

Biodiversitate și distribuție cronologică a microorganismelor în straturile de gheață perenă din ghețarul Scărișoara (România)

RAPORT ȘTIINȚIFIC SINTETIC AL PROIECTULUI (2012-2016)

În contextul investigării microcosmosului habitatelor glaciale, acest studiu de pionierat reprezintă prima cercetare pe plan internațional a diversității microbiomului din gheața de peșteră. Proiectul a urmărit identificarea și caracterizarea diversității structurale și funcționale a comunităților microbiene din blocul de gheață perenă din peștera Ghețarul Scărișoara în vederea determinării cronosecvenței microorganismelor procariote și eucariote și identificării unor biomarkeri microbieni pentru variațiile climatice din acest habitat.

Obiectivele realizate în proiect au cuprins **(1)** prelevarea probelor de gheață cu vârste diferite între 1 și 2000 de ani, având un conținut variabil în sediment organic și provenind din locații expuse la lumină sau întuneric; **(2)** analiza (fizico)chimică a probelor de gheață; **(3)** cultivarea microorganismelor procariote (bacterii fototrofe și heterotrofe) și eucariote (funghi și alge) din probele de gheață în medii lichide și solide la diferite temperaturi; **(4)** cuantificarea microorganismelor cultivate și necultivate din blocul de gheață și a viabilității acestora; **(5)** analize microscopice de epifluorescență și microscopie electronică de baleiaj (SEM); **(6)** caracterizarea diversității funcționale a comunității microbiene cultivate din gheața cu vârste de până la 900 de ani prin analiză BIOLOG EcoPlates; **(7)** determinarea diversității structurale a comunităților bacteriene heterotrofe și fototrofe cultivate și necultivate și a comunităților fungice prin secvențializarea ampliconilor 16S/18S rezultati în urma construcției de bănci de gene plasmidiale și analizei PCR-DDGE; **(8)** evidențierea diversității archaeene în gheața cu vârste de 400 și 900 de ani; **(9)** studiul fixării azotului în condiții de lumină și întuneric de către microorganismele fototrofe (cianobacterii și alge) din gheața; **(10)** izolarea și identificarea unor tulpini bacteriene criotolerante și criofile din blocul de gheață de 1, 400, 900, 1500 și 2000 de ani; **(11)** evidențierea impactului compoziției geochimice asupra distribuției microbiene în blocul de gheață și corelarea acesteia cu particularitățile palaeoclimatice.; **(12)** identificarea unor potențiali biomarkeri microbieni pentru variațiile climatice în acest habitat.

În cadrul proiectului s-au efectuat 7 deplasări pe teren pentru prelevarea probelor de gheață din Sala Mare și Rezervația Mică a peșterii Scărișoara în perioada 2012-2015. Probele au fost prelevate în condiții aseptice prin carotare verticală și orizontală, utilizând carotier manual și electric. Probele de gheață analizate 1-S, 1-L, 400-O, 900-O, 900-I, 1500-I, 2000-I au provenit din strate cu vârste diferite între 1 și 2000 de ani ale stratelor de gheață, expunere la soare (S) sau lumina indirectă (L) și având conținut ridicat (O) sau scăzut (I) de sediment organic.

Metodologia utilizată a cuprins o paleta largă de tehnici de microbiologie clasică (cultivare în medii lichide și solide, citometrie de flux, BIOLOG EcoPLates) și moleculară (PCR, ARDRA, DGGE, construcție de bănci de gene prin clonare, secvențializare Sanger, pirosecvențializare 454), instrumentală (microscopie de epifluorescență și electronică de baleiaj), analize geochimice (pH, EC, conținut de carbon și azot, conținut de anioni și cationi), analize bioinformatică (Qiime, Blast, CodonCode Aligner, BioEdit), filogenetice (ClustalW, Gblocks și PhyML aLRT) și statistice (PCA).

Principalele **rezultate** constau în:

- Evidențierea comunităților de microorganisme procariote (bacterii și archaea) și eucariote (totale și fungi) în blocul de gheață perenă și în stalagmite de gheață din peștera Scărișoara. Densitate comunităților microbiene este de ordinul 10^4 - 10^5 celule ml^{-1} având o viabilitate de 59-78%. Diversitatea microbiană din stratele de gheață cu vârste de până la 900 de ani a fost evidențiată prin metoda PCR-DGGE a ampliconilor 16S/18S ARNr/
- Obținerea unei bănci de gene 16S ARNr (182 de clone) reprezentând bacterii psihrotolerante din proba 900-O cultivate la 15°C în mediul LB.
- Pirosecvențializarea 454 a ampliconilor 16S ARNr din blocul de gheață a indicat prezența archaeelor metanogene și metanotrofe în stratele de gheață cu vârste de 400 și 900 de ani.
- Obținerea de colonii bacteriene și fungice cu densitate celulară de 10^2 - 10^4 CFU ml^{-1} din probele de gheață de până la 2000 de ani și evidențierea scăderii exponențiale a conținutului microbian cultivabil cu vârsta gheții.
- Structura comunităților de bacterii heterotrofe, cianobacterii și fungi cultivate la 4°C și 15°C în diferite medii (R2B, LB, LBG, BG11, BG0, T1, T2) a fost determinată prin

PCR-DGGE și secvențializarea ampliconilor 16S ADNr, conducând la identificarea a 77 filotipuri bacteriene, 16 cianobacterii și 31 fungi.

- Filotipurile bacteriene dominante din probele cultivate aparțin filumurilor *Proteobacteria* (clasele β - și γ -*Proteobacteria*), *Bacteroidetes*, *Firmicutes* și *Actinobacteria*. Distribuția acestora în blocul de gheață perenă indică o abundență relativă distinctă în funcție de vârsta gheții și conservarea unor tulpini bacteriene *Pseudomonas* și *Paenibacillus* în stratele de gheață de vârste diferite.
- Speciile identificate în blocul de gheață din Scărișoara sunt omoloage în marea lor majoritate cu tulpini bacteriene provenind din habitate polare sau alpine, precum și din peșteri calcaroase sau în rocă vulcanică.
- Dominanța bacteriilor fototrofe aparținând filumurilor *Cyanobacteria* și *Chlorobi* în gheața recentă și *Chloroflexi* în stratele cu vârste de 400 și 900 de ani. Prezența fototrofilor cultivabili a fost identificată doar în cazul straturilor de gheață recentă 1-S și 1-L, având activitate metabolică variabilă în funcție de regimul de lumină/întuneric.
- Investigarea diversității funcționale prin metoda BIOLOG EcoPlates a relevat un indice de diversitate Shannon-Weaver ridicat în cazul probelor cu conținut organic ridicat 1-S și 400-O și dependența acestora de caracteristicile (fizico)chimice ale gheții, respective de conținutul de carbon organic (TOC) și anorganic (IC) și de conținutul de azot (TN) în cazul microbiotei din probele de gheață de 1 și 400 de ani, și de valorile de pH ale gheții pentru probele de 900 de ani.
- 14 tulpini bacteriene dominante obținute în urma cultivării la 4°C și 15°C pe mediul R2A provenind din probele de gheață analizate cu vârste de 1, 400, 900, 1500 și 2000 de ani identificate pe baza particularităților taxonomice corespund speciilor de *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Pedobacter*, *Janthinobacterium* și *Flavobacterium*.
- Prezența în gheața de 900 de ani a tulpinii bacteriene *Rahnella* sp., endofitică pentru *Picea abies* corespunzătoare vegetației dominante la suprafața peșterii în perioada MPW, sugerează potențialul sau de biomarker climatic pentru acest habitat. De asemenea, tulpina bacteriană SM15.400-O.62 [KJ454424] din gheața de 400 de ani corespunzătoare unei clone bacteriene identificate într-o peșteră de lavă poate constitui un marker microbial pentru habitatele de peșteră.

Ansamblul rezultatelor obținute au facut obiectul a **6 articole publicate, 5** în reviste cotate ISI (IF = 0.542, 1.212, 1.953, 2.140, 1.656) si 1 articol într-o revistă B+, precum și **1 articol în evaluare** la revista *Acta Carsologica* (ISI). De asemenea, **3 articole sunt in curs de redactare** pentru publicare în reviste ISI (*Cryosphere, Int. J. Speleol, PLOS ONE*) și **două capitole de carte** pentru volumul “Ice Caves” (Elsevier).

Rezultatele proiectului au fost diseminate în cadrul a 14 conferințe internaționale și 6 naționale prin **11 prezentări orale și 13 postere prezentate la conferințe internaționale și 8 prezentări orale și 1 poster prezentate la simpozioane naționale.**

Secvențele nucleotidice ale ampliconilor 16S ARNr ai comunităților bacteriene cultivate și necultivate din blocul de gheață de 1, 400 și 900 de ani obținute prin analiză DGGE și pirosecvențializare 454 au fost depuse in **banca de gene GenBank.**

Dr. Cristina Purcarea
Director de proiect

