

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

TEZA DE DOCTORAT

Rezumat

Coordonator Științific

Prof. Dr. Horia Leonard BANCIU

Student doctorand

Diana Felicia PANAIT

CLUJ-NAPOCA

2025

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

TEZĂ DE DOCTORAT

Rezumat

Diversitatea și rolurile potențiale ale comunităților procariote în ecosistemele peșterilor din România

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Horia Leonard BANCIU

PhD student

Diana Felicia PANAIT

CLUJ-NAPOCA

2025

Cuprins

Prefață	4
Schița tezei.....	5
Capitol I: Diversitatea și toleranța la îngheț a bacteriilor cultivabile asociate cu sedimente din peșterile României.....	6
Capitol II: Profilarea fiziologică la nivel comunitar a metabolizării substratelor de carbon de către comunitățile microbiene asociate cu sedimentele și apa din peșteri.....	7
Capitol III: Diversitatea, distribuția și preferințele pentru substraturi organice ale comunităților microbiene dintr-o peșteră cu activitate antropică redusă din nord-vestul României	8
Capitol IV: Diversitatea taxonomică și abundența comunităților microbiene din sedimentele bogate în sulfur ale Peșterii Movile.....	9
Capitol V: Concluzii generale, perspective și originalitate	10
Lista publicațiilor incluse în teză ca și capitole	11

Prefață

Teza doctorală de față reprezintă rezultatul a cinci ani (2018-2023) de cercetare desfășurată în cadrul Departamentului de Biologie Moleculară și Biotehnologie al Facultății de Biologie și Geologie, Universitatea Babeș-Bolyai (Cluj-Napoca, România), sub îndrumarea riguroasă a Prof. Dr. Habil. Horia Leonard Banciu.

Această cercetare oferă o imagine de ansamblu asupra diversității și funcțiilor comunităților bacteriene asociate cu sedimente uscate și umede dintr-un număr selectat de peșteri din România, incluzând atât peșteri pristine sau cu impact antropic redus, cât și peșteri turistice. Studiul se concentrează pe întrebări esențiale privind comunitățile microbiene, predominant bacteriene – precum taxonomia, diversitatea (funcțională), adaptările la nișe specifice și conectivitatea acestora – pentru a înțelege mai bine rolurile lor în rețelele trofice din peșteri, utilizând o gamă variată de metode pentru a obține aceste informații.

Această lucrare a fost susținută printr-un grant al Ministerului Cercetării, Inovării și Digitalizării, CNCS/CCCDI – UEFISCDI, proiectul DARKFOOD (numărul 2/2019), în cadrul PNCDI III (Director de proiect: CSI Dr. Oana Teodora Moldova, Institutul de Speologie „Emil Racoviță”, Departamentul Cluj-Napoca, Cluj-Napoca, România).

Finanțarea cercetării doctorale a inclus, de asemenea, bursa doctorală și o bursă de cercetare acordată prin proiectul POCU/380/6/13/123886 „Antreprenariat pentru inovare prin cercetare doctorală și postdoctorală”.

Schița tezei

Peșterile sunt habitate caracterizate de condiții limitative, precum disponibilitatea redusă a nutrienților, temperatura scăzută și absența luminii. Ecosistemele terestre din peșteri sunt populate de microorganisme diverse, care îndeplinesc roluri ecologice esențiale. Principalii locuitori ai acestor ecosisteme sunt comunitățile bacteriene, iar investigarea acestora oferă informații valoroase despre mecanismele de adaptare (de exemplu, strategii adaptative la temperaturi scăzute și disponibilitate redusă a nutrienților), capacitățile metabolice și funcțiile ecologice ale bacteriilor care prosperă în aceste medii extreme (Tomczyk-Żak și Zielenkiewicz, 2016).

Obiectivul general al acestei teze este explorarea și elucidarea diversității, funcționalității și implicării comunităților procariote în lanțurile trofice din peșterile României.

Această teză doctorală își propune:

- i. Investigarea diversității bacteriene în zone pristinе/neturistice din șase peșteri din România, utilizând atât tehnici dependente de cultură, cât și independente de cultură;
- ii. Evaluarea adaptabilității la frig și a viabilității bacteriilor izolate din sedimentele peșterilor;
- iii. Analizarea capacității comunităților microbiene din peșteri de a metaboliza diferiți nutrienți organici, utilizând tehnici de profilare fiziologică la nivel comunitar.

Capitol I: Diversitatea și toleranța la îngheț a bacteriilor cultivabile asociate cu sedimente din peșterile României

Habitatele oligotrofe din peșteri susțin comunități microbiene esențiale în lanțurile trofice subterane (Epure et al., 2012). Acestea sunt implicate în oxidarea sulfului (Yun et al., 2018), manganului (Rossi, 2010), metanului (Cheng et al., 2022) și în formarea depunerilor moonmilk (Sanchez-Moral, 2012). Deși bacteriile din medii reci au fost studiate, cele izolate direct din peșteri și adaptările lor la temperaturi extreme rămân insuficient explorate (Engel, 2010; Ruiz-Blas et al., 2023).

Acest capitol analizează diversitatea bacteriană cultivabilă din sedimentele peșterilor Cloșani, Ferice, Leșu, Muierilor, Movile și Urșilor, precum și viabilitatea bacteriilor după aproape trei ani de îngheț. Rezultatele indică o frecvență ridicată a speciilor din genurile *Pseudomonas* și *Bacillus*, sugerând un rol activ în ciclurile nutriționale subterane. Speciile din ordinul *Bacillales* (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*) s-au dovedit rezistente la îngheț datorită sporilor, în timp ce speciile din *Sphingomonadales*, *Pseudomonadales* și *Burkholderiales* au fost mai abundente în probele proaspete, sugerând fie o sensibilitate la îngheț, fie o prezență natural mai mare în sedimente recente.

Congelarea a redus numărul de izolate cultivabile, mai ales în peșterile Cloșani, Ferice și Movile. Compararea probelor proaspete și congelate oferă informații despre strategiile microbiene de supraviețuire în medii reci. Studiul are implicații în microbiologia mediului, schimbările climatice și bioprezervare.

Capitol II: Profilarea fiziologică la nivel comunitar a metabolizării substratelor de carbon de către comunitățile microbiene asociate cu sedimentele și apa din peșteri

Capitolul 2 a fost publicat sub forma **Panait, D.F.**, Panait, A.M., Cristea, A., Levei, E.A., Moldovan, O.M., and Banciu, H.L., (2025), Community-level physiological profiling of carbon substrate metabolization by microbial communities associated to sediments and water in karstic caves from Romania, preprint bioRxiv 2025.02.17.638648; <https://doi.org/10.1101/2025.02.17.638648>

În Capitolul II abordăm tiparele diversității funcționale ale comunităților microbiene din peșterile Cloșani, Ferice, Muierilor, Leșu și Topolnița, capabile să utilizeze substraturi de carbon, prin utilizarea testului bazat pe Biolog® EcoPlate™. Rezultatele evidențiate în acest capitol arată că probele de apă conțin comunități microbiene cu cea mai mare diversitate metabolică, demonstrând capacitatea de a utiliza o gamă largă de surse de carbon, precum acidul D-galacturonic, L-asparagina și Tween 80.

Pe de altă parte, probele de sediment au prezentat o activitate metabolică mai redusă decât cele din apă, cu preferințe specifice pentru substraturi precum L-serina și L-arginina. Comunitățile microbiene din probele de moonmilk au manifestat o activitate scăzută, fiind limitate la utilizarea cu rate mai ridicate a Tween 80 și a acidului D-galacturonic.

Aceste rezultate sugerează că condițiile de mediu influențează tiparele temporale ale utilizării surselor de carbon, oferind o bază pentru studii viitoare privind mecanismele care stau la baza acestor dinamici și implicațiile lor asupra funcționării ecosistemelor subterane.

Capitol III: Diversitatea, distribuția și preferințele pentru substraturi organice ale comunităților microbiene dintr-o peșteră cu activitate antropică redusă din nord-vestul României

Capitolul III a fost publicat sub forma **D. F. Bogdan**, A. I. Baricz, I. Chiciudean, P. A. Bulzu, A. Cristea, R. Năstase-Bucur, E. A. Levei, O. Cadar, C. Sitar, H. L. Banciu și O. T. Moldovan, Diversity, distribution and organic substrates preferences of microbial communities of a low anthropic activity cave in North-Western Romania, în *Frontiers in Microbiology* 14:962452, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.962452>.

Capitolul III analizează diversitatea, abundența, distribuția și preferințele pentru substraturi organice ale comunităților bacteriene din Peștera cu Apă din Valea Leșului (Munții Apuseni, nord-vestul României). Studiul utilizează secvențierea ampliconilor genei 16S rRNA și profilarea fiziologică la nivel comunitar (CLPP), corelate cu parametrii de mediu ai sedimentelor și apei.

Rezultatele arată că *Pseudomonadota* (sinonim *Proteobacteria*) este filumul predominant, iar abundența la nivel de ordin variază în funcție de tipul de probă. Ordinele dominante corelează pozitiv cu surse de carbon precum putrescina, acidul γ -aminobutiric și acidul D-malic, iar unele grupuri sunt asociate cu polimeri (Tween 40, Tween 80, α -ciclodextrină), carbohidrați (α -D-lactoză, i-eritritol, D-manitol) și majoritatea acizilor carboxilici și cetonici.

Acest studiu aduce primele date privind diversitatea microbiană dintr-o peșteră cu activitate antropică redusă din nord-vestul României, evidențiind potențialul metabolic al comunităților microbiene. Prin combinarea secvențierii genei 16S rRNA cu CLPP, cercetarea oferă perspective noi asupra distribuției taxonilor bacterieni și a capacității lor de degradare a substraturilor organice, constituind un punct de plecare pentru studii viitoare asupra diversității microbiene subterane.

Capitol IV: Diversitatea taxonomică și abundența comunităților microbiene din sedimentele bogate în sulfur ale Peșterii Movile

O parte din Capitolul IV a fost publicată sub forma: Chiciudean, I., Russo, G., Bogdan, D.F., Levei, E.A., Faur, L., Hillebrand-Voiculescu, A., Moldovan, O.T., și Banciu, H.L. (2022), Competition-cooperation in the chemoautotrophic ecosystem of Movile Cave: first metagenomic approach on sediments, *Environmental Microbiome* 17, 44. <https://doi.org/10.1186/s40793-022-00438-w>.

Capitolul IV explorează diversitatea microbială asociată sedimentelor uscate din ecosistemul chemoautotrof al Peșterii Movile (sud-estul României) utilizând metagenomica *shotgun*. Rezultatele evidențiază o diversitate taxonomică semnificativă, comunitățile microbiene fiind reprezentate de 22 de filumuri. Grupurile dominante includ *Acidobacteriota*, *Chloroflexota*, *Proteobacteria* și *Planctomycetota*, alături de filumuri candidate precum “*Ca. Patescibacteria*”, “*Ca. Zixibacteria*”, “*Ca. KSB1*” și “*Ca. Krumholzibacteriota*”.

Peste 60% dintre genomurile asamblate din metagenom (MAGs) nu sunt afiliate unor genuri cunoscute, iar 30% sunt identificate ca specii noi. Acesta este primul studiu asupra diversității microbiene din sedimentele uscate ale ecosistemului chemoautotrof al Peșterii Movile, completând cercetările anterioare care s-au concentrat exclusiv pe ecologia bazinelor sale anoxice, bogate în sulf.

Capitol V: Concluzii generale, perspective și originalitate

V.1. Concluzii generale

Această teză oferă o analiză cuprinzătoare a diversității, capacităților metabolice și funcțiilor ecologice ale comunităților procariote din diverse habitate speologice din România, incluzând sedimente, apă din bazine subterane, substrat (limon) și moonmilk. Prin integrarea metodelor bazate pe culturi, profilare fiziologică și metagenomică, studiul a oferit noi perspective asupra diversității microbiene și a peisajului taxonomic și funcțional insuficient explorat din aceste medii oligotrofe.

V.2. Contribuții originale ale tezei

Principalele contribuții la microbiologia speologică includ: (1) Compararea diversității bacteriene cultivabile între probe proaspete și post-congelare; (2) Utilizarea modelelor aditive generalizate (GAMs) pentru analiza datelor privind profilul fiziologic la nivel comunitar (CLPP) în peșteri; (3) Integrarea secvențierii ampliconilor genei 16S rRNA cu CLPP pentru Peștera Leșu, (4) Furnizarea unor seturi de date de genomuri metagenomice asamblate (MAGs) pentru Peștera Movile, identificând taxoni candidați noi și strategii de chemolitotrofie autotrofă pentru supraviețuirea în acest ecosistem extrem.

V.3. Perspective

Rezultatele acestei teze subliniază rolul esențial al comunităților bacteriene în ciclul (organic) al nutrienților și în menținerea stabilității ecosistemelor subterane. Cercetările viitoare ar trebui să se concentreze pe înțelegerea adaptărilor microbiene la medii subterane extreme prin abordări integrate de tip omics, care să valideze prezența genelor funcționale asociate toleranței la frig/căldură, chemolitotrofiei și ciclului nutrienților. Extinderea modelelor statistice și computaționale (ex. GAMs) ar putea oferi perspective mai profunde asupra interacțiunilor microbiene și a rețelelor metabolice.

Lista publicațiilor incluse în teză ca și capitole

Panait, D.F., Panait, A.M., Cristea, A., Levei, E.A., Moldovan, O.M., and Banciu, H.L., (2025), Community-level physiological profiling of carbon substrate metabolization by microbial communities associated to sediments and water in karstic caves from Romania, preprint bioRxiv 2025.02.17.638648; <https://doi.org/10.1101/2025.02.17.638648>, (**Capitol II**)

Bogdan D.F., Baricz A.I., Chiciudean I., Bulzu P.A., Cristea A., Năstase-Bucur R., Levei E.A., Cadar O., Sitar C., Banciu H.L. and Moldovan O.T., (2023), Diversity, distribution and organic substrates preferences of microbial communities of a low anthropic activity cave in North-Western Romania în *Frontiers in Microbiology* 14:962452, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.962452> (**Capitol III**)

Chiciudean, I., Russo, G., **Bogdan, D.F.**, Levei, E.A., Faur, L., Hillebrand-Voiculescu, A., Moldovan, O.T., and Banciu, H.L. Competition-cooperation in the chemoautotrophic ecosystem of Movile Cave: first metagenomic approach on sediments în *Environmental Microbiome* 17, 44 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40793-022-00438-w> (**Capitol IV**)

Lista publicațiilor neincluse în teză

Porav, A. S., Bocăneală, M., Fălămaș, A., **Bogdan, D. F.**, Barbu-Tudoran, L., Hegeduș, A., and Dragoș, N. (2020). Sequential aqueous two-phase system for simultaneous purification of cyanobacterial phycobiliproteins în *Bioresource technology*, 315, 123794, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123794>

Participări la conferințe naționale și internaționale

1. **Bogdan, D.F.**, Cristea, A., Buda, D. M., Baricz A. I., Ionescu, M., Crăciun, A., Moldovan, O. T., and Banciu, H. L., (2019), *Diversity and antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from Muierilor Cave (Romania)*
 - **Poster** la Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SRBBM), Iași, Romania (abstract available in Journal of Experimental & Molecular Biology, ISSN: 2601-6974).

2. **Bogdan, D.F.**, Cristea, A., Buda, D. M., Baricz A. I., Moldovan, O. T., and Banciu, H. L., (2019), *A snapshot on the culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Muierilor Cave (Romania)*.
 - **Poster** la Annual Conference of the Faculty of Biology and Geology *BIO.T.A. – Biodiversitate, Tradiții și Actualitate*, Cluj-Napoca, Romania.
3. Kovacs, E., Levei, E.-A., Török, A. I., Cadar, O., Sitar, C., Faur, L., Năstase-Bucur, R., Kenesz, M., Petculescu, A., **Bogdan, D. F.**, Chiciudean, I., Banciu, H. L., Atkinson, I., Fruth, V., and Moldovan, O. T, (2020) *Chemical characterization of sediments in the Topolnița karst cave (SW Romania)*.
 - **Prezentare orală**, 47th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Slovakia (online).
4. **Bogdan, D. F.**, Chiciudean, I., Baricz, A.-I., Szekeres, E., Ionescu, M., Mușat, N., Remizovschi, A., Levei, E. A., Năstase-Bucur, R. M., Sitar, C., Kenesz, M., Mirea, I. C., Moldovan, O. T., and Banciu, H. L., (2020), *Metabolic fingerprinting of microbial communities from cave ecosystems: ecological and socio-economical relevance*
 - **Prezentare orală** – concurs la National Conference for PhD Students “Impact of my research project in society”, 3rd edition, University of Bucharest (online).
5. Vaniga, N. P., **Bogdan, D. F.**, Moldovan, O. T., and Banciu, H. L., (2021), *Diversity of cultivable heterotrophic bacteria from three Romanian karst caves*
 - **Prezentare orală** at 6th edition of the *Young Researchers in BioSciences* International Symposium, Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia, 2021, Vol 66, Issue 1, p32, ISSN 1221-8103, Cluj-Napoca, Romania.
6. **Bogdan, D. F.**, Chiciudean, I., Bulzu, P. A., Baricz, A. I., Năstase-Bucur, R., Levei, E. A., Sitar, C., Mirea, I. C., Moldovan, O. T., and Banciu, H. L., (2021), *Assessment of bacterial diversity and community-level physiological profiles associated to sediments and water from Peștera cu Apă din Valea Leșului (Romania)*
 - **Prezentare orală** at Annual Conference of the Faculty of Biology and Geology *BIO.T.A. – Biodiversitate, Tradiții și Actualitate*, Cluj-Napoca, Romania.
7. Chiciudean, I., Russo, G., **Bogdan, D. F.**, Levei, E. A., Faur, L., Moldovan, O. T., and Banciu, H. L., (2021), *Ecological interactions inferred from metagenomic analysis of Movile Cave sediments*
 - **Poster** la Annual Conference of the Faculty of Biology and Geology *BIO.T.A. – Biodiversitate, Tradiții și Actualitate*, Cluj-Napoca, Romania.

8. **Bogdan, D. F.**, Baricz, A. I., Chiciudean, I., Bulzu, P. A., Năstase-Bucur, R., Levei, E. A., Sitar, C., Mirea, I. C., Banciu, H. L., and Moldovan, O. T., (2022), *Evaluation of bacterial diversity and community-level physiological profiles associated to sediments and water from a karst cave*
 - **Poster** la Annual Conference of Federation of European Microbiological Societies, Belgrade, Serbia (abstract book available online: <https://www.femsbelgrade2022.org/abstract-book>).
9. Chiciudean, I., **Bogdan, D. F.**, Moldovan, O. T., and Banciu, H. L., (2022), *A glimpse into the biosynthetic potential and resistome of microbial communities inhabiting sulfidic, chemoautotrophic Movile Cave*
 - **Prezentare orală** at 25th International Conference on Subterranean Biology – ARPHA Conference abstracts, Cluj-Napoca, Romania (abstract available online: <https://doi.org/10.3897/aca.5.e86928>)
10. **Panait, D.F.**, Porav, A. S., and Barbu, L., (2023), *Scanning transmission electron microscopy (STEM) use in determination of 3D structures of metalloproteins. Case study: cyanobacterial photosystem I*
 - **Prezentare orală** at Annual Conference of Romanian Electron Microscopy Society (CREMS), Cluj-Napoca, Romania.

Implicare în diverse proiecte

1. **2018, membru** – Dezvoltarea spiritului antreprenorial în rândul studenților UBB cu grupul țintă **CNSIS-FDI-2018-0096**.
2. **2018–2022, membru** (Asistent cercetare) - National grant **PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0016**, contract nr. 15/10.10.2018; titlu: „Food chains in the dark: diversity and evolutionary processes in caves (DARKFOOD)”; responsible partner P1-UBB: Prof. Dr. Habil. Horia Leonard Banciu.
3. **2023-2024, expert educație** – **ROSE AG 299/SGU/NC/II/23.12.2019**

Mobilități de lucru

1. **Invitat asistent cercetare, 2021** (4 luni), Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Leipzig, Germany.
2. **Erasmus grant mobilitate predare, Iunie 2023**, Mutah University, Iordania.
3. **Erasmus grant mobilitate predare, Martie 2024**, University of DaNang, Vietnam

4. **Erasmus grant mobilitate predare, Aprilie-Mai 2024**, Baku Engineering University, Azerbaijan
5. **Erasmus grant staff training, Septembrie 2024**, Clarkson University, United States of America.

Activitate de tutoriat legată de subiectul tezei

Include o listă a tezelor de licență și masterat supervizate în calitate de co-coordonator:

1. Teză licență Luminița Ciucă, *Amprentarea metabolică a comunităților bacteriene din peșteri prin metoda Biolog™ ECOPLATE*, **2020**.
2. Teză licență Nicoleta Vaniga, *Identificarea moleculară a unor izolate bacteriene din probe de peșteră*, **2020**.
3. Teză master Roxana Marin, *Analiza tiparelor de diversitate metabolică a comunităților bacteriene din peșterile Izvorul Tăușoarelor și Topolnița prin metoda Biolog™ ECOPLATE*, **2021**.
4. Teză master Anamaria Petruț, *Izolarea și identificarea diversității bacteriene în sedimente de la Peștera Movile și determinarea profilului de rezistență la antibiotice a acestora*, **2021**.
5. Teză master Nicoleta Vaniga, *Izolarea și identificarea moleculară a unor izolate bacteriene din sedimente de peșteră supuse unui ciclu de îngheț-dezgheț artificial*, **2022**.