



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00287

(22) Data de depozit: 24/04/2018

(41) Data publicării cererii:  
29/11/2019 BOPI nr. 11/2019

(71) Solicitant:  
• INCDO-INOE 2000, FILIALA INSTITUTUL  
DE CERCETĂRI PENTRU  
INSTRUMENTAȚIE ANALITICĂ  
CLUJ-NAPOCA, STR. DONATH NR.67,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• KOVACS EMOKE DALMA,  
STR. AL. VLAHUȚĂ, BL. N4, NR. 31, SC. 2,  
AP. 37, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• KOVACS MELINDA HAYDEE,  
STR. AL. VLAHUȚĂ BL. N4, NR. 31, SC. 2,  
AP. 37, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• ROMAN CECILIA, STR. PIAȚA ABATOR,  
BL. B, AP. 58, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **EXTRACȚIA OPTIMIZATĂ A PLFA DIN SOL  
PENTRU ANALIZA GAZ CROMATOGRFICĂ A STRUCTURII  
ȘI ABUNDENȚEI MICROBIODIVERSITĂȚII SOLULUI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de extracție a profilului a 37 de acizi grași derivați din fosfolipide, PLFA, utilizată pentru analiza gaz-cromatografică a extractelor derivatizate. Metoda, conform invenției, constă în 4 etape: saponificarea cu soluție metanolică de NaOH a probei de sol, la o temperatură de 75...115°C, timp de 30 min, separarea fracției fosfolipidice de fracțiile glicolipide și lipide neutre, reacția de derivatizare a extractului care conține fracția fosfolipidică cu o soluție 1...6N de

CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O cu HCl, după care extractul se supune incubării la tem-peratura de 60...120°C, timp de 15 min; în continuare, derivații acizilor grași rezultați se extrag cu un amestec de solvenți organici, prin agitare mecanică, timp de 15 min, rezultând un extract organic având o calitate adecvată pentru analiza gaz-cromatografică.

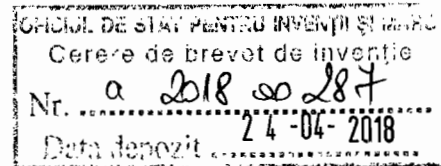
Revendicări: 1



**EXTRACTIA OPTIMIZATA A PLFA DIN SOL PENTRU ANALIZA GAZ  
CROMATOGRAFICA A STRUCTURII SI ABUNDENTEI MICROBIODIVERSITATII**

**SOLULUI**

**DESCRIERE**



**Invenția se referă** la optimizarea metodei de extracție a profilului acizilor grași derivați din fosfolipide (PLFA) cu scopul final de a facilita determinarea gaz cromatografică a structurii și abundenței comunității microbiene din sol la nivel de ultraurme într-un mod rapid și simplu. Metoda de extracție se referă la 37 de acizi grași (vezi tabel Anexa 1) derivați din fosfolipidele membranelor celulare ale microorganismelor prezente în sol.

Analiza gaz-cromatografică a profilului acizilor grași derivați din fosfolipide permite obținerea informației în timp real (din momentul prelevării) despre structura comunității microbiene existente în sol (clasele de microorganisme). Importanța identificării structurii comunităților microbiene din sol este dată de faptul că microbiota solului:

- (1) este responsabilă pentru o gamă largă de funcții ecosistemice benefice ale solului precum reglementarea creșterii plantelor, ciclul macro- și micro nutrienților, sechestrarea carbonului, etc.; și
- (2) are capacitatea de a degrada majoritatea poluanților organici (de origine antropogenă) din mediu.

În plus, microbiota solului este foarte sensibilă la procesele de modificare a solului (management, climatic, geochimic, etc.) fapt care este resimțit atât la nivelul structurii sale (componenta) cât și la nivelul abundenței (exprimare cantitativă) microorganismelor din sol. Obținerea informațiilor despre biomasa totală a solului, și despre modificările structurale și ale abundenței comunităților de microorganisme din sol ar putea în viitor să ghideze procedurile de management aplicate asupra solului în procesele de conservare și/sau restaurare. Cu toate acestea, în prezent, cea mai mare parte a acestei analize este efectuată manual astfel fiind consumatoare de timp și predispusă adesea la erori (Buyer and Sasser, 2012; Frostegard et al., 2011; Miura et al., 2017).

**Prezentarea stadiului tehnicii in momentul actual la nivel international:**

Extractia acizilor grasi derivati din fosfolipide conform protocolului actual recunoscut la nivel international (Oates et al., 2017) necesita o durata de 7 zile si cuprinde urmatoarele etape principale:

- *Ziua 1.* Pregatirea probelor de sol (mojarare, omogenizare, liofilizare) si a sticlariei de laborator (sterilizare, placi de cultura cu substrat organic);
- *Ziua 2.* Obtinerea multiculturilor prin dilutie seriala dupa incubare de 24 ore
- *Ziua 3.* Extractia acizilor grasi din probele de sol (durata necesara pentru separarea optima a fazelor fiind de 18 ore);
- *Ziua 4.* Colectarea fazei organice si eliminarea resturilor de apa din extract prin procese repetitive;
- *Ziua 5.* Separarea lipidelor pe clase (fractii neutre, glicolipide, fosfolipide);
- *Ziua 6.* Saponificarea si reactia de metilare: formarea metil esterilor ai acizilor grasi din fractia fosfolipidica obtinuta (derivatizare);
- *Ziua 7.* Analiza gaz-cromatografica a extractelor derivatizate.

**Prezentarea stadiului tehnicii in momentul actual la nivel national:**

Pe baza informatiilor din literatura de specialitate detinute, in momentul actual nu exista referinte bibliografice privind determinarea structurii si abundentei comunitatii microbiotei solului prin metoda PLFA. Conform literaturii de specialitate, determinarea structurii comunitatii microorganismelor din sol se realizeaza prin metoda culturilor in placi (Alexa et al., 2010; Onet et al., 2016) iar determinarea abundentei se refera, in general, la comunitatea bacteriana si este determinata prin metoda numarului celui mai probabil de bacterii (NCP) utilizand tehnica dilutiilor zecimale, rezultatele fiind prelucrate cu ajutorul tabelului statistic al lui Alexander (1965).

**Scopul inventiei:** este de a dezvolta o metoda optimizata de extractie a profilului acizilor grasi derivati din fosfolipide, PLFA, cu scopul final de a facilita determinarea gaz-cromatografica a structurii si abundentei comunitatii microbiene din sol la nivel de ultraurme intr-un mod rapid si simplu.

**Probleme tehnice pe care prezenta inventie doreste sa le rezolve:**

- Reducerea timpului de pregatire a probelor;
- Eliminarea surselor de eroare care pot interveni asupra rezultatului final;

- Optimizarea calitatii extractului care urmeaza a fi analizat prin tehnica de gaz-cromatografie

#### **Avantajele aduse de prezenta inventie la metoda de analiza PLFA:**

- *Eliminarea cresterii si a izolarii comunitatilor de microorganisme pe substrat organic (placi Petri):* in momentul actual nu exista un substrat universal (ex: YNA base, YMB, YmA, SRRB, etc.) sau o metoda universala de realizare a inoculului (ex: metoda prin raspandire, metoda prin scarificate, metoda in strii, metoda culturala Koch, metoda Lindner, metoda Naumov, etc. (Janssen et al, 2002; Bollman et al., 2010)) care sa faciliteze izolarea si dezvoltarea tuturor microorganismelor existente in sol. Substraturile existente si metodele mentionate pot favoriza dezvoltarea unor clase/subclase de microorganisme dar, in acelasi timp, pot inhiba dezvoltarea altor microorganisme existente in sol (vezi Anexa 2). De asemenea, conform protocolului existent si aplicat in prezent se realizeaza incubarea substraturilor inoculate pentru o durata de 24 de ore la o temperatura de 25 °C. Acest timp de incubare poate sa nu fie suficient pentru dezvoltarea tuturor microorganismelor posibil existente in sol (literatura de specialitate recomanda ca durata de incubare intre 2-3 zile dar, pentru anumite clase, poate fi necesara o perioada de incubare intre 1-2 saptamani) (Elbendary et al., 2018). De asemenea, pentru dezvoltarea optima a diferitelor clase de microorganisme s-ar putea sa fie necesara selectarea unei alte temperaturi de incubare (20-37 °C) (Lang et al., 2018).
- *Detectia unei structuri si abundente mai ridicate:* prin acest brevet care propune inlocuirea cresterii si a izolarii comunitatilor de microorganisme pe substrat organic (placi Petri) cu extractia acizilor grasi derivati din fosfolipide direct din proba de sol prelevata se elimina ignorarea (specificitatea mediilor de cultura) sau inhibarea (selectivitatea mediilor de cultura) unor clase din comunitatea microbiana existenta in mod real in proba de sol.
- *Evitarea alterarii probelor:* posibilitatea realizarii extractiei acizilor grasi derivati din fosfolipide direct din proba de sol faciliteaza realizarea procesului de extractie din momentul in care proba a ajuns in laborator. In acest mod, prin efectuarea analizei in momentul imediat posibil dupa ce proba a ajuns in laborator, scade foarte

semnificativ posibilitatea distrugerii sau scaderii abundentei claselor de microorganisme prezente in sol.

- *Selectie optimizata a solventilor de extractie*: inlocuirea utilizarii cloroformului din etapa de extractie cu metil tert butil eter favorizeaza obtinerea unui extract organic limpede, incolor, protejand astfel timpul de viata al coloanei cromatografice si evitarea prezentei unor interferenti care pot altera semnalul cromatogramei.
- *Timp redus de pregatire a probelor*: metoda de extractie propusa prin aceasta cerere de brevet ofera posibilitatea realizarii pregatirii probelor de sol pentru analiza gaz-cromatografica intr-o zi, reducand astfel timpul necesar propus de protocolul actual, cel de 7 zile.
- *Reducerea surselor de eroare in analizarea probelor*: eliminarea contaminarii, reducerea potentialelor pierderi in structura si/sau abundenta a claselor de microorganisme existente in mod real in probele de sol, etc.
- *Reducerea costurilor*: eliminarea etapei de izolare si crestere a microorganismelor din sol pe medii de cultura (aplicata in prezent) reduce costurile necesare pentru achizitia mediilor de cultura. Nota: trebuie luata in considerare si gama variata a mediilor existente comercial care prezinta specificitate si selectivitate redusa in comparatie cu diversitatea si abundenta microorganismelor existente in sol.

#### **Modul de lucru pentru extractia optimizata a PLFA din sol pentru analiza gaz cromatografica a structurii si abundentei biodiversitatii solului:**

Proba de sol propusa pentru analiza se omogenizeaza si o cantitate intre 1 – 10 g se pune intr-un pahar Erlenmeyer cu dop rotat. Principali pasi (in ordine cronologica) implicati in procesul de extractie a acizilor grasi derivati din fosfolipide sunt:

(1) **saponificare**: intre 1 - 15 mL de solutie metanolica de NaOH (intre 0.5 – 5 M) au fost adaugati probei de sol cu rolul de a elibera acizii grasi din lipidele celulelor existente in proba de sol. Proba cu solutia metanolica de NaOH a fost expusa incubarii la o temperatura cuprinsa intre 75 – 115 °C, timp de 30 min.

(2) **separarea fractiei fosfolipidice de fractiile glicolipide si lipide neutre**: a fost realizata pe o coloana silicic acida (60-200 mesh) pe care elutia fractiei fosfolipidice a fost realizata cu un amestec de acid acetic-metanol-solutie tampon (1:6:1 v/v).

(3) **reactia de derivatizare (metilare):** la extractul care contine fractia fosfolipidica au fost adaugati intre 0.5 – 5 000  $\mu\text{L}$  de solutie  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  cu  $\text{HCl}$  intre 1 – 6 N, dupa care extractul a fost supus incubarii la o temperatura intre 60 – 120  $^{\circ}\text{C}$  pentru 15 minute.

(4) **obtinerea extractului final pentru analiza gaz-cromatografica:** derivatii acizilor grasi din fractia fosfolipidica din solutia apoasa (rezultata din urma reactiei de derivatizare) a fost extrasa prin agitare mecanica timp de 15 min cu un amestec de solventi organici – hexan-metil tert butil eter. Extractul organic astfel obtinut a fost spalat de trei ori cu o solutie de 0.8 ... 2 %  $\text{NaOH}$ .

Extractul organic astfel obtinut poate fi analizat prin gaz-cromatografie. Durata extractiei prin aceasta metoda este de 3 ore.

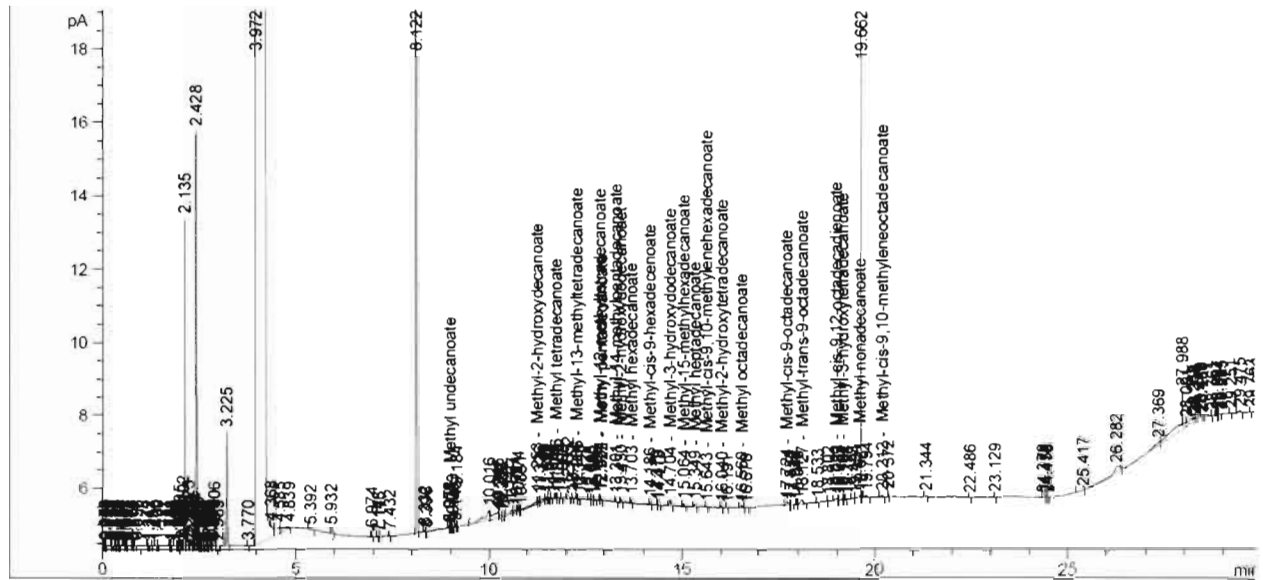
Parametrii de performanta atinsi prin aplicarea acestei metode de extractie sunt prezentati in Tabelul 1.

Tabelul 1. Parametrii de performanta ai metodei propuse

Denumire chimica compus	Coef. $r^2$ curba de calibrare	Deviatia stand. residuala	Randament de recuperare (%)
Butirat de metil (Methyl butyrate)	0.99742	2.32540	81.5
Hexanoat de metil (Methyl hexanoate)	0.99425	1.85484	83.6
Octanoat de metil (Methyl octanoate)	0.95877	2.66594	109.6
Decanoat de metil (Methyl decanoate)	0.99989	0.732883	100.5
Undecanoat de metil (Methyl undecanoate)	0.99998	0.33451	100.8
Laurat de metil (Methyl laurate)	0.9998	0.26557	100.2
Tridecanoat de metil (Methyl tridecanoate)	0.99998	0.25073	99.8
Miristat de metil (Methyl myristate)	0.99999	0.21035	100.1
Miristolat de metil (Methyl myristoleate)	0.99999	0.19232	99.2
Pentadecanoat de metil (Methyl pentadecanoate)	0.99999	0.17864	100.1
Methyl <i>cis</i> -10-pentadecenoate	0.99999	0.19226	99.5
Palmitat de metil (Methyl palmitate)	0.99999	0.18069	99.8
Methyl palmitoleate	0.99999	0.34730	100.5

<b>Methyl heptadecanoate</b>	0.99999	0.20935	100.1
<b>cis-10-Heptadecanoic acid methyl ester</b>	0.99999	0.19702	100.5
<b>Methyl stearate</b>	0.99989	0.56868	103.1
<b>trans-9-Elaidic acid methyl ester</b>	0.99999	0.20403	99.7
<b>cis-9-Oleic acid methyl ester</b>	0.99999	0.21210	99.7
<b>Methyl linolelaidate</b>	0.99882	4.51079	118.7
<b>Methyl linoleate</b>	0.99999	0.43147	105.9
<b>Methyl arachidate</b>	0.99998	0.28436	98.1
<b>Methyl <math>\gamma</math>-linolenate</b>	0.99987	0.65902	100.4
<b>Methyl cis-11-eicosenoate</b>	0.99999	0.21699	97.2
<b>Methyl linolenate</b>	0.99999	0.18977	98.9
<b>Methyl heneicosanoate</b>	0.99997	0.37148	96.8
<b>cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester</b>	0.99997	0.35035	102.5
<b>Methyl behenate</b>	0.99978	0.78125	101.8
<b>cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester</b>	0.99975	0.34481	104.2
<b>Methyl erucate</b>	0.99989	0.95514	109.2
<b>cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester</b>	0.99914	0.62154	87.6
<b>cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid methyl ester</b>	0.99972	0.77120	99.1
<b>Methyl tricosanoate</b>	0.99963	0.49882	100.9
<b>cis-13,16-Docosadienoic acid methyl ester</b>	0.99988	0.32571	115.2
<b>Methyl lignocerate</b>	0.99969	1.26672	114.5
<b>cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester</b>	0.99989	2.03251	117.2
<b>Methyl nervonate</b>	0.99988	1.02117	99.7
<b>cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester</b>	0.99981	0.41576	89.5

Cromatograma obtinuta prin analiza unei probe de sol pe care s-a aplicat prezenta metoda de extractie este redata in Figura 1.



In **concluzie**, metoda de extractie propusa pentru brevetare rezolva problemele tehnice identificate prin:

→ *Scaderea surselor de erori*, prin: scaderea timpului si a pasilor necesari realizarii extractiei; eliminarea etapei de cultivare si izolare a comunitatii microorganismelor pe placi Petri; scaderea potentialului de alterare a probei (pierderi in structura sau abundenta comunitatii microorganismelor din proba) prin posibilitatea realizarii extractiei din momentul in care proba a ajuns in laborator;

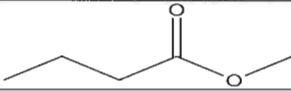
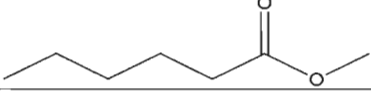
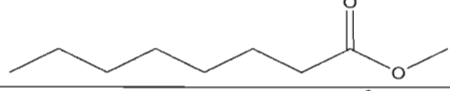
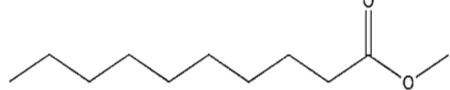
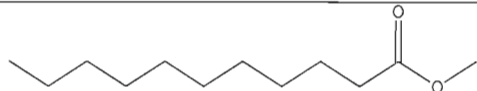

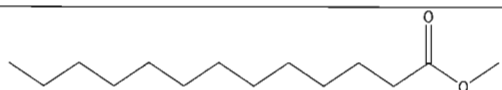
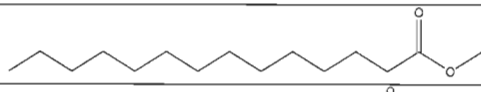
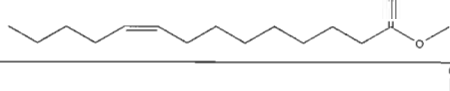
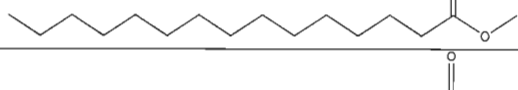
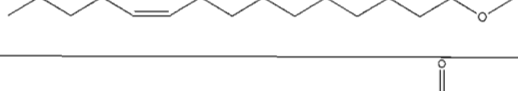
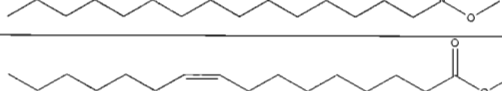
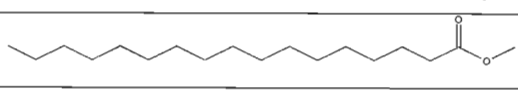

→ *Scaderea timpului de extractie*, prin: eliminarea etapei de cultivare si izolare a comunitatii microorganismelor pe placi Petri; eliminarea timpului necesar incubarii si separarii fazei organice.


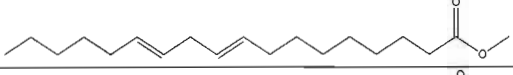
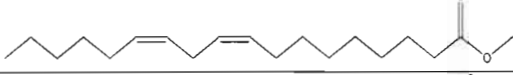
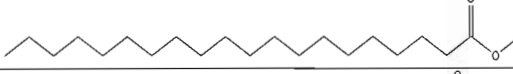
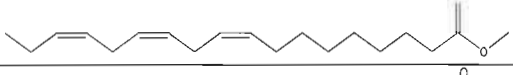

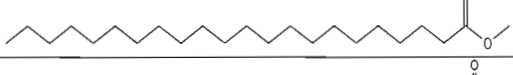
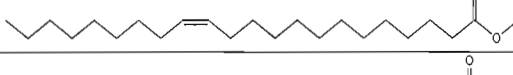
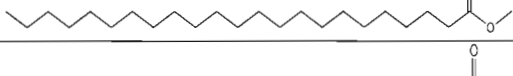
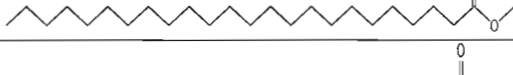

→ *Cresterea selectivitatii si specificitatii analizei*, prin: eliminarea etapei de cultivare si izolare a comunitatii microorganismelor pe placi Petri si analiza directa a extractiei de sol permite analiza concomitenta a tuturor potentialelor clase de microorganisme din sol si la abundente joase (analiza in urme si ultra-urme a acizilor grasi derivati din fosfolipide).



## Anexa 1.

Tabel – Denumirea chimica a acizilor grasi urmariti

Denumire chimica	Formula chimica	CAS	Structura chimica
Butirat de metil (Methyl butyrate)	$C_5H_{10}O_2$	623-42-7	
Hexanoat de metil (Methyl hexanoate)	$C_7H_{14}O_2$	106-70-7	
Octanoat de metil (Methyl octanoate)	$C_9H_{18}O_2$	111-11-5	
Decanoat de metil (Methyl decanoate)	$C_{11}H_{22}O_2$	110-42-9	
Undecanoat de metil (Methyl undecanoate)	$C_{12}H_{24}O_2$	1731-86-8	
Laurat de metil (Methyl laurate)	$C_{13}H_{26}O_2$	111-82-0	
Tridecanoat de metil (Methyl tridecanoate)	$C_{14}H_{28}O_2$	1731-88-0	
Miristat de metil (Methyl myristate)	$C_{15}H_{30}O_2$	124-10-7	
Miristolat de metil (Methyl myristoleate)	$C_{15}H_{28}O_2$	56219-06-8	
Pentadecanoat de metil (Methyl pentadecanoate)	$C_{16}H_{32}O_2$	7132-64-1	
Methyl <i>cis</i> -10- pentadecenoate	$C_{16}H_{30}O_2$	90176-52-6	
Palmitat de metil (Methyl palmitate)	$C_{17}H_{34}O_2$	112-39-0	
Palmitoleat de metil (Methyl palmitoleate)	$C_{17}H_{32}O_2$	1120-25-8	
Heptadecanoat de metil (Methyl heptadecanoate)	$C_{18}H_{36}O_2$	1731-92-6	

<b>Stearat de metil (Methyl stearate)</b>	$C_{19}H_{38}O_2$	112.61.8	
<b>Methyl linoleaidate</b>	$C_{19}H_{34}O_2$	2566-97-4	
<b>Linoleat de metil (Methyl linoleate)</b>	$C_{19}H_{34}O_2$	112-63-0	
<b>Methyl arachidate</b>	$C_{21}H_{42}O_2$		
<b>Methyl linolenate</b>	$C_{19}H_{32}O_2$	301-00-8	
<b>Methyl heneicosanoate</b>	$C_{22}H_{44}O_2$	6064-90-0	
<b>Methyl behenate</b>	$C_{23}H_{46}O_2$	929-77-1	
<b>Methyl erucate</b>	$C_{23}H_{44}O_2$	1120-34-9	
<b>Methyl tricosanoate</b>	$C_{24}H_{48}O_2$	2433-97-8	
<b>Methyl lignocerate</b>	$C_{25}H_{50}O_2$	2442-49-1	
<b>Methyl nervonate</b>	$C_{25}H_{48}O_2$	2733-88-2	

## Anexa 2.

Varietatea si selectivitatea mediilor de cultura comercial disponibile pentru izolarea si cresterea microorganismelor din sol (selectie)

- YNA – yeast nitrogen base (selectiv la pH-uri joase pentru: mucegaiuri si drojdii, *Pichia*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*)
- YMB – yeast mannitol broth for *Rhizobiaceae*
- YMA – yeast mannitol agar for *Rhizobiaceae*
- YmA – yeast malt agar pentru microorganisme acidurice (mucegaiuri si drojdii). Este neselectiv pentru *Aspergillus*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, etc.
- SRBB – sulfate reducing broth base pentru bacterii sulfat-reducatoare
- SAPIA – sulfate reducing API agar pentru bacterii sulfat-reducatoare

- RBCA – rose bengal chloramphenicol agar pentru *Aspergillus*, *Candida*, *Pichia*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, etc.
- PLET agar – PLET agar selectiv pentru *Bacillus anthracis*
- PCAV – plate count agar, vegetone este neselectiv pentru *Escherichia coli*, *Coliforms*, *Lactobacillus*, *Lactococci*, etc.

## REVENDICARE

Metoda de extractie optimizata a profilului a 37 de acizi grasi derivati din fosfolipidele membranelor celulare ale microorganismelor prezente in sol pentru analiza gaz-cromatografica a structurii si abundentei biodiversitatii solului la nivel de ultra-urme intr-un mod rapid si simplu **caracterizata prin aceea ca** se compune din patru (4) etape cu o durata totala a extractiei prin aceasta metoda de 3 ore: (1) **saponificare cu** solutie metanolica de NaOH (intre 0.5 – 5 M) adaugata probei de sol cu rolul de a elibera acizii grasi din lipidele celulelor existente in proba de sol si apoi expusa incubarii la o temperatura in domeniul 75 – 115 °C, timp de 30 min; (2) **separarea fractiei fosfolipidice de fractiile glicolipide si lipide neutre** pe o coloana silicic acidica (60-200 mesh) pe care elutia fractiei fosfolipidice se realizeaza cu un amestec de acid acetic-metanol-solutie tampon (1:6:1 v/v); (3) **reactia de derivatizare (metilare)**: la extractul care contine fractia fosfolipidica adaugand 0.5 – 5 000 µL de solutie CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O cu HCl intre 1 – 6 N, dupa care extractul se supune incubarii la o temperatura intre 60 – 120 °C pentru 15 min si (4) **obtinerea extractului final pentru analiza gaz-cromatografica** in care derivatii acizilor grasi din fractia fosfolipidica din solutia apoasa (rezultata din urma reactiei de derivatizare) se extrag prin agitare mecanica timp de 15 min cu un amestec de solventi organici – hexan-metil tert butil eter, extractul organic astfel obtinut putand fi analizat prin gaz-cromatografie.