d^2H din gheața de la FV înregistrează modificări climatice la scară emisferică, fiind astfel un nou proxy important atât pentru temperaturile din trecut, cât și pentru schimbările circulației la scară largă.

1.2. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor generate de tulpini bacteriene izolate din gheață

Având în vedere faptul că o serie de factori afectează atât dimensiunea cât și forma nanoparticulelor (concentrația celulară, pH, temperatură, timpul de incubare, concentrația $AuCl$, lumină etc.). În acest context pentru realizarea screeningului de nanoparticule sintetizate de către tulpini bacteriene izolate din gheața de peșteră au fost selectate 2 seturi de probe pentru testarea a 3 condiții de sinteză diferite (Tabelul 1), respectiv:

- 7 tulpini caracterizate anterior ca psicrotolerante (5 tulpini de *Microbacterium hydrocarbonoxydans* și 2 tulpini de *Bacillus sp.*) incubate în prezența clorurii de Au la 28°C, la întuneric, fără agitare.
- 5 tulpini psicrotolerante (2 tulpini de *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, 1 tulpină de *Candidimonas bauzanensis*, 1 tulpină de *Sphingomonas oligophenolica* și 1 tulpină de *Chryseobacterium hominis*) și 2 tulpini psicrofile (*Mycetocola manganoxydans* și *Pseudarthrobacter oxydans*) incubate în prezența clorurii de Au la 15°C sub agitare, la întuneric și la 20°C, fără agitare, la lumina naturală.

Pentru a diminua interferența mediului de cultură asupra screeningului pentru celulele bacteriene capabile să sintetizeze nanoparticule, mediul R2A, utilizat în general pentru cultivarea tulpinilor bacteriene izolate din medii acvatice, inclusiv gheață, a fost utilizat doar pentru cultivarea tulpinilor. În vederea sintezei de nanoparticule, acesta a fost înlocuit cu mediul M9 cu 0,2% glucoză drept sursă de carbon. Această decizie a fost luată după ce la un test anterior de sinteză, a fost observată apariția de nanoparticule de Au abiogene, în tuburile de control cu mediu R2A, de unde a fost trasă concluzia că mediul de creștere R2A are capacitatea de a influența sinteza de nanoparticule.

Tabelul 1: Tulpinile bacteriene și condițiile de sinteză a nanoparticulelor utilizate

| Condiții de sinteză | Tulpina bacteriană (Cod intern) |
|--|--|
| 15°C agitare + întuneric/ 20°C fără agitare, + lumină | <i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> (cod intern 3) |
| | <i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> (cod intern 29) |
| | <i>Candidimonas bauzanensis</i> (cod intern 9) |
| | <i>Sphingomonas oligophenolica</i> (cod intern 31) |
| | <i>Chryseobacterium hominis</i> (cod intern 51) |
| | <i>Mycetocola manganooxydans</i> (cod intern 25) |
| | <i>Pseudarthrobacter oxydans</i> (cod intern 35) |
| 28°C fără agitare + întuneric | <i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> (cod intern 3) |
| | <i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> (cod intern 10) |
| | <i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> (cod intern 15) |
| | <i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> (cod intern 29) |
| | <i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> (cod intern 38) |
| | <i>Bacillus sp.</i> (cod intern 8) |
| | <i>Bacillus toyonensis</i> (cod intern 49) |

Metodologia de lucru pentru screeningul producției de nanoparticule a cuprins:

1. Cultivarea tulpinilor de interes în mediul specific de creștere (R2A) până la D.O. ~0.600.
2. Transferul 1,5 mL de cultură într-un tub Eppendorf și se centrifughează (13000 rpm, 10 min).
3. Spalarea celulelor bacteriene colectate prin resuspendare în mediu de creștere M9 fără sursă de carbon, și centrifugare (13000 rpm, 10 min).
4. Repetarea etapelor 4 și 5 de 2 ori.
5. Suspensia celulelor bacteriene în 1,5 mL de mediu M9 cu 0,2% glucoză și 1 mM AuCl₄. Soluția de 1 mM AuCl a fost obținută în mediu M9 cu sursă de carbon.
6. Incubarea la diferite temperaturi
7. În urma modificarea culorii mediului (în roz/gri), cultura se centrifughează (13000 rpm, 10 min), și absorbanta supernatantului este citită spectrofotometric la 515/570 nm.

Formarea nanoparticulelor a fost asociată cu schimbarea culorii mediului în roz la majoritatea tulpinilor incubate la 28°C (Fig. 2) și 20°C (cel mai rapid, Fig 3). În cazul tulpinilor incubate la 15°C (Fig 4) formarea nanoparticulelor a avut loc după > 30 de zile.

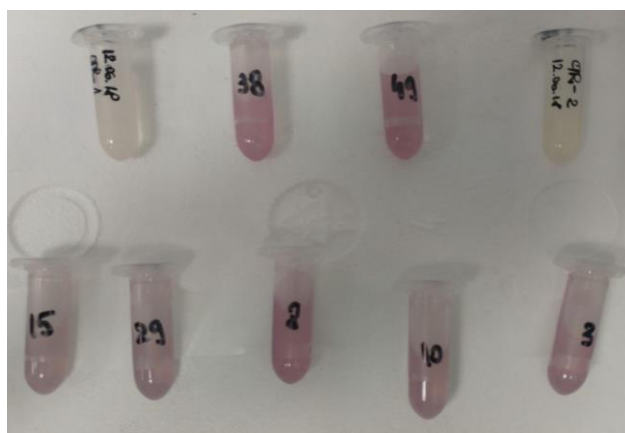




Fig. 3. Tulpinile bacteriene incubate la 20°C în prezență de 1mM AuCl₄



Fig. 4. Tulpinile bacteriene incubate la 15°C, în prezență de 1mM AuCl₄

Nanoparticulele de Au s-au format după 72 ore în cazul tulpinilor de *Microbacterium hydrocarbonoxydans* (cod intern 3) (Fig 5) și *Mycetocola manganoxydans* (cod intern 25) (Fig 6) incubate cu 1mM AuCl₄ la 20°C, fără agitare, la lumina.

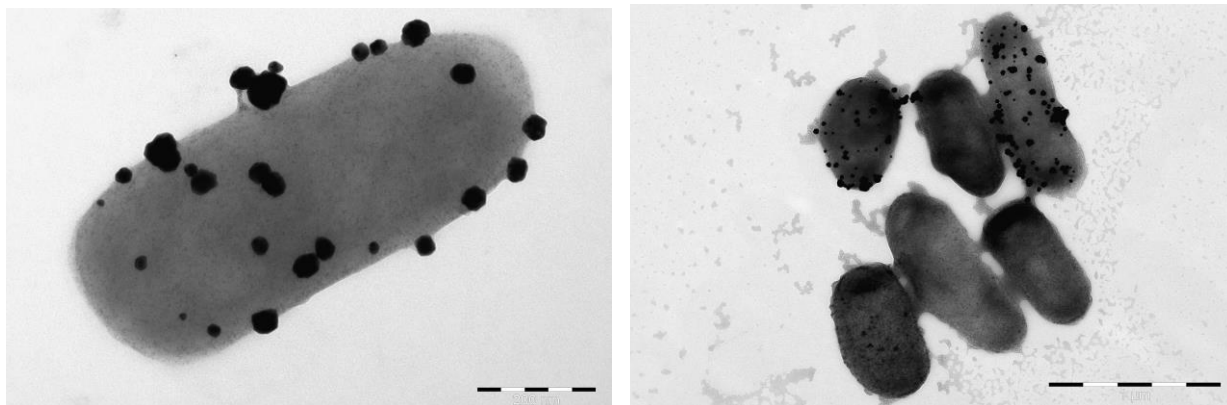


Fig. 5. *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, incubare la temperatura camerei (15-20°C), în prezență de 1mM AuCl₄. Vizualizare prin TEM.

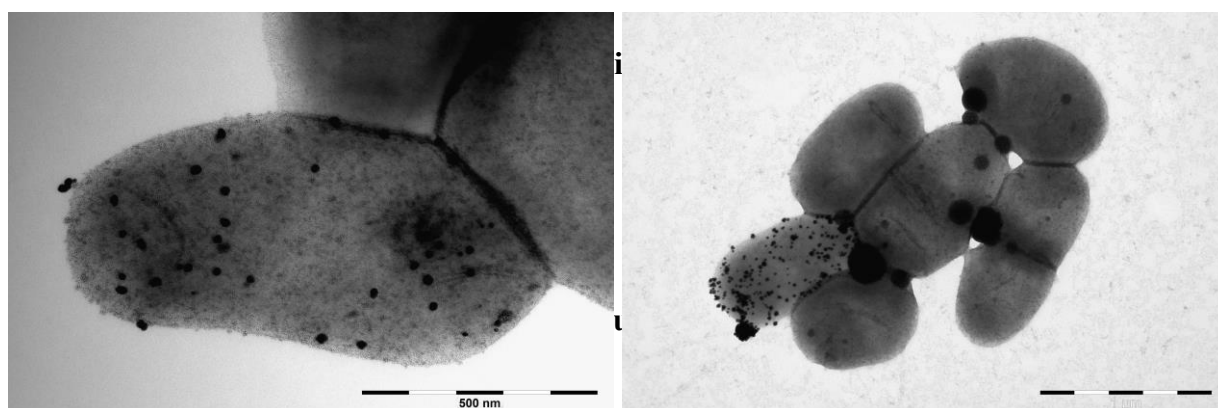


Fig. 6. *Mycetocola manganoxydans*, incubare la temperatura camerei (15-20°C), în prezență de 1mM AuCl₄. Vizualizare prin TEM.

63 de tulpini bacteriene provenind din carota de gheață cu o vechime de 13000 de ani au fost izolate și identificate taxonomic prin secvențiere Sanger a genei 16S ARN ribozomal și analiza BLASTx. Rezistența la antibiotice a acestor tulpini a fost testată pentru 20 de tipuri diferite de antibiotice. Testarea s-a realizat utilizând o formă modificată a metodei disc difuzimetrică (Bauer și colab., 1966), prin incubarea la 15°C timp de 48 de ore în mediul de cultură solid R2A specific microorganismelor cultivate din mediu acvatic.

Dintre cele 63 de tulpini analizate, 2 tulpini bacteriene aparținând genurilor *Cryobacterium* (90% identitate) și *Phyllobacterium* (91% identitate) au prezentat o morfologie diferită în funcție de mediul de cultivare (Fig. 7), sugerând capacitatea celor două tulpini de a produce metaboliți secundari.

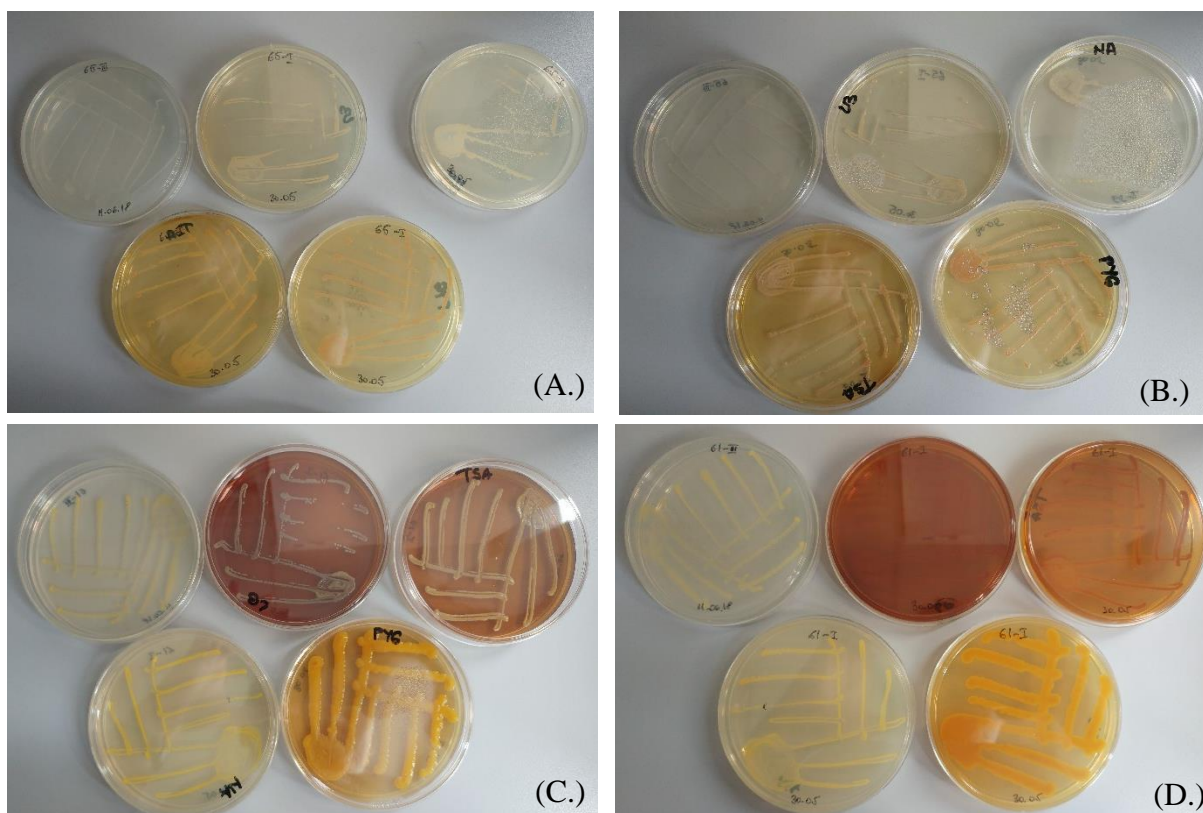


Fig. 7. Tulpini izolate din carota de gheață din Peștera Scărișoara, inoculate pe 5 medii diferite de cultură (R2A, LB, TSA, PYG, NA), (A.) și (B.): *Phyllobacterium* sp.; (C.) și (D.): *Cryobacterium* sp.

Rezultatele obținute au indicat o multirezistență a tulpinii *Phyllobacterium* sp. la 12 din antibioticele testate, constituind un bun candidat pentru studii ulterioare în vederea identificării genelor de rezistență la această specie bacteriană izolată din gheața de peșteră cu vârstă de 13,000 ani.

1.3. Analiza integrativă a impactului climei și poluării asupra microbiomului din peșterile de gheață

Comunitățile de procariote (bacterii și archaea) și fungice au fost identificate și analizate în relație cu compoziția geochimică a gheții și particularitățile climatice.

Determinarea comunităților bacteriene totale și active din peștera de gheață prin tehnica de secvențiere de nouă generație (NGS)

În urma colectării probelor de gheață de vârste până la 13.000 de ani prin carotare verticală a blocului de gheață în Sala Mare din cadrul Peșterii “Ghețarul de la Scărișoara”, atingând adâncimea de 25,33 m, au rezultat 97 de fragmente de carotă de gheață, de diferite dimensiuni utilizate pentru analize

microbiologice, analize chimice, datări ^{14}C și analize de izotopi stabili. Vârsta carotei de gheață a fost determinată în baza analizei ^{14}C AMS a 26 de probe intermediare (Perșoiu și colab., 2017) iar modelul vârstă-adâncime a fost construit cu ajutorul modelului Bayesian pentru probele de 0 – 22,5 m adâncime și prin extrapolare lineară pentru probele până la adâncimea de 25,33 m (Fig. 8).

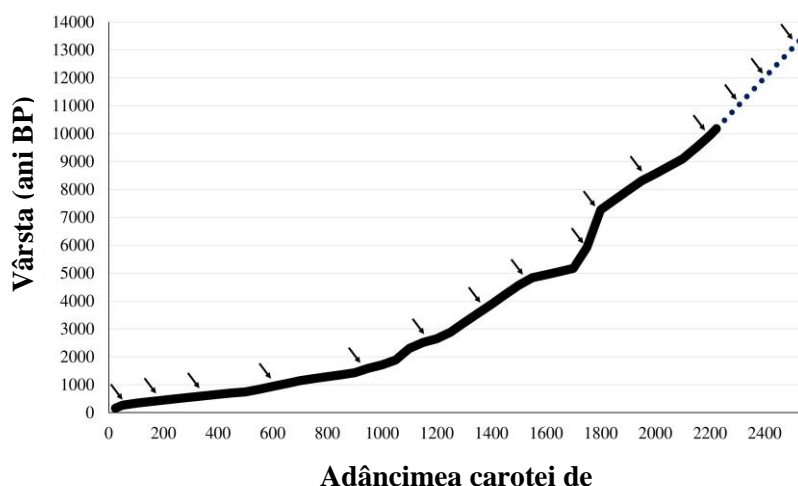


Fig. 8. Vârsta carotei de gheață Scărișoara. Vârsta determinată prin datele cu ^{14}C (linia neagră), extrapolarea lineară pentru adâncimea de 22,5 – 25,33 metri (linie punctată) și poziția celor 15 probe de gheață selectate pentru secvențierea Illumina (săgeți).

Pentru extracția ADN/ARN și secvențierea probelor de ADN genomic (gDNA) și a ADN complementar (cDNA) prin tehnica NGS Illumina, 15 probe de gheață de la adâncimi diferite ale carotei (Tabelul 2) au fost selectate, corespunzând unui interval de aproximativ 1000 de ani.

Tabel 2: Probele de gheață selectate pentru secvențierea Illumina

| Codul BioProbei | Adâncimea fragmentelor (cm) | Vârsta fragmentelor (ani BP) |
|-----------------|-----------------------------|------------------------------|
| SC(R) 100 | 0 - 17.5 | 92 ± 25 |
| SC(R) 400 | 167 - 204 | 430 ± 14 |
| SC(R) 700 | 417 - 493 | 703 ± 23 |
| SC(R) 1K | 670 - 715 | 1,124 ± 31 |
| SC(R) 2K | 963 - 1,003 | 1,671 ± 36 |
| SC(R) 3K | 1,190 - 1,216 | 2,671 ± 36 |
| SC(R) 4K | 1,395 - 1,422 | 3,937 ± 66 |
| SC(R) 5K | 1,606 - 1,638 | 4,991 ± 25 |
| SC(R) 6K | 1,749 - 1,768 | 6,159 ± 177 |
| SC(R) 7K | 1,808 - 1,824 | 7,382 ± 39 |
| SC(R) 9K | 2,006 - 2,037 | 8,674 ± 59 |
| SC(R) 10K | 2,187 - 2,228 | 10,002 ± 126 |
| SC(R) 11K* | 2,299 - 2,331 | 11,102 ± 114 |
| SC(R) 12K* | 2,392 - 2,417 | 12,007 ± 89 |
| SC(R) 13K* | 2,501 - 2,533 | 13,145 ± 115 |

Vârsta (valoarea medie și deviația standard) pentru fiecare probă a fost calculată în baza analizei datării cu ^{14}C (Perșoiu și colab., 2017) (Figura 7), ținând cont de intervalul de adâncime al fragmentelor de carotă de gheață. (*) reprezintă valorile extrapolate pe baza radiodatării cu ^{14}C .

Diversitatea comunităților totale și active bacteriene din probele de gheață selectate a fost determinată pe baza secvențierii Illumina a ampliconului pentru gena 16S ARN ribozomal (Tabel 3).

Tabel 3. Număr de secvențe, unitati taxonomice operationale (OTU) și indicii de diversitate pentru comunitățile bacteriene totale (gDNA) și active (cDNA).

| Sample | Subsampled Reads | OTUs | Alpha Diversity index | | | | |
|--------|------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| | | | Shannon | Chao1 | Fisher | Inv Simpson | |
| gDNA | SC100 | 149,993 | 2,227 (923-3,694) | 7.83 (7.07-8.57) | 2,842 (1,292-4,555) | 376 (144-645) | 91.01 (72.35-105.13) |
| | SC400 | 194,124 | 2,822 (2,266-3,223) | 7.22 (7.09-7.30) | 4,399 (3,627-5,065) | 472 (376-532) | 47.01 (45.39-48.16) |
| | SC700 | 217,426 | 4,047 (3,519-4,442) | 7.51 (6.92-7.88) | 5,786 (5,218-6,350) | 713 (605-780) | 44.21 (20.88-63.88) |
| | SC1K | 112,974 | 2,830 (2,109-3,867) | 7.43 (7.34-7.49) | 3,977 (3,041-5,117) | 534 (376-762) | 34.80 (26.31-42.98) |
| | SC2K | 77,590 | 1,998 (1,526-2,773) | 7.43 (6.86-7.97) | 2,560 (2,096-3,359) | 389 (255-581) | 26.24 (18.40-32.41) |
| | SC3K | 117,210 | 1,987 (731-3646) | 5.41 (4.50-6.66) | 2,987 (1,450-4,887) | 359 (108-714) | 12.80 (9.54-18.01) |
| | SC4K | 145,156 | 1,390 (724-2,468) | 3.46 (1.76-5.78) | 1,938 (1,125-3,140) | 219 (102-410) | 6.06 (1.43-14.69) |
| | SC5K | 107,304 | 2,974 (2,656-3,135) | 6.56 (6.42-6.65) | 4,449 (4,108-4,632) | 573 (532-600) | 19.67 (18.53-20.83) |
| | SC6K | 44,773 | 496 (359-691) | 3.15 (2.77-3.48) | 887 (719-793) | 80 (51-114) | 2.94 (2.67-3.21) |
| | SC7K | 132,563 | 1,938 (1,552-2,545) | 6.1 (5.79-6.55) | 2,924 (2,576-3560) | 327 (249-453) | 28.09 (24.85-32.55) |
| | SC9K | 185,112 | 2,714 (2,148-3,188) | 5.66 (5.36-5.92) | 3,872 (3,220-4,397) | 455 (355-544) | 14.36 (13.12-15.56) |
| | SC10K | 78,359 | 1,364 (473-2,555) | 5.18 (3.90-7.19) | 1,996 (999-3,238) | 251 (69-512) | 22.67 (6.15-54.12) |
| | SC11K | 90,282 | 1,009 (472-1963) | 3.76 (1.18-5.52) | 1,408 (749-2,402) | 163 (69-328) | 6.64 (1.39-10.56) |
| | SC12K | 166,300 | 2,716 (2,497-3,138) | 6.15 (5.95-6.39) | 4,394 (4,054-5,033) | 469 (413-578) | 24.35 (22.59-26.03) |
| SC13K | 193,340 | 3,424 (2,349-4,182) | 6.51 (4.98-7.36) | 4,701 (3,473-5,468) | 602 (385-762) | 25.28 (8.74-33.97) | |
| cDNA | SCR100 | 77,663 | 462 | 3.27 | 881 | 66 | 4.33 |
| | SCR400 | 119,430 | 2,008 | 5.72 | 2863 | 346 | 12.21 |
| | SCR700 | 78,801 | 444 | 3.14 | 998 | 63 | 4.37 |
| | SCR1K | 22,560 | 261 | 3.41 | 606 | 42 | 4.88 |
| | SCR2K | 23,363 | 415 | 4.19 | 699 | 73 | 5.50 |
| | SCR3K | 44,379 | 393 | 3.49 | 956 | 60 | 4.83 |
| | SCR4K | 24,510 | 585 | 4.27 | 887 | 109 | 6.21 |
| | SCR5K | 73,092 | 2,426 | 6.93 | 3346 | 488 | 17.79 |
| | SCR6K | 115,586 | 642 | 3.53 | 1113 | 90 | 4.95 |
| | SCR7K | 139,685 | 1,946 | 5.36 | 2691 | 323 | 11.04 |
| | SCR9K | 183,793 | 2,895 | 6.27 | 3798 | 493 | 20.43 |
| | SCR10K | 170,252 | 883 | 3.80 | 1423 | 123 | 5.62 |
| | SCR11K | 132,818 | 2,056 | 5.62 | 2510 | 348 | 12.41 |
| | SCR12K | 26,326 | 470 | 4.37 | 753 | 82 | 6.45 |
| SCR13K | 57,949 | 243 | 7.62 | 3451 | 520 | 35.08 | |

Secvențele identificate corespund filotipurilor bacteriene (99,18%), mai puțin de 0.45‰ reprezentând Archaea. Comunitatea bacteriană totală a cuprins 42 de filumuri, 101 clase și 554 genuri, iar pentru comunitatea bacteriană au fost identificate 29 de filumuri, 68 de clase și 334 genuri. Distribuția filurilor bacteriene în blocul de gheață este eterogenă în cazul comunității totale, marcată de prezenta dominantă a Proteobacteria și Actinobacteria (Fig. 9A), spre deosebire de comunitatea bacteriană activă care a avut o distribuție uniformă a filurilor Proteobacteria (41.2-65.6%) și Firmicutes (20.1-52.5%) (Fig. 9B), cu excepția probelor de 5000 de ani (SCR5K) dominată de Proteobacteria (71,9%).

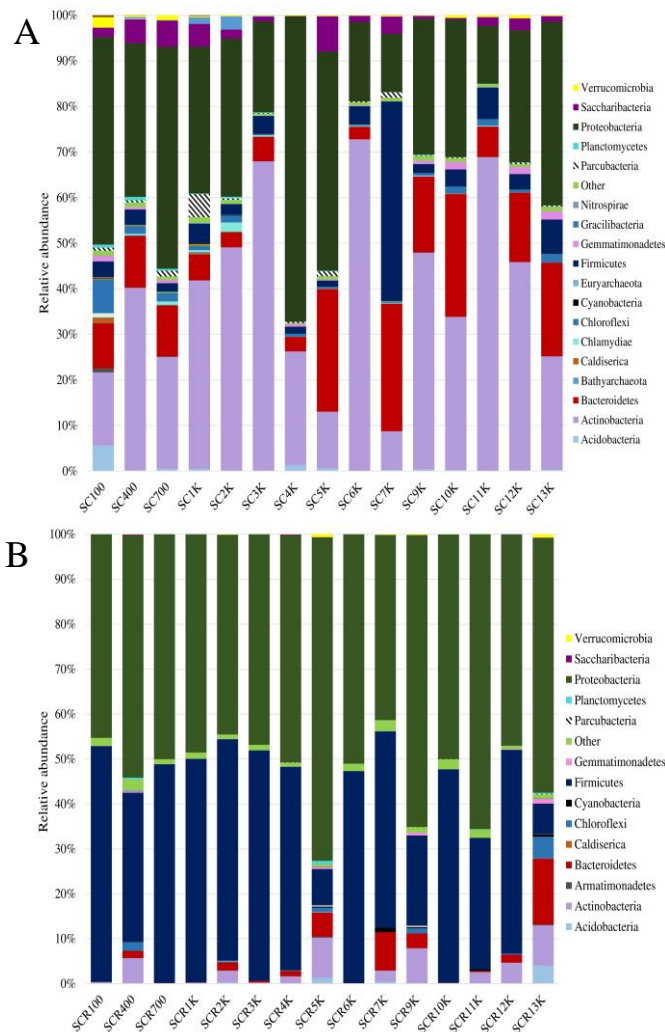


Fig. 9. Distribuția filurilor bacteriene în gheața veche de până la 13000 de ani. Abundența relativă a filurilor taxonomice pentru (A) comunitatea bacteriană totală și (B) comunitatea bacteriană activă.

La nivel de clasă (Fig. 10), carotei de gheață a fost dominat de specii de Clostridia (Firmicutes), excepție făcând probele de 5000 de ani (SCR5K) și 13000 de ani (SCR13K). Proporții relativ egale de Gammaproteobacteria (5,6-24,5%) și Betaproteobacteria (18,7-41,5%) au fost prezente în majoritatea stratelor de gheață, excepție făcând proba SCR5K unde clasa Deltaproteobacteria a avut o abundență relativă ușor crescută (12,9%), și probele SCR9K și SCR11K unde Alphaproteobacteria a avut o prezență ridicată (35%).

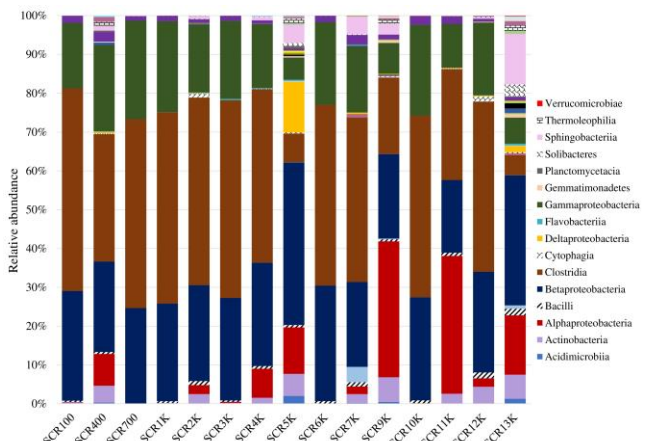


Fig. 10. Abundența relativă a încadrării taxonomice pe clase pentru comunitatea bacteriană activă, determinată în gheața perenă de până la 13000 de ani.

Genurile dominante ale comunității totale (gDNA) de microorganisme din gheața de peșteră au cuprins *Cryobacterium*, *Lysinomonas*, *Pedobacter* și *Aeromicrobium*, indicând un profil distinct față de comunitatea activă (cDNA) reprezentată de specii de *Clostridium sensu stricto*, *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Stenotrophomonas* și *Massilia*.

Comunitățile archaeene obținute în urma secvențierii NGS Illumina

Unitatile taxonomice de archaea identificate in urma secventierii genei 16S ARNr prin Illumina MiSeq a microbiomului total si activ microbiene corespund filumurilor Euryarchaeota si Bathyarchaeota (Tabel 4).

| Archaea taxonomy | gDNA | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|---------|-------|--------|--------|-------|----------|-------|----------|----------|--------|--------|----------|---------|
| | SC100 | SC400 | SC700 | SCR1K | SCR2K | SCR3K | SCR4K | SCR5K | SCR6K | SCR7K | SCR9K | SCR10K | SCR11K | SCR12K | SCR13K |
| Bathyarchaeota; uncultured archaeon | 0.00302 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanomicrobiales; Methanoregulaceae; Methanosphaerula | 0.0042 | 0.017 | 0 | 0 | 0 | 0.0030 | 0 | 0.00355 | 0 | 0.006281 | 0.002075 | 0 | 0 | 0.000209 | 0 |
| Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae; Methanosarcina | 0.02180 | 0 | 0.00145 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00548 | 0 | 0.00288 | 0 | 0 | 0 | 0.001044 | 0 |
| Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae; Methanosarcina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.000968 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; Marine group II; uncultured archaeon | 0 | 0.02140 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; Terrestrial Miscellaneous Gp (TMEG); uncultured | 0 | 0.00165 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00323 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Archaea taxonomy | cDNA | | | | | | | | | | | | | | |
| | SCR100 | SCR400 | SCR700 | SCR1K | SCR2K | SCR3K | SCR4K | SCR5K | SCR6K | SCR7K | SCR9K | SCR10K | SCR11K | SCR12K | SCR13K |
| Bathyarchaeota; uncultured archaeon | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanomicrobiales; Methanoregulaceae; Methanosphaerula | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.04437 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae; Methanosarcina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1417 | 0 | 0 | 0.29058 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00182 |
| Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae; Methanosarcina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00286 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; Marine group II; uncultured archaeon | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; Terrestrial Miscellaneous Gp (TMEG); uncultured | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabel 4. Abundența relativă a taxonilor archaeeni în blocul de gheață.

În cazul comunității microbiene totale, filumul Bathyarchaeota a fost prezent in proba SC100. Specii aparținând claselor Methanomicrobia și Thermoplasmata (Euryarchaeota) au fost identificate în mai multe strate (SC100, SC400, SC5K, SC7K, SC9K și SC12K) ale blocului de gheață. Dintre taxonii Archaea activi, filotipul Euryarchaeota a fost prezent in gheața de 2,000 (SCR2K) și 5,000 (SCR5K) ani, fiind reprezentat de genuri necultivabile de *Methanosphaerula* și *Methanosarcina* (Methanomicrobia).

Determinarea structurii comunităților fungice din blocul de gheață perenă din Peștera Scărișoara

În cadrul proiectului a fost realizat primul studiu de caracterizarea a distribuției taxonilor de funghi dintr-o peșteră de gheață perenă, bazat pe secvențierea prin tehnica Illumina a genei ITS2 (regiunea Internal Transcribed Spacer 2 a genei ARNr ribozomal) a microbiomului necultivat din gheață perenă cu o vechime de până la 2000 de ani, din Peștera Scărișoara (Mondini și colab., *in review*). Din numărul total de secvențe ITS2 determinate, 64% au corespuns la 182 OTU fungici, prezentând un grad de diversitate scăzut, în special în stratele de gheață veche, și o distribuție temporală distinctă (Fig. 11). Abundența relativă a filurilor fungice (Fig. 11A) indică Ascomycota ca fiind taxonul majoritar în probele de gheață perenă formată în ultimii 2000 de ani. Filurile Chytridiomycota și Mucoromycota sunt prezente în gheața formată recent și respectiv, în cea de 400 de ani vechime. La nivelul claselor (Fig. 11B) se observa o eterogenitate a compoziției comunităților fungice în probele analizate. Dintre cele 80 de genuri identificate (Fig. 11C), *Cryptococcus sp.* specific habitatelor glaciale a fost prezent în toate stratele de gheață perenă.

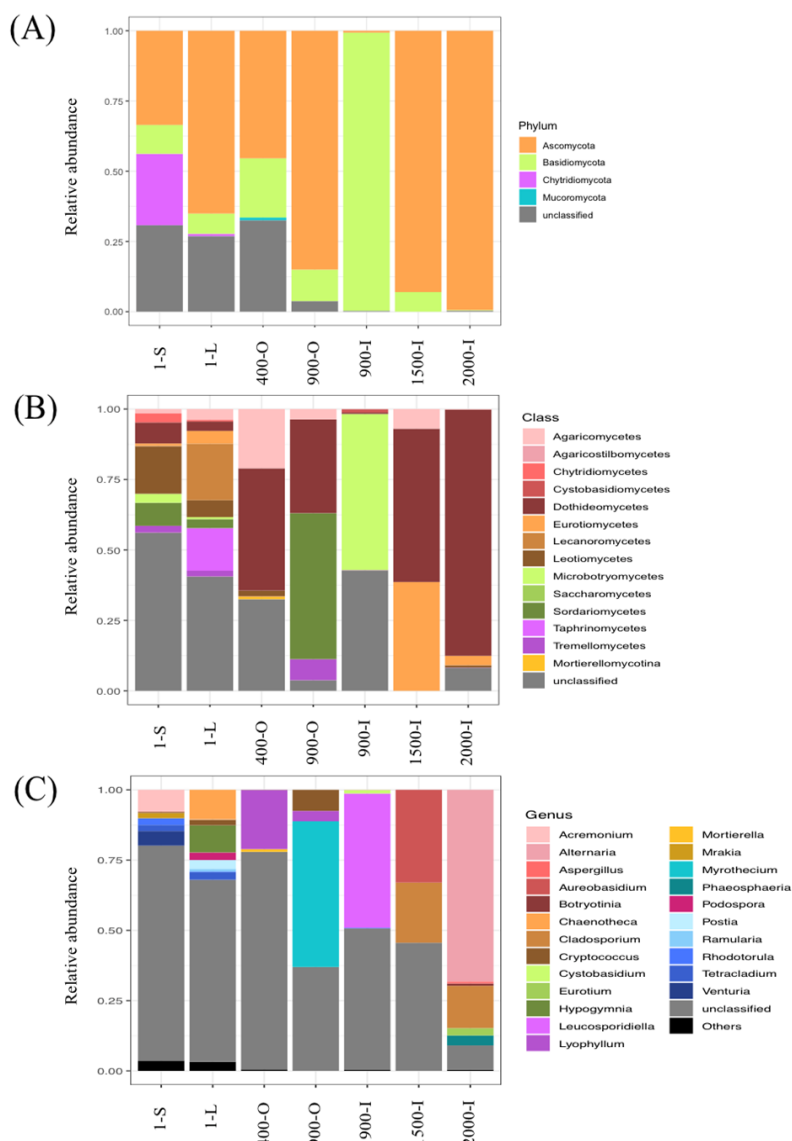


Fig. 11. Abundența relativă a Filurilor (A), Claselor (B) și (C) Genurilor fungale dominante, prezente în probele de gheață 1-S, 1-L, 400-O, 900-O, 900-I, 1500-I și 2000-I, din Peștera „Ghețarul de la Scărișoara”, determinate în baza secvențierii Illumina a genei ITS2 ARN ribozomal.

Efectul compoziției geochimice asupra comunităților de microorganisme din gheața de peșteră

Analiza PcoA a distribuția filurilor bacteriene aparținând comunităților active și totale în relație cu parametrii geochimici rezultați din analiza celor 15 probe de gheață a explicat 90,5% și respectiv 88,7% din varianțele existente pentru librariile de ADN genomic și ADN complementar (Fig. 12). În ambele situații, axele canonice RDA au fost alcătuite din câțiva parametrii geochimici co-variabili, printre care valorile de pH, DOC și DIC, și concentrațiile de Ca, Na, K, Cl, Si și Fe, cu o corelație disimilă între distribuția filurilor comunității bacteriene totale (Fig. 12A) și a comunității bacteriene active (Fig. 12B) cu chimismul substratului de gheață.

Filurile Firmicutes, Proteobacteria și Actinobacteria prezintă cele mai importante diferențe din punct de vedere al corelației dintre factorii de mediu și comunitățile active/inactive. Modificări la nivelul corelației dintre distribuția filurilor cu valorile DOC/DIC au fost observate între ambele tipuri de comunități microbiene, ceea ce sugerează că tipul de carbon (organic/anorganic) constituie unul dintre parametrii responsabili de diferența compoziției microbiene.

De exemplu, filumul Firmicutes activ prezintă o corelație negativă cu valorile DOC în timp ce se corelează pozitiv cu valorile DIC, invers față de cum a fost observat în cazul distribuției filurilor Proteobacteria și Actinobacteria. Este cunoscut faptul că mulți taxoni reprezentativi ai filurilor Firmicutes, Actinobacteria și Proteobacteria includ organisme fixatoare de azot (Boyd și Peters, 2013; Nash și colab., 2018), iar că unele specii de Firmicutes și Proteobacteria sunt capabile să fixeze CO₂ (Tabita și colab., 2017). Astfel, corelația dintre valorile carbonului anorganic și distribuția filului Firmicutes sugerează că prezența în număr mare a speciilor de *Clostridium* în fracția activă a microbiomului de peșteră ar putea avea un rol important la nivelul lanțului trofic nutritiv al mediilor reci ce au o concentrație redusă de carbon organic dizolvat (Tveit și colab., 2013), prin procese celulozo-fermentative în urma cărora rezultă CO₂, H₂, acizi organici și etanol utilizați drept substrat nutritiv de creștere pentru alte bacterii (Leschine și Canale-Parola, 1989; Alam și colab., 2006).

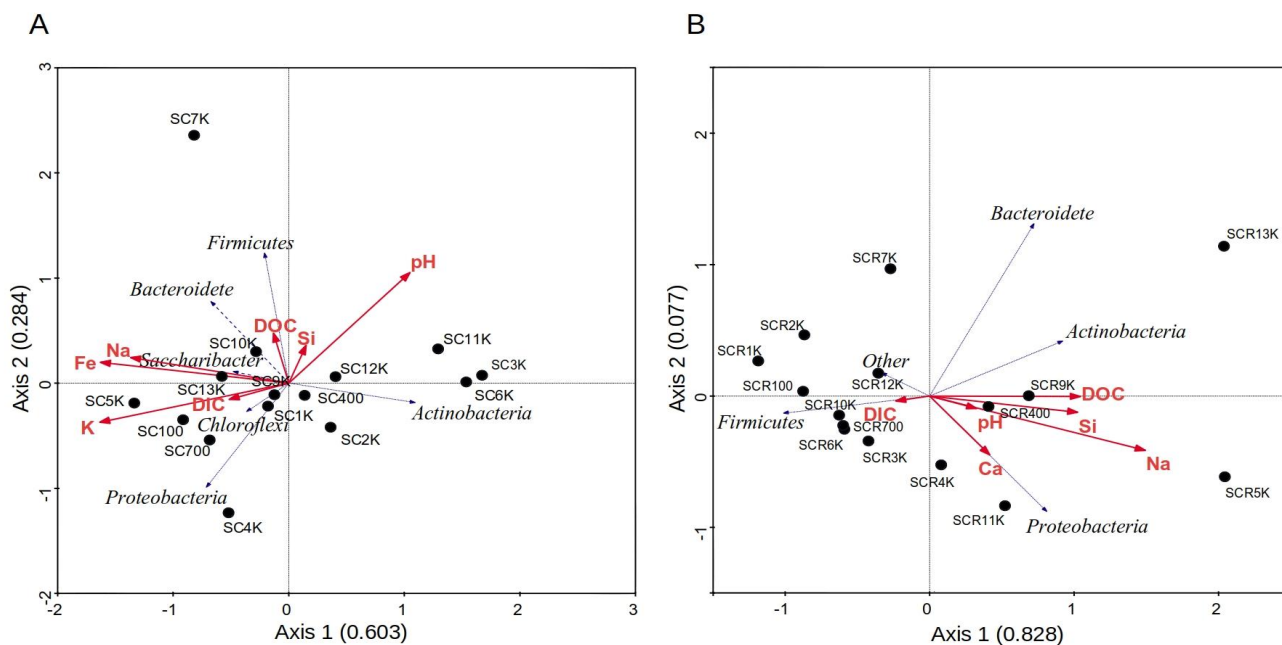


Fig. 12. Variațiile filurilor bacteriene în funcție de compoziția geochimică a ghetii. Distribuția filurilor pentru (A) comunitatea totală și (B) comunitatea activă în relație cu valorile de pH, DIC, DOC, Ca, Na, K, Fe, Si.

1.3.5. Efectul continutului de carbon organic asupra compozitiei comunitatii bacteriene din blocul de gheata al Pesterii Ghetarul Scarisoara

Analizele geochemice ale celor 15 probe din carota de gheață veche de 13000 de ani, au scos în evidență un pH ușor alcalin, cu o valoare medie de 8.45 ± 0.42 . Mai mult, carbonul organic dizolvat (DOC) și carbonul anorganic dizolvat (DIC) și concentrațiile de elemente găsite în carota de gheață (Fig. 13A) au avut valori medii similare cu cele găsite în alte peșteri de gheață (Clausen și colab., 2006; Kern și colab., 2011). Sodiu, potasiu, magneziu, sulfat și clor reprezintă componenții majori ai carotei de gheață, în timp ce mangan, fier, bor și fosfor s-au regăsit în concentrații mici (Fig. 13A). Siliciu, în general component minor al mediilor acvatice, a fost găsit în concentrații mari în toate stratele de gheață testate, precum și sodiu, potasiu, magneziu și clor. Componența în siliciu a fost în strânsă corelație cu DOC la nivelul întregii cronosecvențe (Fig. 13B), indicând proveniența de origine externă a carbonului organic.

Profilul concentrațiilor constituenților chimici la nivelul întregii cronosecvențe de gheață (Fig. 13C) a arătat o distribuție temporală ne-omogenă, fluctuațiile fiind consistente în funcție de diferiții parametri. Valori mari au fost găsite în stratele de gheață formate în cursul ultimului mileniu, suplimentar față de valoarea brusc mai mare a tuturor elementelor din gheața formată în cursul perioadei de 4500-5000 ani BP.

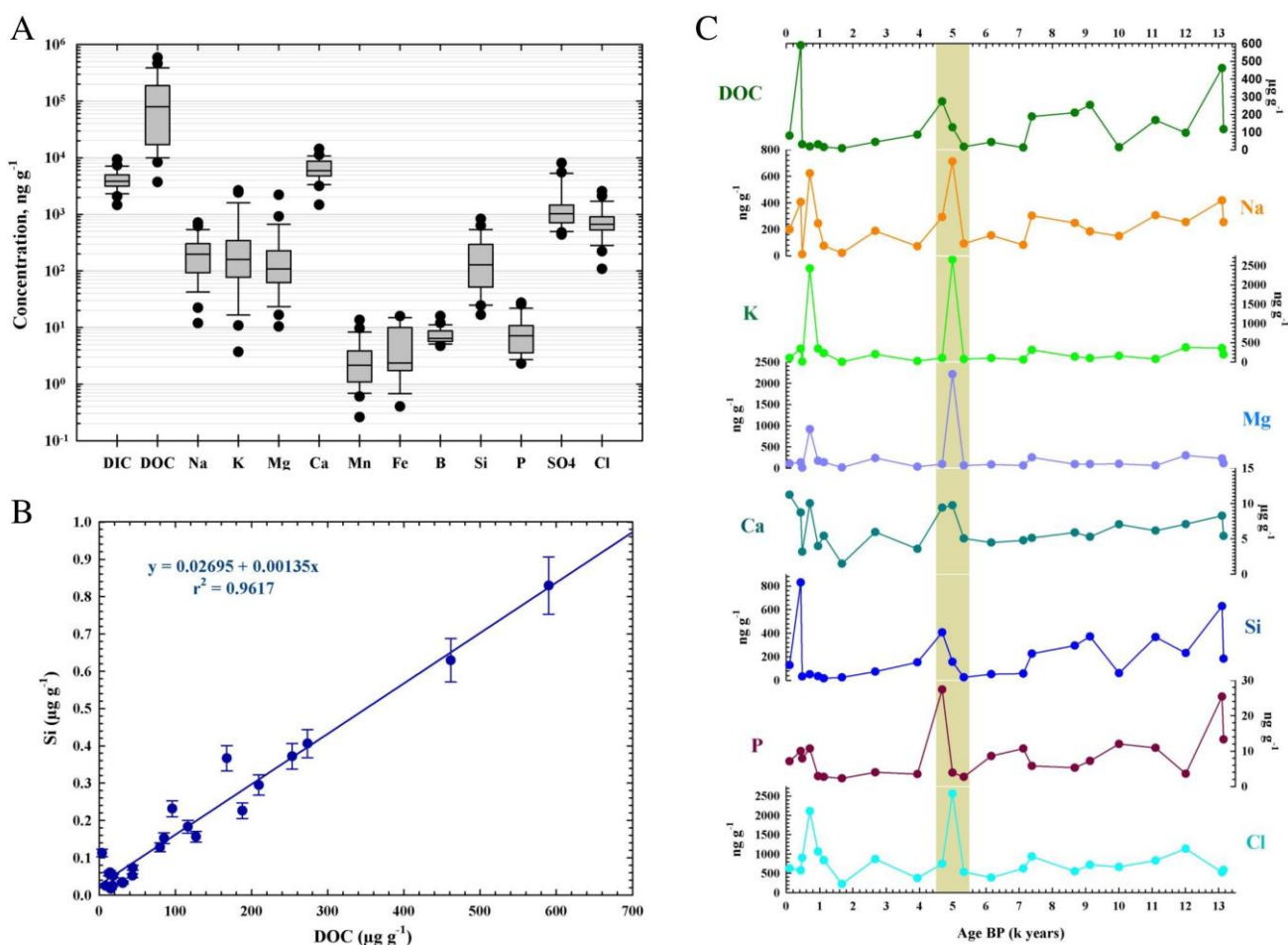


Fig. 13. Profilul geochemic al blocului de gheață din Peștera Scărișoara. (A) Concentrația (media și deviația standard) a parametrilor geochemici ai blocului de gheață, (B) Corelația dintre valorile de Si și DOC, (C) Profilul de distribuție al compușilor geochemici în carota de gheata de 13000 de ani.

Efectul variațiilor climatice corespunzătoare formării gheții asupra structurii microbiene

În cursul ultimului mileniu clima a fost variabilă, cu Perioada Caldă Medievală (MWP – Medieval Warm Period) experimentând condiții climatice în general calde și umede, în timp ce Mica Epocă Glacială (LIA – Little Ice Age) a avut condiții hidroclimatice diverse care s-au suprapus cu o perioadă în genera uscată și rece (Perșoiu și colab., 2017). Comunitățile bacteriene blocate în gheața formată recent cât și în depozitele de gheață acumulate în timpul perioadelor LIA și MWP sunt dominate de Proteobacteria, Firmicutes și respectiv, Actinobacteria. Această distribuție neuniformă ar putea fi corelată cu variațiile climatice corespunzătoare perioadelor temporale de formare a stratelor de gheață.

Ținând cont de mecanismul de formare al gheții din această peșteră, este de așteptat ca un factor important al originii microbiomului să fie solul. Filotipuri specifice de bacterii și Archaea au fost găsite în probele de gheață de 400 de ani (perioada rece și uscată din timpul LIA) și în cele de 900 de ani (perioada caldă și umedă din timpul MWP), constituind biomarkeri putativi pentru variațiile climatice ce au loc în cursul formării stratelor de gheață.

Prezența diferitelor specii metanogene aparținând genurilor *Methanosphaerula* și *Methanosarcina* la nivelul microbiomului activ, cât și a filotipurilor de Methanomicrobia găsite în depozitele de gheață de peșteră cu o vechime de 5000 cal BP ar putea explica concentrația redusă de carbon organic, aflat în corelație cu o activitate metabolică crescută.

La nivelul comunității fungice din Scărișoara, variațiile climatice corespunzătoare formării stratelor de gheață de 400 (LIA) și 900 (MWP) de ani indică o modelare a structurii acestora în funcție de temperatură și regimul de precipitații. Astfel, Ascomycota constituie filumul majoritar în probele de gheață perenă formată în ultimii 2000 de ani, dominând stratele formate în timpul Micii Epoci de Gheață (LIA – Little Ice Age) 400-O și 1500-I (75-80%), în timp ce taxoni aparținând filumului Basidiomycota dominează comunitatea fungică (90%) a probei de gheață 900-I formată în cursul Perioadei Calde Mediale – Medieval Warm Period (MWP).

CONCLUZII

Rezultatele obținute în cadrul etapei 3/2018 a proiectului CAVICE au fost **realizate conform planului de lucru**, dezvoltând toate etapele prevăzute. Acestea cuprind:

- Determinarea profilului izotopic și analiza variațiilor climatice asociate stratelor de gheață din Peștera „Ghețarul Scărișoara” au fost realizate permițând evaluarea impactului particularităților climatice asupra structurii comunităților bacteriene și fungice din acest habitat
- Colectarea probelor de gheață de vârste până la 13.000 de ani prin carotare verticală a blocului de gheață în Sala Mare din cadrul Peșterii „Ghețarul de la Scărișoara” a dus la obținerea a 97 de fragmente de carotă de gheață, de diferite dimensiuni.
- Vârsta carotei de gheață a fost determinată pe baza analizei ^{14}C AMS a 26 de probe intermediare. Profilul vârstă-adâncime a fost construit cu ajutorul modelului Bayesian pentru probele de 0 – 22,5 m adâncime și prin extrapolare lineară pentru probele până la adâncimea de 25,33 m.
- Diversitatea comunităților bacteriene totale și active din probele de gheață cu vârste de până la 13000 ani a fost determinată prin secvențiere Illumina a genei 16S ARNr, indicând o comunitate complexă atât la nivel structural cât și funcțional. Prezența taxonilor aparținând comunităților de autotrofi și heterotrofilor demonstrează că acest tip de habitat este capabil să suporte diverse procese metabolice, conducând la formarea unui microbiom unic.
- Profilul microbial din blocul de gheață a arătat o distribuție eterogenă a filumurilor bacteriene în cazul comunității totale, dominate de Proteobacteria și Actinobacteria, spre deosebire de comunitatea bacteriană activă dominată de Proteobacteria și Firmicutes într-o distribuție relativ omogenă.

- Modificari importante in structura microbiana activa la nivelul ghetii formate in urma cu 5000 de ani indica un eveniment climatic major favorizand dezvoltarea bacteriilor fototrofe anoxice si speciilor apartinand claselor α/β -Proteobacteria și Bacteroidetes.
- Parametrii geochemici ai gheții joacă un rol important in modelarea compoziția microbiomului (bacterii, archaea si fungi) din Peștera Scărișoara.
- Concentrația de carbon organic din gheață a avut un impact major în procesele depozitionale și post-depozitionale ale comunității bacteriene active.
- Corelarea compozitiei microbiene cu particularitatile climatice din timpul formarii stratelor de gheata indica potentiali markeri climatici la nivelul bacteriilor, archeelor si fungilor, considerand distribuția preferențială a filumurilor în functie de perioadele climatice corespunzatoare. Astfel, perioadele calde și umede (MWP – Medieval Warm Period) indică favorizarea prezenței taxonilor aparținând Actinobacteria, Euryarchaeota, Ascomycota, iar perioadele reci și uscate (LIA – Little Ice Age) favorizează prezența filumurilor Firmicutes, Crenarchaeota, Basidiomycota.
- 63 de tulpini bacteriene provenind din carota de gheață cu o vechime de pana la 13000 de ani au fost izolate și caracterizate taxonomic
- Identificarea a 12 tulpini bacteriene izolate din gheața de peșteră capabile de sinteza de nanoparticule de aur și în condiții diferite de temperatură.
- Investigarea rezistenței la antibiotice a tulpinilor izolate din gheata de peștera utilizând o formă modificată a metodei disc difuzimetrică indică rezistență microbiana la o paletă largă (20) de antibiotice si multirezistență a unor specii bacteriene psihrofile si psihrotolerante izolate din gheața de peștera cu vârste de până la 13000 de ani.
- Cu toate că încă nu se cunoaște activitatea patogenică a tulpinilor izolate, determinarea susceptibilității la antibiotice a acestora ar putea fii un pas important, în contextul schimbărilor climatice, din cauza topirii accentuate a carotelor de gheață și a ghețarilor, toate aceste tulpini bacteriene existente în gheață ar putea într-o zi să reintre în ciclul biogeochimic al planetei cu posibilitatea de a influența activitatea umană și animală.

WEB SITE: <http://www.ibiol.ro/proiecte/Cavice/index.htm>

Bibliografie

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am.J.Clin.Pathol.* 45(4):493-6.

Perșoiu A, Onac BP, Wynn JG, Blaauw M, Ionita M, Hansson M. (2017). Holocene winter climate variability in Central and Eastern Europe. *Sci.Rep.* 7:1. doi: 10.1038/s41598-017-01397-w

Boyd ES, și Peters JW. (2013). New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Front.Microbiol.* 4:201. doi: 10.3389/fmicb.2013.00201

Nash MV, Anesio AM, Barker G, Tranter M, Varliero G, Eloie-Fadrosch EA, et al. (2018). Metagenomic insights into diazotrophic communities across Arctic glacier forefields. *FEMS Microbiol.Ecol.* 94:9. doi: 10.1093/femsec/fiy114

Tabita FR, Hanson TE, Li H, Satagopan S, Singh J, Chan S. (2007). Function, structure, and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 71:4. doi: 10.1128/MMBR.00015-07

Tveit A, Schwacke R, Svenning MM, Urich T. (2012). Organic carbon transformations in high-Arctic peat soils: key functions and microorganisms. *ISME J.* 7:2. doi: 10.1038/ismej.2012.99

Leschine SB, și Canale-Parola E. (1989). Carbon cycling by cellulose-fermenting nitrogen-fixing bacteria. *Adv.Space Res.* 9:8. doi: 10.1016/0273-1177(89)90039-2

Alam SI, Dixit A, Reddy GSN, Dube S, Palit M, Shivaji S, et al. (2006). *Clostridium schirmacherense* sp. nov., an obligately anaerobic, proteolytic, psychrophilic bacterium isolated from lake sediment of Schirmacher Oasis, Antarctica. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 56:4. doi: 10.1099/ijs.0.63808-0

Clausen HB, Vrana K, Bo Hansen S, Larsen LB, Baker J, Siggaard-Andersen ML, et al. (2006). Continental ice body in Dobšiná Ice Cave (Slovakia). Part II. Results of chemical and isotopic study. *Proceedings of the 2nd International Workshop on Ice Caves, Demänovská Dolina.* 3, 29-37.

Kern Z, Széles E, Horvatinčić N, Fórizs I, Bočić N, Nagy B. (2011). Geochemical investigations of the ice deposit of Vukušić Ice Cave, Velebit Mountain, Croatia. *The Cryosphere.* 5, 485-494.

Feurdean A, Perșoiu A, Tanțău I, Stevens T, Markovic Magyari EK, et al. (2014). Climate variability and associated vegetation response throughout Central and Eastern Europe (CEE) between 8 and 60 kyrs ago. *Quat.Sci.Rev.* 106, 206-224. doi: 10.1016/j.quascirev.2014.06.003

PUBLICAȚII 2018

Capitol de carte

1. Perșoiu, A., Onac, B.P. 2018. Ice caves in Romania. In Ponta, G.M.L., Onac, B.P. (eds.), *Cave and Karst Systems of Romania*, Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90747-5_52

Articole ISI

1. Iancu, L., Junkins, E.N., Necula-Petrăreanu, G., Purcărea, C. 2018. "Characterizing forensically important insect and microbial community colonization patterns in buried remains". *Scientific Reports*, doi: 10.1038/s41598-018-33794-0. IF 4.122
2. Iancu L., Dean D. E., Purcărea, C. 2018. "Temperature Influence on Prevailing Necrophagous Diptera and Bacterial Taxa With Forensic Implications for Postmortem Interval Estimation: A Review". *Journal of Medical Entomology*, doi: 10.1093/jme/tjy136. IF 1.968
3. Iancu, L., Junkins, E.N., Purcărea, C. 2018. "Characterization and microbial analysis of first recorded observation of *Conicera similis* Haliday (Diptera: Phoridae) in forensic decomposition study in Romania". *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 58:50-55. doi: 10.1016/j.jflm.2018.04.01. IF 1.103
4. Ițcuș, C., Pascu, M.D., Lavin, P., Perșoiu, A., Iancu, L., Purcărea, C. 2018. "Bacterial and archaeal community structures in perennial cave ice". *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/s41598-018-34106-2. IF 4.122
5. Brad T., Ițcuș, C., Pascu, M.D., Perșoiu, A., Hillebrand-Voiculescu, A., Iancu, L., Purcărea, C. 2018. "Fungi in perennial ice from Scărișoara Ice Cave (Romania)". *Scientific Reports*, 8(1): 10096. DOI: 10.1038/s41598-018-28401-1. IF 4.122
6. Kern, Z., Kele, S., Perșoiu, A., Fórizs, I., Bernasconi, S. (2018) "Clumped isotope analysis of fine-grained cryogenic cave carbonates (Scarisoara Ice Cave, Romania)". *Acta Carsologica. in press.* IF 0.959
7. Bădăluță, C.A., Ioniță, M., Dima, D., Perșoiu, A., Rădoane, M., Bădăluță, G. "Hydrometeorological extremes and social vulnerability in the eastern part of Europe over the last 500 years". *Nature communications. in review.* IF 12.353
8. Perșoiu A., Ioniță M., Weiss H. "Blocking induced by the strengthened Siberian High led to drying in the Middle East during the 4.2 ka event – a hypothesis". *Climate of the Past. in review.* IF 3.174
9. Păun, V.I., Icaza, G., Lavin, P.S., Marin, C., Tudorache, A., Perșoiu, A., Dorador, C., Purcărea, C. "Active bacteria from a Late Glacial through Holocene ice core from Scarisoara Ice Cave, Romania". *Front. Microbiol. - Extreme Microbiology. in review.* IF 4.019

10. Mondini A., Donhauser J., Ițcuș C., Marin C., Perșoiu A., Frey B., Purcărea C. "High-throughput sequencing of fungal communities across the perennial ice block of Scarisoara Ice Cave". *Annals of Glaciology. in review.* IF 2.761
11. Bădăluță, C.A., Perșoiu, A., Ionita, M., Piotrowska, M. "Summer signal variability over the last millennium using an ice cave in East – Central Europe". *Climate of the Past. in prep.* IF 3.174
12. Sekul PA, Lavin P, Munoz P, Severino E, Hengst M, Purcarea C, Dorador C. Exploring a cold landscape: Microbial diversity associated to Patagonian Grey Glacier, Chile. *Frontiers in Microbiology. in prep.* IF 4.019
13. Lavin P, Sekul PA, Munoz P, Severino E, Paun VI, Chifiriuc C, Purcarea C, Dorador C. Inhibition of multi-drug resistant bacteria and gold nanoparticle synthesis for biotechnological applications by bacterial strains isolated from Grey Glacier (Patagonia - Chile). *Extremophiles. in prep.* IF 2.000

CONFERINȚE (8 prezentări orale, 10 postere):

International Symposium on Cryosphere and Biosphere 2018, Kyoto, Japonia, 14-19 martie 2018

- Purcărea C, Ițcuș C, Paun VI, Marin C, Perșoiu A, Hillebrand-Voiculescu A, Brad T, Badaluta C, Lavin P. - „*Cave ice microbiome*”. Poster

European Geosciences Union General Assembly 2018, Vienna, Austria, 8-13 aprilie, 2018.

- Bădăluță, C.A., Ioniță, M., Perșoiu, A., Bădăluță, G. – “*Historical climatology in Eastern Europe during the Little Ice Age*”. Poster

International Workshop on Ice Caves IWIC-8, Potes, Spania, 09-18 iunie 2018

- Purcărea C, Ițcuș C, Păun VI, Marin C, Perșoiu A, Brad T, Bădăluță C, Icaza G, Dorador C, Lavin P, Donhauser J, Frey B. – “*Searching for microbial biomarkers for past climate changes in Scărisoara Ice Cave*”. Prezentare orală
- Perșoiu, A. - „*Climate proxies in ice caves – a review*”. Prezentare orală
- Bădăluță, A., Perșoiu, A., Ioniță, M., Piotrowska, N. - „*Summer climate changes during the last 1000 years as seen in cave ice*”. Prezentare orală
- Kern, Z., Perșoiu, A. - „*Ice core drilling in cave environment. Challenges and achievements over the past 70 years*”. Poster

POLAR2018 “Where the Poles come together” SCAR/IASC Open Science Conference, Davos, Elvetia, 19-23 iunie 2018

- Purcărea C, Ițcuș C, Marin C, Hong SG, Paun VI, Perșoiu A, Brad T, Lavin P, Hillebrand-Voiculescu A, Pascu D, Coman C, Tusa I, Sidoroff ME. – “*Ice microbiome: from Antarctic glaciers to Alpine ice caves*”. Prezentare orală
- Ițcuș C, Marin C, Hong SG, Lavin P, Coman C, Tusa I, Sidoroff ME, Purcărea C. - “*Bacterial community structure in glacier ice and subglacial streams from King George Island, Antarctica*”. Poster
- Paun VI, Ițcuș C, Marin C, Perșoiu A, Lavin P, Hillebrand-Voiculescu A, Mondini A, Badaluta C, Dorador C, Purcărea C. – “*Chronosequence of active bacterial community from an alpine ice cave*”. Poster

Fluvial Archives Group Biannual Meeting, Liège, Belgium, 2-7 septembrie, 2018

- Perșoiu, A., Perșoiu, I., - “*Flood events in Transylvania during the Medieval Warm Period and the Little Ice Age*”. Poster

Biospeleology and Theoretical And Applied Karstology Symposium, Băile Herculane, România, 27-30 Septembrie 2018

- Păun VI, Icaza G, Lavin P, Perșoiu A, Iancu L, Marin C, Bădăluță C, Mondini A, Hillebrand-Voiculescu A, Haidău C, Dorador C, Purcărea C. – “*Bacterial diversity in 13,000 years old ice from Scărișoara Ice Cave*”. Prezentare orală
- Marin C, Păun VI, Tudorache A, Icaza G, Lavin P, Perșoiu A, Iancu L, Dorador C, Purcărea C. – “*Geochemistry of the Scărișoara ice block chronosequence*”. Prezentare orală

3rd SISAL workshop, Agadir, Morocco, 8-12 octombrie, 2018

- Scropton, N., Kern, Z., Sekhon, N., Sifeddine, A., Bernal, J.P., Perșoiu, A., - “*Medieval Climate Anomaly and the Little Ice Age as reflected by speleothems*”. Prezentare orală

XXIV Latinoamerican Congress of Microbiology, Santiago de Chile, Chile, 13-16 noiembrie 2018

- Paun VI, Icus C, Marin C, Persoiu A, Lavin P, Brad T, Icaza G, Dorador C, Mondini A, Donhauser J, Frey B, Purcarea C. - “*Microbiome from Late Glacial perennial ice of Scarisoara ice cave*”. Prezentare orală
- Lavin P, Aran SP, Icaza G, Munoz P, Severino E, Garcia J, Molina V, Icus C, Paun I, Chifiriuc C, Purcarea C, Dorador C. - “*Microbial diversity of Grey Glaciator system (Patagonia, Chile): high biotechnological potential regarding antimicrobial and nanoparticles synthesis*”. Poster

The 10th International Zoological Congress of "Grigore Antipa" Museum, Academia Română, București, 21-24 Noiembrie 2018

- Lavinia Iancu, Emily Junkins, Cristina Purcărea – “*New record of Conicera similis haliday (Diptera: Phoridae) in Romania and microbiome characterization*”. Poster

A 58-a Sesiune Anuală de Comunicări Științifice a Institutului de Biologie București, 12 decembrie 2018, Institutul de Biologie, București

- Paun VI., Icaza G., Lavin P., Marin C., Icus C., Mondini A., Hillebrand-Voiculescu A., Haidau C., Badaluta C., Persoiu A., Iancu L., Dorador C., Purcarea C. – “*Ice microbiome and active bacterial communities from Scarisoara Cave*” . Poster
- Lavinia Iancu, Emily Junkins, Georgiana Necula-Petrăreanu, Ioana Păun, Antonio Mondini, Cristina Purcărea. – “*Qualitative and quantitative analysis of buried rat and associated-insects microbiome*”. Poster

REUNIUNE FINALA CAVICE

13.11.2018 - 16.11.2018 - Reuniune de lucru a coordonatorilor partenerilor CAVICE - IBB (Romania), UoB (Norvegia), UA (Chile), CONICET (Argentina) pentru analiza rezultatelor si aplicatii viitoare pentru proiecte in colaborare - Santiago, Chile

VIZITE DE LUCRU:

20.06.2018 – 23.08.2018 – vizită de lucru a Dr. Paris Lavin (partener – Universitatea din Antofagasta, Chile) la Institutul de Biologie București (RO-IBB) pentru efectuarea unor studii de microscopie SEM si a activitatii antimicrobiene si rezistenta la antibiotic ale tulpinilor isolate din ghetarul Grey (Chie) cu activitate de biosinteza de nanoparticule de aur.

PROMOVARE PROIECT

<https://youtu.be/1ZlihofcITg>

APLICATIE PROIECT INTERNATIONAL IN COLABORARE

Aplicatie proiect colaborativ de cercetare EEA coordonat de Cristina Purcarea (IBB) in colaborare cu partenerului UoB al proiectului CAVICE. *Titlu: Ice cave microbiome: searching for novel antimicrobial and anticancer bioactive compounds for overcoming drug resistance (ICEMAN)*. EEA-RO-NO-2018-0172