



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00541

(22) Data de depozit: 06/09/2019

(41) Data publicării cererii:
30/03/2021 BOPI nr. 3/2021

(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. VLĂHUȚĂ 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) **METODĂ DE EVALUARE A FUNCȚIONALITĂȚII
MICROBIOTEI SOLULUI PRIN ANALIZA GAZ
CROMATOGRFICĂ A RESPIRAȚIEI MICROBIOTEI
ÎN TIMPUL CONSUMULUI DE CARBON**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de evaluare a funcționalității microdiversității solului. Metoda, conform invenției, constă în 4 etape și anume:

- 1 - pregătirea probei în care proba omogenizată de sol este expusă la multiple surse de carbon,
- 2 - incubarea probei pe o perioadă de 24 h,
- 3 - analiza gaz cromatografică a conținutului de dioxid de carbon expirat de microorganisme în timpul metabolizării carbonului și

4 - exprimarea rezultatului privind emisia de dioxid de carbon din intervalul 0,45...42,05% mol/g probă, care furnizează informații despre funcționalitatea microbiotei din sol, aceasta fiind o caracteristică a fertilității solului.

Revendicări: 1



**METODA DE EVALUARE A FUNCTIONALITATII MICROBIOTEI SOLULUI PRIN
ANALIZA GAZ CROMATOGRAFICA A RESPIRATIEI MICROBIOTEI IN TIMPUL
CONSUMULUI DE CARBON**

DESCRIERE

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. a 219	00 541
Data depozit 06 -09- 2019	

Invenția se referă la o metoda de evaluare a functionalitatii microbiotei solului prin analiza gaz cromatografica a respiratiei microbiotei in timpul consumului de carbon. Tehnica gaz cromatografica este aplicata in urma incubarii microorganismelor (dupa o durata de 24 ore), timp in care se realizeaza metabolizarea carbonului din sursele energetice aplicate. Rezultatele obtinute faciliteaza evaluarea functionalitatii biodiversitatii solului, aceasta fiind o caracteristica importanta privind fertilitatea solului.

Vitalitatea microbiotei solului este data de continutul de dioxid de carbon expirat de microorganismele prezente in sol. Sanatatea microbiotei solului depinde in mod direct de accesul microorganismelor la resurse de energie (surse de carbon) si de eficienta procesului de metabolizare a carbonului de catre acestea. Astfel, prin relatia directa dintre procesul de respiratie/metabolism al microorganismelor solului, cuantificat prin emisia de dioxid de carbon se obtin informatii despre functionalitatea microbiotei din sol (Bollman et al., 2010).

In ecosistem, microorganismele din sol joaca multiple roluri. Unul dintre cele mai importante roluri este legat de ciclul carbonului in ecosistemul terestru. Ciclul carbonului depinde in mod direct de functionalitatea solului (procesul de respiratie si metabolism). In acest caz microorganismele:

- (1) descompun materia organica – rol semnificativ in fluxul de energie si ciclul materiei. Astfel, abilitatea metabolica a microorganismelor de a utiliza sursele de carbon reprezinta o stare functionala semnificativa.
- (2) expira/emit dioxid de carbon prin procesul de respiratie – rol in circuitul dioxidului de carbon intre sol si atmosfera. Se estimeaza ca aproximativ 70 % din emisia totala de dioxid de carbon a solului este datorata respiratiei microbiotei solului (Bollman et al., 2010). Procesul de respiratie al microbiotei din sol depinde de conditiile hidrotermale si compozitia materiei organice.

Majoritatea microorganismelor din sol produc dioxid de carbon prin respiratie aeroba. Cu cat dioxidul de carbon emis de sol este mai mare cu atat biomasa

microbiana este mai mare in acel sol. Acest lucru este important deoarece este in relatie directa cu potentiala activitate microbiana a solului si cu functiile solului (ciclul nutrientilor, formarea solului si a materiei organice, suprimarea bolilor plantelor si stimularea cresterii plantelor). Functiile solului anterior mentionate stau la baza serviciilor ecosistemice furnizate de acesta.

Microbiota solului este foarte sensibila la procesele de modificare a solului. In majoritatea cazurilor aceste modificari se datoreaza tipului de management aplicat, variatiilor climatice si geochimice, etc. Modificarile induse sunt resimtite de microorganisme prin alterarea metabolismului acestora. Astfel de alterari reduc semnificativ functionalitatea microorganismelor ceea ce atrage dupa sine reducerea emisiei de dioxid de carbon, ceea ce inseamna ca biomasa microbiana s-a redus.

Prin urmare, obtinerea informatiilor privind respiratia microorganismelor din sol in timpul consumului de carbon ar putea sa ghideze procedurile de management aplicate solului (proces de conservare si/sau restaurare, procese agricole, etc). In prezent, cea mai mare parte a evaluarii functionalitatii microbiotei solului implica multiple analize costisitoare si consumatoare de timp.

Prezentarea stadiului tehnicii in momentul actual la nivel international:

La nivel international evaluarea functionalitatii solului este realizata printr-o suite de analize care implica aparatura de inalta performanta si metode complexe de analiza. Aceste analize, in majoritatea cazurilor, sunt costisitoare si consumatoare de timp.

Principalele clase de analize care sunt efectuate pentru evaluarea functionalitatii microbiotei solului sunt:

- (1) *Analiza microbiotei din sol.* Implica analize complexe din izolate individuale (culturi si monoculturi) si amestecuri. Tehnicile cele mai raspindite aplicate sunt cele microscopice, celulare, moleculare si genetice. (Lang et al., 2018; Elbendary et al., 2018).
- (2) *Analiza activitatilor enzimaticice extracelulare ale solului.* Se realizeaza prin utilizarea tehnicilor cromatografice de gaz sau lichid, sau spectroscopice in domenii specifice de absorbanta, luminiscenta sau fluorescenta. (Nechifor et al., 2019).

Prezentarea stadiului tehnicii in momentul actual la nivel national: Pe baza informatiilor din literatura de specialitate detinute, in prezent nu exista referinte bibliografice privind determinarea functionalitatii microbiotei solului prin gaz cromatografie. Conform rapoartelor si articolelor publicate, exista studii care s-au axat fie pe identificarea si cuantificarea microbiotei solului, fie pe analiza activitatilor enzimactice din sol (Nechifor et al., 2019). De asemenea, se pot mentiona studii privind continutul de nutrienti din sol corelat cu activitatea enzimatica a solului dar fara a fi realizata corelatia si cu abundenta microbiotei solului sau cu functionalitatea microorganismelor prezente in sol (Sopterean et al., 2012).

Scopul inventiei: dezvoltarea unei metode gaz cromatografice de evaluare a functionalitatii microbiotei solului bazate pe determinarea cantitativa a continutului de dioxid de carbon emis (respiratie) in timpul consumului de carbon din sursele energetice aplicate (metabolism) in vederea facilitarii evaluarii functionalitatii biodiversitatii solului.

Probleme tehnice pe care prezenta inventie doreste sa le rezolve:

- Excluderea necesitatii a multiple echipamente.
- Simplificarea analizei.
- Reducerea timpului de pregatire si de analiza a probelor.
- Reducerea surselor de eroare care pot interveni asupra rezultatului final;
- Optimizarea cuantificarii dioxidului de carbon expirat de microorganismele din sol.

Avantajele aduse de prezenta inventie:

- *Eliminarea cresterii si a izolarii comunitatilor de microorganisme pe substrat organic (placi Petri) pentru determinarea functionalitatii microorganismelor.* in momentul actual nu exista un substrat universal (YNA base) sau o metoda universala de realizare a inoculului (ex: metoda prin raspandire, metoda prin scarificate, metoda in stree, metoda culturala Koch, metoda Lindner, metoda Naumov, etc.) care sa faciliteze izolarea si dezvoltarea tuturor microorganismelor existente in sol. Substraturile si metodele existente favorizeaza dezvoltarea unor clase/subclase de microorganisme dar, in acelasi timp, ele si inhiba dezvoltarea altor microorganisme

existente in sol. De asemenea, cresterea optima a izolatelor individuale pe substraturi necesita conditii diferite de incubare (Janssen et al., 2002).

- *Evitarea alterarii probelor:* posibilitatea realizarii analizei functionalitatii microorganismelor din sol pe baza cuantificarii nivelului de dioxid de carbon expirat in timpul consumului de carbon din multiple surse energetice faciliteaza evaluarea functionalitatii microbiotei 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 semnificativ posibilitatea distrugerii sau scaderii abundentei claselor de microorganisme prezente in sol (datorate procesului de conservare a probelor) (Bollman et al., 2010).
- *Eliminarea etapei de extractie pentru determinarea dioxidului de carbon expirat de microorganisme:* excluderea etapelor de pregatire a probelor pentru analiza gaz cromatografica a dioxidului de carbon expirat de microorganisme elimina semnificativ potentialele surse de eroare precum erori datorate puritatii solventilor organici, sticlarii utilizate, realizarea extractiei de catre analist, etc. In acelasi timp, prin evitarea prezentei unor interferenti care pot altera semnalul cromatogramei se protejeaza si timpul de viata al coloanei cromatografice.
- *Timp redus de pregatire a probelor:* metoda propusa spre brevetare contine o singura etapa de pregatire a probelor, si anume de expunere a microbiotei din sol la multiple surse de carbon. Aceasta reduce semnificativ timpul de operare a probelor comparativ cu alte tehnici de analiza (ex. celulare, moleculare si genetice).
- *Reducerea surselor de eroare in analizarea probelor:* se datoreaza eliminarii multiplelor manipulari ale probelor propuse spre studiu. De asemenea, prin prezenta metoda propusa spre brevetare se reduc si potentialele pierderi in structura si/sau abundenta claselor de microorganisme existente in mod real in probele de sol.
- *Reducerea costurilor:* eliminarea tehnicilor laborioase utilizate in prezent pentru determinarea functionalitatii microbiotei solului reduce considerabil atat costurile analizelor cat si necesitatea existentei unei infrastructuri/echipamente analitice complexe.

**Modul de aplicare a metodei de evaluare a functionalitatii microbiotei solului
– respiratia microbiotei in timpul consumului de carbon**

Principalii pasi (in ordine cronologica) implicati in aplicarea metodei sunt:

- (1) **Pregatirea probei:** Proba de sol propusa pentru analiza se omogenizeaza. Din proba omogenizata, o cantitate cuprinsa intre 1 – 10 g se pune intr-un pahar Erlenmayer cu dop rodat si se aplica o concentratie de 0.001 – 0.01 g sursa de carbon. Sursele de carbon selectate pentru evaluarea consumului de carbon au fost stabilite pe baza celor existente ca resurse naturale in sistemele de sol. Acestea sunt: amine/amide, aminoacizi, carbohidrati, acizi carboxilici, polimeri, alte amestecuri. In Tabelul 1 sunt prezentate sursele individuale de carbon utilizate pentru studiu.

Tabel 1. Surse de carbon utilizate

Clasa	Compus	Formula chimica
Amine/amide	Feniletilamina	C ₈ H ₁₁ N
	Putresceina	C ₄ H ₁₂ N ₂
Aminoacizi	Acid glicil-l-glutamin	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₅
	l-Arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂
	l-Asparagina	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃
	l-Fenilalanina	C ₉ H ₁₁ N ₁ O ₂
	l-Serina	C ₃ H ₇ N ₁ O ₃
	l-Treonina	C ₄ H ₉ N ₁ O ₃
Carbohidrati	α-d-Lactoza	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
	β-metil-d-glucozidaza	C ₇ H ₁₄ O ₆
	d-Celobioza	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
	d-Manitol	C ₆ H ₁₄ O ₆
	d-Xiloza	C ₅ H ₁₀ O ₅
	i-Eritriol	C ₄ H ₁₀ O ₄
	N-acetil-d-glucozamina	C ₈ H ₁₅ N ₁ O ₆
Acizi carboxilici	Acid γ-hidroxi-butiric	C ₄ H ₈ O ₃
	Acid α-ketobutiric	C ₄ H ₆ O ₃
	Acid 2-hidroxi-benzoic	C ₇ H ₆ O ₃
	Acid 4-hidroxi-benzoic	C ₇ H ₆ O ₃
	Acid d-galactonic γ-lactona	C ₆ H ₁₀ O ₆
	Acid d-Galacturonic	C ₆ H ₁₀ O ₇
	Acid d-Glucosaminic	C ₆ H ₁₃ N ₁ O ₆
	Acid d-malic	C ₄ H ₆ O ₅

Clasa	Compus	Formula chimica
	Acid itaconic	C ₅ H ₆ O ₄
Amestecuri	d,l- α -fosfatglicerol	C ₃ H ₉ O ₆ P
	Glucoza-1-fosfat	C ₆ H ₁₃ O ₉ P
	Metil ester de acid piruvic	C ₄ H ₆ O ₃
Polimeri	A-ciclodextrina	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀
	Glicogen	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n
	Tween 40	
	Tween 80	

(2) **Incubarea probei:** Din amestecul de sol omogenizat pe care s-au aplicat sursele de carbon se ia o cantitate cuprinsa intre 0.5 – 1.5 g si se introduce intr-un vial-s de 40 mL cu dop filetat si septum in doua straturi cu teflon. Dupa inchiderea etansa, proba se aseaza intr-un incubator la o temperatura cuprinsa intre 23 ...33 °C pentru o durata exacta de 24 ore.

(3) **Analiza gaz cromatografica a probei - respiratia microorganismelor din sol in timpul consumului de carbon:** Dupa 24 ore de incubare un volum de 10 mL de gaz se extrage din faza gazoasa al vials-ului cu ajutorul unei seringi de gaze si se introduce in injectorul unui aparat gaz cromatograf echipat cu un detector TCD (detector cu conductivitate termica).

Conditile de analiza pe GC-TCD: sunt prezentate in Tabelul 2.

Tabel 2. Conditile de analiza prin GC-TCD

Inlet	Mod:	Split; Ratio: 80:1
	Heater:	200 °C
	Pressure:	14.6 psi
	Total flow:	26 ml/min
Oven	Temperature on:	60 °C
	Rate:	60 °C (2 min); 15 °C/min – 90 °C (3 min); 15 °C/min – 190 °C (0.3 min)
TCD	Heater:	250 °C
	Preference flow:	45 ml/min
	Make-up flow:	2 ml/min

Parametrii de performanta a peak-ului de dioxid de carbon: sunt prezentati in

Tabelul 3.

Tabel 3. Parametrii de performanta a peak-ului de dioxid de carbon determinat

Parametru	Valoare obtinuta
Amount [% mol]:	5.10756
Retention time:	5.14001
k':	4.66185
Height:	190.93576
Area:	2542.3403
Start:	4.84583
End:	5.66250
Skew:	0.50784
Excess:	0.91394
Width at half height:	0.20833
5 sigma:	0.45333
Tangent:	0.34957
Tailing:	0.44333
Symmetry (from integrator):	0.83816

Parametrii de performanta a metodei: In urma analizei dioxidului de carbon din etalon s-au stabilit urmatorii parametri de performanta a metodei propuse spre brevetare:

- Parametrii de performanta a curbei de calibrare:
 - Coeficientul de corelare (r^2): 0.99977
 - Deviatia standard reziduala: 29.02558
- Parametrii de precizie si justete al metodei:
 - Justețea metodei a fost verificata prin analiza unor MRC-uri. S-a determinat deviația standard si media pentru o serie de teste repetate si s-a comparat cu valoarea caracterizata pentru materialul de referinta folosit. Au fost analizate 10 probe paralele din MRC-ul care contine dioxid de carbon. Rezultatele obtinute si valoarea certificata sunt prezentate in tabellele urmator (Tabelul 4).

Tabelul 4. Intervalul de incredere pentru valoarea certificata si pentru valorile obtinute in urma determinarii dioxidului de carbon din MRC

CRM	Dioxid de carbon (% mol)	U_m (% mol)	Valoare certificata (% mol)	U_{CRM} (% mol)
1	1.7063	$0.2743/2 = 0.1371$	1.9440	$0.0389/2 = 0.0194$
2	1.7686			
3	1.7959			
4	1.6595			
5	1.7049			
6	1.6855			
7	1.6082			
8	1.6129			
9	1.5886			
10	1.5669			
X_{mediu}	1.6697			

→ Precizia s-a determinat prin repetabilitatea si limitele de repetabilitate prezentate, date care sunt prezentate in Tabelul 5.

Tabelul 5. Limitele de repetabilitate obtinute in urma validarii metodei propuse spre brevetare

Repetabilitate proba (% mol)	X mediu	s	RSD (%)
0.176	0.153	0.037	7.773
0.147			
0.160			
0.154			
0.148			
0.140			
0.148			

→ Incertitudinea analizei continutului de dioxid de carbon: 4.8 %.

(4) Exprimarea rezultatului de dioxid de carbon expirat de microorganisme in timpul consumului de carbon din multiple surse dupa o incubare de 24 ore:

Rezultatele se exprima in % mol/g proba 24 h, pe baza ecuatiei dreptei obtinute in urma calibrarilor realizate.

In laborator s-a determinat continutul de dioxid de carbon emis in urma incubarii pe o durata de 24 ore a probelor expuse la diferite surse energetice de carbon in cazul a 7 probe de sol prelevate din locatii diferite. S-au obtinut valori cuprinse intre 0.45 si 42.05 % mol/g proba 24 h (Tabelul 6).

Tabelul 6. Continutul de dioxid de carbon obtinut din probe reale in urma aplicarii metodei propuse spre brevetare

Proba	1	2	3	4	5	6	7
CO ₂ (% mol/g 24 h)	12.51	0.45	30.25	40.52	42.05	5.6	29.55

In urma analizelor obtinute (Tabelul 6) se observa ca in probele 1, 2 si 5 valoare dioxidului de carbon emis de microorganisme prin respiratie pe durata metabolizarii continutului de carbon din sursele energetice aplicate este semnificativ scazuta. Acest lucru arata ca vitalitatea solului este aproape inexistentă, abundenta microorganismelor in aceste probe de sol fiind extrem de mica ceea ce sugereaza ca functionalitatea solului este la limita inferioara, datorandu-se proceselor de eroziune cauzate fie de managementul extensiv si intensiv aplicat, fie de conditiile climatice anormale sau extreme.

Referinte bibliografice:

- Alexander M. Most probable number method for microbial populations. In Methods of Soil Analysis, Black C.A., Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., Clark F.E. (Eds.), American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 1467-1472, 1965.
- Elbendary A.A., Hessain A.M., El-Hariri M.D., Seida A.A., Moussa I.M., Mubarak A.S., Kabli S.A., Hemeg H.A., Jakee J.K. Isolation of antimicrobial producing

Actinobacteria from soil samples, Saudi Journal for Biological Science, 25(1):44-46, 2018.

- Lang Z., Qi D., Dong J., Ren L., Zhu Q., Huang W., Liu Y., Lu D. Isolation and characterization of a quinclorac-degrading Actinobacteria *Streptomyces* sp. Strain AH-B and its implication on microecology in contaminated soil. *Chemosphere*, 199:210-217, 2018.
- Janssen P.H., Yates P.S., Grinton B.E., Taylor P.M., Sait M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the division Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Applied Environmental Microbiology*, 68(5): 2391-2396, 2002.
- Bollman A., Palumbo A.V., Lewis K., Epstein S.S. Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 76(2): 7413-7419, 2010.
- Şopterean M.L. Monitorizarea regimului termic și hidric din Câmpia Transilvaniei și caracterizarea tehnologică a terenurilor pentru principalele culturi. Teza de doctorat, Biblioteca USAMV Cluj-Napoca, 2012.
- Nechifor V., Winning M. Global crop output and irrigation water requirements under a changing climate. *Heliyon*, 5(3):e01266, 2019.

REVENDICARE

Metoda de evaluare a functionalitatii microbiotei solului prin analiza gaz cromatografica a respiratiei microbiotei in timpul consumului de carbon caracterizata prin aceea ca se compune din patru pasi esentiali cu o durata totala de 25 ore din care 24 ore reprezinta perioada de incubare: (1) **pregatirea probei in care proba omogenizata de sol este expusa la multiple surse de carbon (amine/amide, aminoacizi, carbohidrati, acizi carboxilici, polimeri, alte amestecuri); (2) **incubarea probei** pe o durata de 24 ore in care microorganismele in conditii optime metabolizeaza carbon din multiple surse si emit dioxid de carbon prin respiratie; (3) **analiza gaz cromatografica a continutului de dioxid de carbon expirat de microorganismele in timpul metabolizarii carbonului**; (4) **exprimarea rezultatului** de dioxid de carbon expirat de microorganismele in timpul consumului de carbon din multiple surse dupa o incubare de 24 ore, permitand astfel obtinerea de informatii in timp real despre functionalitatea microorganismelor din sol (respiratie vs. metabolism).**