



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00563**

(22) Data de depozit: **25/07/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/08/2018** BOPI nr. **8/2018**

(41) Data publicării cererii:
27/02/2015 BOPI nr. **2/2015**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE
CLUJ FILIALĂ A INCDSB BUCUREȘTI,
STR.REPUBLICII NR.48, CLUJ-NAPOCA,
CJ, RO**

(72) Inventatori:
• **COMAN CRISTIAN, STR.RĂSĂRITULUI
NR.104, AP.11, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **DRUGĂ BOGDAN, STR. MEHEDIŢI
NR.61, AP.120, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **HEGEDUS ADRIANA, STR. FLORILOR
NR.164, AP.24, FLOREȘTI, CJ, RO;**
• **MITULEȚU MIHAI, STR.CAREI NR.28,
AP.4, TIMIȘOARA, TM, RO;**
• **SICORA COSMIN, STR. STADIONULUI
NR.2A, AP.12, JIBOU, SJ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**BERCEA V. ȘI COLAB. "THE
PHOTOCHEMICAL PS II ACTIVITY IN
CYANOBACTERIAL STRAINS BELONGING
TO THE NOSTOCALES GROUP IN
ANAEROBIOSIS CONDITIONS", STUDIA
UNIVERSITATIS BABEȘ- BOLYAI,
BIOLOGIA, VOL. 56, PP. 13-25, 2011;**
**PINTO F. A. L., TROSHINA O., LINDBLAD
P., "A BRIEF LOOK AT THREE DECADES
OF RESEARCH ON CYANOBACTERIAL
HYDROGEN EVOLUTION", INT. J.
HYDROGEN ENERGY, VOL. 27,
PP. 1209-1215, 2002; DUTTA ET AL.,
"HYDROGEN PRODUCTION BY
CYANOBACTERIA", MICROBIAL CELL
FACTORIES, 2005**

(54) **TULPINĂ DE ANABAENOPSIS SP. ȘI PROCEDU
DE OBTINERE A HIDROGENULUI DIZOLVAT
PRIN CULTIVAREA ACESTEIA**



RO 130066 B1

1 Invenția se referă la o tulpină cianobacteriană de *Anabaenopsis sp.*, cu potențial ridi-
cat de producere a biohidrogenului, și la un procedeu de obținere a hidrogenului dizolvat prin
3 cultivarea acesteia.

5 Hidrogenul este o alternativă ecologică la combustibilii fosili. Puterea energetică per
unitate de masă este mai ridicată decât cel al oricărui alt combustibil convențional, cu excep-
7 ția energiei nucleare. Avantajele sale ca sursă de energie sunt numeroase: este nepoluant,
eficient, regenerabil, iar în producerea sa nu se generează dioxid de carbon. În virtutea
atributelor sus-menționate, hidrogenul poate fi utilizat ca sursă de energie.

9 Implementarea la nivel industrial a unor tehnologii nepoluante, coroborată cu dez-
voltarea de biotehnologii de obținere de energie verde din surse regenerabile nepoluante
11 (vânt, radiație solară, biomasă vegetală) reprezintă marile provocări ale secolului actual.
Hidrogenul, cel mai abundent element chimic din univers, a intrat în atenția cercetătorilor în
13 ultimele decade datorită proprietăților sale fizico-chimice: înmagazinează cea mai mare can-
titate de energie per unitatea de masă și eliberează această energie cu producere de apă,
15 fără eliberare de produși poluanți.

17 Microorganismele fotosintetice producătoare de hidrogen (de exemplu, cianobacte-
riile) au fost luate în considerare datorită capacității lor de a sintetiza hidrogen într-o manieră
nepoluantă. Cianobacteriile, unul dintre cele mai largi și importante grupuri de bacterii de pe
19 pământ, sunt capabile de fotosinteză oxigenică, utilizând apa ca donor de electroni, și sunt
întâlnite în majoritatea nișelor ecologice, de la apele dulci până la cele sărate sau în mediile
21 extreme (**Whitton B. A., Potts M., The ecology of cyanobacteria. Springer, 2000, pp. 18-
32**). În timpul fotosintezei, electronii produși sunt utilizați în ciclul Calvin pentru a fixa dioxidul
23 de carbon sub forma unor compuși intermediari sau de rezervă. La întuneric, acești produși
sunt utilizați pentru generarea de energie, ceea ce duce la producerea diversilor compuși
25 secundari, inclusiv hidrogen.

27 Cercetările efectuate până în prezent la cianobacterii arată că este nevoie de o con-
tinuă identificare a unor tulpini cu potențial crescut de producere a hidrogenului și, totodată,
de o continuă optimizare a condițiilor de creștere ale culturilor pentru îmbunătățirea ratei de
29 producere a hidrogenului (**Benemann J. R., (1997) Feasibility analysis of photobiological
hydrogen production. Int. J. Hydrogen Energy, 22:979-987; Kaushik A., Anjana K.,
31 (2011) Biohydrogen production by *Lyngbya perelegans*: Influence of physico-chemical
environment. Biomass and Bioenergy, 35:1041-1045**). Este foarte importantă studierea
33 influenței diversilor factori cheie (prezența oxigenului, lumina, temperatura etc.) asupra evo-
luției producerii H₂ (**Pinto F. A. L., Troshina O., Lindblad P., A brief look at three decades
35 of reserach on cyanobacterial hydrogen evolution. Int. J. Hydrogen Energy, 27 (2002)
pp. 1209-1215**).

37 Până în prezent, nu au fost descrise în brevete de invenție tulpini de *Anabaenopsis*
capabile de producere a biohidrogenului în cantități ridicate. Astfel de tulpini ar fi deosebit
39 de utile pentru conversia dioxidului de carbon rezidual în biocombustibil sub forma hidro-
genului. Literatura non-brevet descrie o serie de tulpini cianobacteriene producătoare de
41 biohidrogen și o gamă largă de concentrații maxime obținute prin cultivarea acestora
(tabelul 1). Între aceste tulpini, este descrisă și cea de *Anabaenopsis circularis* IAM M-4 cu
43 o productivitate maximă de 0,31 μmol H₂/mg clorofilă.

Productivitatea producerii de hidrogen la diferite tulpini cianobacteriene

Nr. crt.	Denumire	Productivitate maximă	Referințe	
1.	<i>Anabaenopsis circularis</i> IAM M-4	0,31 $\mu\text{mol H}_2/\text{mg}$ clorofilă	Pinto și colab., 2002	3
2.	<i>Anabaena sp.</i> PCC 7120	2,6 $\mu\text{mol H}_2/\text{mg}$ clorofilă	Masukawa și colab., 2001	5
3.	<i>Anabaena flos-aquae</i> UTEX 1444	1,7 $\mu\text{mol H}_2/\text{mg}$ clorofilă	Masukawa și colab., 2001	7
4.	<i>Microcystis sp.</i> PCC 6830	0,16 $\mu\text{mol H}_2/\text{mg}$ clorofilă	Moezellar și colab., 1996	9
5.	<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120	2,6 $\mu\text{mol H}_2/\text{mg}$ clorofilă	Masukawa și colab., 2001	
6.	<i>Nostoc muscorum</i> IAM M-14	0,60 $\mu\text{mol H}_2/\text{mg}$ clorofilă	Masukawa și colab., 2001	11
7.	<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	0,60 $\mu\text{mol H}_2/\text{mg}$ clorofilă	Antal și Lindblad, 2005	
8.	<i>Gloeobacter violaceus</i>	1,38 $\mu\text{mol H}_2/\text{mg}$ clorofilă	Moezelaar și colab., 1996	13

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția se referă la necesitatea producerii biohidrogenului. 15

Invenția este ilustrată printr-un exemplu și folosește o serie de figuri a căror descriere este: 17

- fig. 1, tulpina *Anabaenopsis* AICB 717 în microscopie optică. Bara = 20 μm (a-e, g), 10 μm (f); 19

- fig. 2, arborele filogenetic al genelor ARNr 16S, ce prezintă încadrarea secvenței marker provenite de la *Anabaenopsis sp.* AICB 717 în grupul *A. nadsonii*-*A. circularis*. Arborele a fost construit folosind algoritmul Maximum Likelihood în MEGA 5.1, cu o valoare Bootstrap de 500 de replicare; 21

- fig. 3, modalitatea de eșantionare a culturilor cianobacteriene în vederea măsurării cantității de H_2 dizolvat și a clorofilei; 25

- fig. 4, sistemul de prelevare a eșantioanelor de cultură cianobacteriană în vederea măsurării cantității de H_2 dizolvat și a clorofilei; 27

- fig. 5, efectul microaerobiozei/anaerobiozei, indusă prin barbotare cu argon, asupra producerii de biohidrogen de către tulpina cianobacteriană *Anabaenopsis sp.* AICB 717. Cantitatea de H_2 dizolvat variază între 1,02...2,90 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ clorofilă, maximul fiind atins prin barbotarea cu argon a culturii timp de 15 min, urmată de incubare 24 h la întuneric; 29

- fig. 6, efectul ciclurilor lumină/întuneric de durată variabilă asupra producerii de biohidrogen de către tulpina cianobacteriană *Anabaenopsis sp.* AICB 717, în condiții de microaerobioză. Cantitatea de H_2 dizolvat variază între 1,41...2,88 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ clorofilă, maximul fiind atins prin barbotarea cu argon a culturii timp de 15 min, urmată de incubarea la întuneric timp de 24 h, la o temperatură de 22°C; 33

- fig. 7, efectul ciclurilor lumină/întuneric de durată variabilă în intervalul 24D-6L/18D asupra producerii de biohidrogen de către tulpina cianobacteriană *Anabaenopsis sp.* AICB 717, în condiții de microaerobioză. Cantitatea de H_2 dizolvat variază între 2,05...2,86 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ clorofilă, maximul fiind atins prin barbotarea cu argon a culturii timp de 15 min, urmată de incubarea timp de 1 h la lumină și 23 h la întuneric, la o temperatură de 22°C; 35

- fig. 8, efectul variației pH-ului asupra producerii de biohidrogen de către tulpina cianobacteriană *Anabaenopsis sp.* AICB 717, în condiții de microaerobioză. Cantitatea de H_2 dizolvat variază între 2,03...3,20 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ clorofilă, maximul fiind atins prin barbotarea cu argon a culturii timp de 15 min, urmată de incubarea la un pH 8 timp de 1 h la lumină și 23 h la întuneric, la o temperatură de 22°C; 37

1 - fig. 9, efectul influenței temperaturii asupra cantității de clorofilă în eșantioanele pre-
levate din cultura cianobacteriană *Anabaenopsis sp.* AICB 717 și incubate la diferite tempe-
3 raturi în condiții de 1 h lumină/23 h întuneric, microaerobioză indusă, pH 8. Se poate observa
o variație de sub 10% în intervalul 23...38°C și o scădere cu 25...40% în eșantioanele
5 incubate la 43...48°C;

- fig. 10, efectul influenței temperaturii asupra producerii de biohidrogen de către
7 tulpina cianobacteriană *Anabaenopsis sp.* AICB 717. Eșantioanele au fost incubate la diferite
temperaturi în condiții de 1 h lumină/23 h întuneric, microaerobioză indusă, pH 8. Se poate
9 observa o variație de aproximativ 30% în intervalul 23...38°C, cea mai mare cantitate de
hidrogen (3,25 μmol/mg clorofilă) fiind obținută prin incubare la 23°C.

11 Exemplu

Tulpina *Anabaenopsis sp.* AICB 717 a fost izolată prin micromanipulare din material
13 fitoplanctonic colectat dintr-o baltă eutrofă situată lângă localitatea Turda (jud. Cluj). A fost
depozitată inițial în Colecția de Alge și Cianobacterii a Institutului de Cercetări Biologice Cluj-
15 Napoca (AICB) pe mediul lichid BG 11.

Descriere morfologică și încadrare filogenetică

17 Tulpina *Anabaenopsis* AICB 717 se caracterizează din punct de vedere morfologic prin
trichomii săi spiralati (fig. 1, c, c, d), capabili de plutire în mediul de creștere. Spirele sunt în
19 număr redus (frecvent 1...3), datorită fragmentării trichomului. Trichomul, neînvelit de
mucilagiu, este format dintr-un număr variabil de celule vegetative și include, în afara
21 acestora, alte 2 tipuri celulare specializate: heterociste și akineți. Celulele vegetative au
formă de butoiăș (fig. 1, a, b) și se divid frecvent în culturile active prin fisiune binară. La
23 nivelul pereților transversali, celulele în curs de diviziune apar cu constricții evidente. Celulele
vegetative de culoare albastră-verde conțin vezicule cu gaz (aerotopi) puternic refringente
25 în microscopia optică, care conferă citoplasmei celulelor un aspect granular (fig. 1, a, b, g).
Frecvent, aerotopii apar sub forma unor granulații alungite (fig. 1, e). Dimensiunile celulelor
27 vegetative ale acestei tulpini, măsurate în microscopia optică, au fost următoarele: lungimea
5,3...10,1 μm (cu o valoare medie de aproximativ 7,4 μm) și lățimea 5,0...5,6 μm (cu o medie
29 de 5,3 μm). Heterocistele apar în interiorul trichomului (intercalar) ca urmare a diviziunii
asimetrice a două celule vegetative învecinate. Proheterocistele (fig. 1, a, e, săgețile scurte)
31 își pierd treptat structurile fotosintetizante (tilacoidele) și devin omogene în ceea ce privește
conținutul celular. Culoarea lor devine verzui, chiar verde-gălbui, iar forma, sferică (fig. 1,
33 a...g). Dezintegrarea trichomului la nivel heterocistelor (între heterociste) are ca finalitate dis-
punerea tipică a heterocistelor la capetele acestuia (fig. 1, a, b). Funcția lor în trichom
35 (fixarea N₂ atmosferic) a fost bine documentată la toate cianobacteriile heterocistate. Dimen-
siunea heterocistelor sferice la AICB 717 a fost de 3,8...5,6 μm (cu o medie de 5,3 μm).
37 Akineții sunt spori de rezistență și sunt rari în culturile active ale acestei tulpini. Localizarea
lor este variabilă, în interiorul trichomului (fig. 1, d) sau lângă heterocistul terminal (fig. 1, e,
39 g - marcați prin săgeți). Akineții au o formă care o aproximează pe cea sferică (fig. 1, e, g),
dar au fost observați și akineți ovali (fig. 1, d, f). S-a constatat, de asemenea, și o variabilitate
41 a ornamentațiilor, heterocistele putând fi ornamentate (fig. 1, e, g) sau nu (fig. 1, d, f). Dimen-
siunile akineților: lățimea 9,8...10,4 μm (media 9,7 μm) și lungimea 10,0...11,1 μm (media
43 10,4 μm). Prin morfologia sa, tulpina AICB 717 prezintă similarități (caractere comune) cu
Anabaenopsis elenkinii, *A. nadsonii* și *A. circularis*, toți acești taxoni fiind semnalati în
45 această zonă geografică de către Hegewald și colab. (1975).

Analiza filogenetică pe baza genei pentru ARNr 16S nu a condus la determinarea
47 AICB 717 până la nivel de specie (fig. 2), secvența marker de la *Anabaenopsis sp.* AICB 717
fiind încadrată într-un grup comun format din *Anabaenopsis nadsonii* și *Anabaenopsis*
49 *circularis* (fig. 2).

RO 130066 B1

Testarea producerii de hidrogen și optimizarea procesului

Pentru testarea producerii de hidrogen, tulpina cianobacterienă *Anabaenopsis sp.* AICB 717 a fost crescută pentru fiecare experiment timp de 14 zile pe mediu de cultură BG11 modificat (tabelul 2) la 22...23°C, iluminare continuă cu 150 μmol · m⁻² · s⁻¹ și barbotare continuă cu aer.

Tabelul 2

Mediul de cultură specific tulpinii cianobacteriene brevetate

Tulpina	Componența	Cantitatea	Observații
<i>Anabaenopsis sp.</i> AICB 717	NaNO ₃	496 mg/l	După autoclavare se adaugă câte 1 ml din soluțiile Micro-1* și Micro-2* 1 ml.
	K ₂ HPO ₄	22,62 mg/l	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	75 mg/l	
	CaCl ₂	27,1 mg/l	
	Na ₂ CO ₃ · 10H ₂ O	20 mg/l	
	Na ₂ SiO ₃	25,92 mg/l	
	Acid citric	6 mg/l	
	Na ₂ EDTA	16,8 mg/l	
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	14,38 mg/l	

*Componența soluțiilor Micro 1 și Micro 2 este descrisă în tabelul 3.

Tabelul 3

Componența soluțiilor Micro 1 și Micro 2

Nr. crt.	Soluția	Componeta	Cantitate	Observații
1	Micro 1	H ₃ BO ₃	2,86 g/l	Soluția se autoclavează și se păstrează în sticlă brună.
		MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,81 g/l	
		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,22 g/l	
		CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,08 g/l	
		MoO ₃	0,015 g/l	
2	Micro 2	NH ₄ VO ₃	0,023 g/l	Soluția se autoclavează și se păstrează în sticlă brună.
		Cr ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ · 2H ₂ O	0,096 g/l	
		NiSO ₄ · 7H ₂ O	0,047 g/l	
		Na ₂ WO ₄ · H ₂ O	0,0179 g/l	
		K ₂ TiF ₆	0,055 g/l	
		Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,044 g/l	

Cultura a fost concentrată la un volum de 150 ml prin centrifugare timp de 5 min, la o viteză de 5000 rpm. Optimizarea procesului de producere a biohidrogenului a fost efectuată prin testarea variației diferiților factori fizico-chimici:

- microaerobioza indusă prin barbotare cu argon;

RO 130066 B1

- 1 - diferite cicluri lumină-întuneric de durată variabilă;
- pH;
3 - temperatură.

5 Influența microaerobiozei induse prin barbotare cu argon asupra producerii de hidrogen.

7 Cultura cianobacteriană concentrată a fost barbotată cu argon timp de 120 min, în vederea inducerii stării de microaerobioză/anaerobioză. Modalitatea de eșantionare în vederea măsurării concentrației de hidrogen dizolvat și a clorofilei este prezentată în fig. 3 și 4. Astfel, au fost prelevate 4 probe control a câte 4 ml fiecare în fiole închise, cu un capac prevăzut cu un sept de silicon. După începerea barbotării, au fost prelevate eșantioane la 9 intervale de 5, 15, 30, 60 și 120 min. Fiolele cu eșantioanele prelevate au fost incubate 24 h la 11 întuneric, la o temperatură de 22...23°C, după care au fost efectuate măsurătorile. Cantitatea de H₂ dizolvată a fost determinată cu ajutorul Needle Sensor H₂ (Unisense), iar 13 cantitatea de clorofilă prin metoda lui Arnon (1949). Astfel, clorofila a a fost extrasă în acetona prin mojararea celulelor de cianobacterii în prezența de CaCO₃. Conținutul în 15 clorofilă a a fost estimat pe baza coeficientului specific de absorbție și a vârfului maxim de absorbție identificat cu spectrofotometrul Jasco V-630.

17 Barbotarea cu argon a culturii concentrate de *Anabaenopsis sp.* AICB 717 a dus la o variație a cantității de hidrogen dizolvat ce a fost cuprinsă între valorile 1,02...2,90 μmol H₂/mg clorofilă (fig. 5). Astfel, microaerobioza indusă prin barbotare cu argon timp de 15 min 19 duce la creșterea cantității de hidrogen dizolvat cu 100% față de control și cu 200% față de anaerobioză (se consideră îndeplinită după barbotare cu argon timp de 120 min).

23 *Influența ciclurilor variabile de lumină-întuneric asupra producerii de hidrogen*

25 Cultura concentrată de *Anabaenopsis sp.* AICB 717 a fost barbotată timp de 15 min cu argon, în vederea inducerii microaerobiozei, după care au fost prelevate 6 eșantioane a 27 câte 4 repetiții de 4 ml fiecare, în fiole închise, cu un capac prevăzut cu un sept de silicon. Cele 6 eșantioane au fost supuse unor cicluri variabile de lumină (150 μmol · m⁻² · s⁻¹) /întu- 29 neric (tabelul 4), la o temperatură de 22...23°C. Cantitatea de clorofilă și de hidrogen dizolvat au fost determinate în aceleași condiții descrise anterior.

31 *Tabelul 4*
33 *Eșantionarea culturilor cianobacteriene în vederea testării influenței diferitelor cicluri lumină/întuneric asupra producerii de hidrogen*

Eșantion	Durată lumină (L)/întuneric (D) (ore)
1	24L
2	24D
3	3L/21D
4	6L/18D
5	18L/6D
6	21L/3D

41 Cantitatea de hidrogen dizolvat a variat în cele 6 eșantioane între 1,41 și 43 2,88 μmol/mg clorofilă. Maximul concentrației de H₂ dizolvat a fost atins folosind o cultură barbotată timp de 15 min cu argon și incubată la întuneric timp de 24 h, fiind urmată de ciclul 45 6 h lumină - 18 h întuneric (fig. 6).

RO 130066 B1

Soluția creșterii unei culturi de *Anabaenopsis sp.* AICB 717 la întuneric pentru un randament mai crescut de producere a biohidrogenului nu este o soluție viabilă din punct de vedere biotehologic, deoarece o astfel de cultură nu poate supraviețui în lipsa luminii. Astfel, în continuare, a fost testată influența ciclurilor lumină/întuneric de durată mai scurtă, în intervalul 24D-6L/18D, asupra producerii de hidrogen. Modalitatea de eșantionare și de dozare a hidrogenului și a clorofilei sunt identice cu cele descrise anterior. Diferența a constat în durata timpilor de incubare la lumină sau întuneric (tabelul 5).

Tabelul 5

Eșantionarea culturilor cianobacteriene în vederea testării influenței diferitelor cicluri lumină/întuneric asupra producerii de hidrogen

Eșantion	Durată lumină (L)/întuneric (D) (h)
1	24D
2	1L/23D
3	2L/22D
4	3L/21D
5	4L/20D
6	5L/19D

Cantitatea de hidrogen dizolvat a variat în cele 6 eșantioane între 2,05 și 2,86 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ clorofilă. Maximul concentrației de H_2 dizolvat a fost atins folosind o cultură barbotată timp de 15 min cu argon și incubată timp de 1 h la lumină, urmată de 23 h la întuneric (fig. 7). Așadar, putem afirma că acest interval este optim atât în ceea ce privește productivitatea de hidrogen, cât și din punctul de vedere al aplicabilității biotehnologice, viabilitatea culturii celulare pe termen lung cel mai probabil nefiind afectată.

Influența variației pH-ului asupra producerii de hidrogen

Au fost obținute 8 culturi concentrate de *Anabaenopsis sp.* AICB 717, care au fost barbotate timp de 15 min cu argon, în vederea inducerii microaerobiozei. În timpul barbotării, a fost reglat pH-ul la o valoare prestabilită (tabelul 6), după care au fost prelevate 8 eșantioane a câte 4 repetiții de 4 ml fiecare, în fiole închise, cu un capac prevăzut cu un sept de silicon. Cele 6 eșantioane au fost incubate 1 h la lumină/23 h la întuneric, la temperatura camerei (22...23°C). Cantitatea de clorofilă și de hidrogen dizolvat au fost determinate în aceleași condiții descrise anterior.

Tabelul 6

Eșantionarea culturilor cianobacteriene în vederea testării influenței pH-ului asupra producerii de hidrogen

Eșantion	pH
1	6,5
2	7
3	7,5
4	8
5	8,5
6	9
7	9,5
8	10

RO 130066 B1

1 Cantitatea de hidrogen dizolvat a variat în cele 8 eșantioane între 2,03 și
3,20 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ clorofilă. Maximul concentrației de H_2 dizolvat a fost atins folosind o cultură
3 barbotată timp de 15 min cu argon și incubată la o valoare a pH -ului de 8, timp de 1 h la
lumină și 23 h la întuneric, la o temperatură de 22...23°C (fig. 8).

5 *Influența variației temperaturii asupra producerii de hidrogen*

7 Au fost obținute 2 culturi concentrate de *Anabaenopsis sp.* AICB 717, având în
vedere 2 scopuri: i) testarea viabilității la diferite temperaturi, exprimată prin cantitatea de
clorofilă determinată la 24 h după incubare; ii) testarea influenței temperaturii asupra
9 producerii de biohidrogen raportat la cantitatea de clorofilă. Culturile au fost barbotate timp
de 15 min cu argon, în vederea inducerii microaerobiozei. A fost reglat pH -ul la valoarea 8,
11 după care au fost prelevate 6 eșantioane a câte 4 repetiții de 4 ml fiecare, în fiole închise,
cu un capac prevăzut cu un sept de silicon. Cele 6 eșantioane au fost incubate 1 h la
13 lumină/23 h la întuneric la diferite temperaturi (tabelul 7). După cele 24 h, toate eșantioanele
au fost aduse la temperatura camerei (22...23°C) și a fost determinată cantitatea de clorofilă
15 și de hidrogen dizolvat în aceleași condiții descrise anterior.

17 *Tabelul 7*

19 *Eșantionarea culturilor cianobacteriene în vederea testării influenței temperaturii asupra producerii de hidrogen*

Eșantion	Temperatura (°C)
21 1	23
2	28
23 3	33
4	38
25 5	43
6	48

27 Cantitatea de clorofilă determinată din eșantioanele incubate 1 h la lumină/23 h la
29 întuneric, în condiții de microaerobioză, la pH 8, a prezentat o variație de sub 10% în inter-
valul 23...38°C, dar a scăzut cu 25...40% în eșantioanele incubate la 43...48°C (fig. 9).
31 Așadar, testarea influenței temperaturii asupra producerii de hidrogen a fost efectuată în
intervalul 23...38°C, cultura nefiind viabilă pe termen lung la 43...48°C.

33 Cantitatea de hidrogen dizolvat a variat în cele 4 eșantioane cu aproximativ 30%,
situându-se în intervalul 2,31 și 3,25 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ clorofilă, cea mai mare cantitate fiind obținută
35 prin incubare la 23°C (fig. 10).

37 **Bibliografie**

39 Antal T. K. și Lindblad, P. (2005) Production of H_2 by sulphurdeprived cells of the uni-
cellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis sp.* PCC 6803 during dark
41 incubation with methane or at various extracellular pH . *J Appl Microbiol*, 98:114-120.

43 Arnon D. I., (1949) Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenyloxidase in *Beta
vulgaris*. *Plant Physiol*, 24:1-15

45 Hegewald E., Jeeji-Bai, N., Hesse, M. (1975) Taxonomische und floristic Studien an
Planktonalgen aus ungarischen Gewässern. *Algol Stud*, 13:392-432.

RO 130066 B1

- Masukawa H., Nakamura K., Mochimaru M. și Sakurai H., (2001) Photobiological hydrogen production and nitrogenase activity in some heterocystous cyanobacteria, in J. Miyake, T. Matsunaga, and A. San Pietro (ed.), Biohydrogen II. Elsevier Science Ltd., Oxford, United Kingdom, p. 63-66. 1
3
- Mozeelaar R., Bijvank S. M. and Stal L. J., (1996) Fermentation and sulfur reduction in the mat-building cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*, Appl Environ Microbiol, 62:1752-1758. 5
7

RO 130066 B1

1

Revendicări

3

1. Tulpină de *Anabaenopsis sp.* AICB 717, depozitată la Culture Collection of Algae and Protozoa, UK cu numărul de depozit CCAP 1402/2, **caracterizată prin aceea că** prezintă o capacitate de producere a hidrogenului de maximum 3,25 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ clorofilă.

5

7

2. Procedeu de obținere a hidrogenului dizolvat folosind tulpina cianobacteriană *Anabaenopsis sp.* AICB 717 CCAP 1402/2, **caracterizat prin aceea că** se cultivă tulpina pe mediu de cultură BG-11 modificat, se concentrează cultura, se barbotează aceasta cu argon timp de 15 min pentru instalarea microaerobiozei, se reglează pH-ul la valoarea 8, urmată de incubarea în fiole închise ermetic, timp de 1 h, la o intensitate luminoasă de 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, și 23 h la întuneric, la temperatura de 23°C, ceea ce duce la creșterea cantității de hidrogen dizolvat de la 1,5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ clorofilă la 3,25 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ clorofilă.

11

(51) Int.Cl.

C12N 1/20^(2006.01);

C12P 3/00^(2006.01)

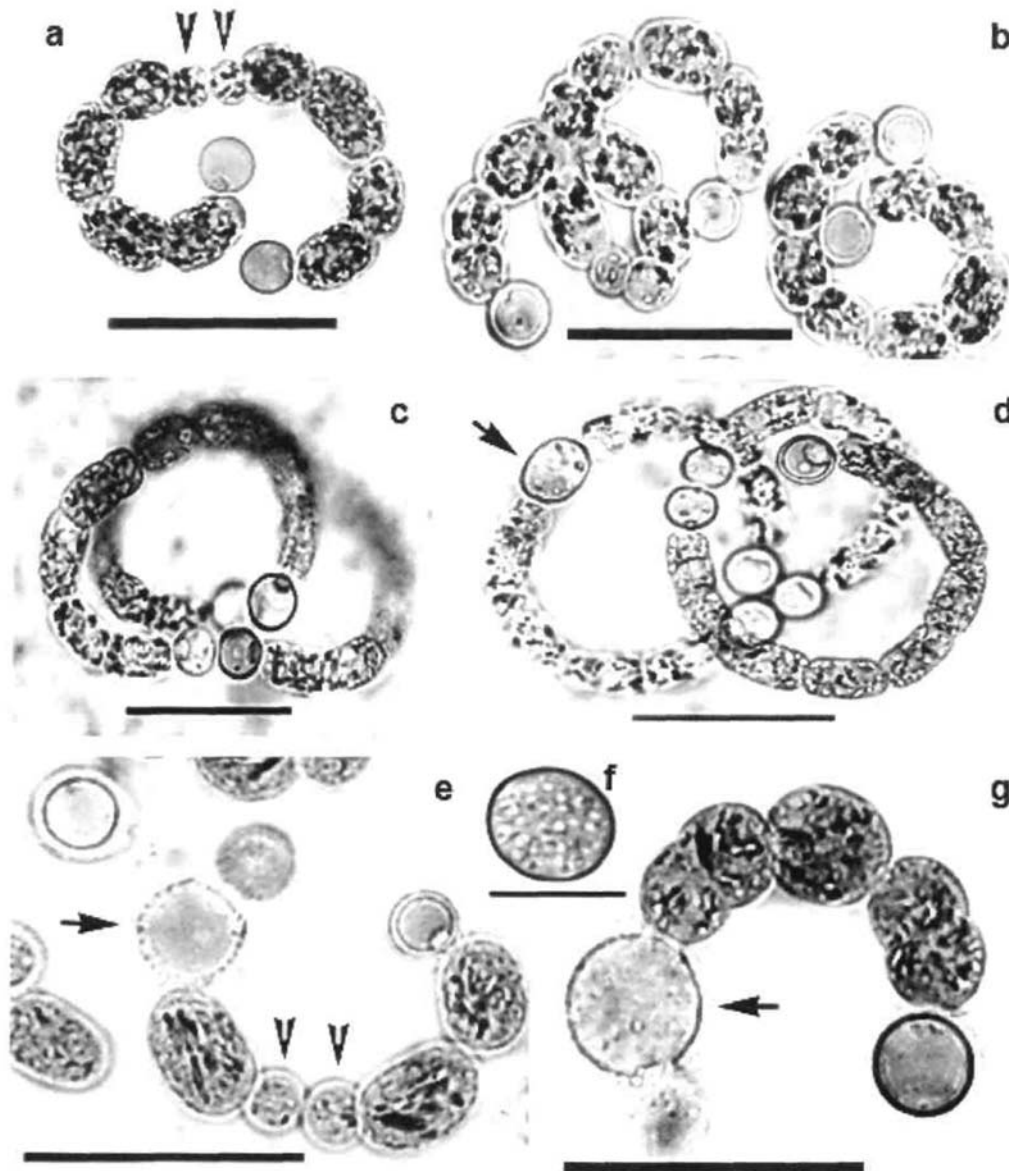


Fig. 1

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01),

C12P 3/00 (2006.01)

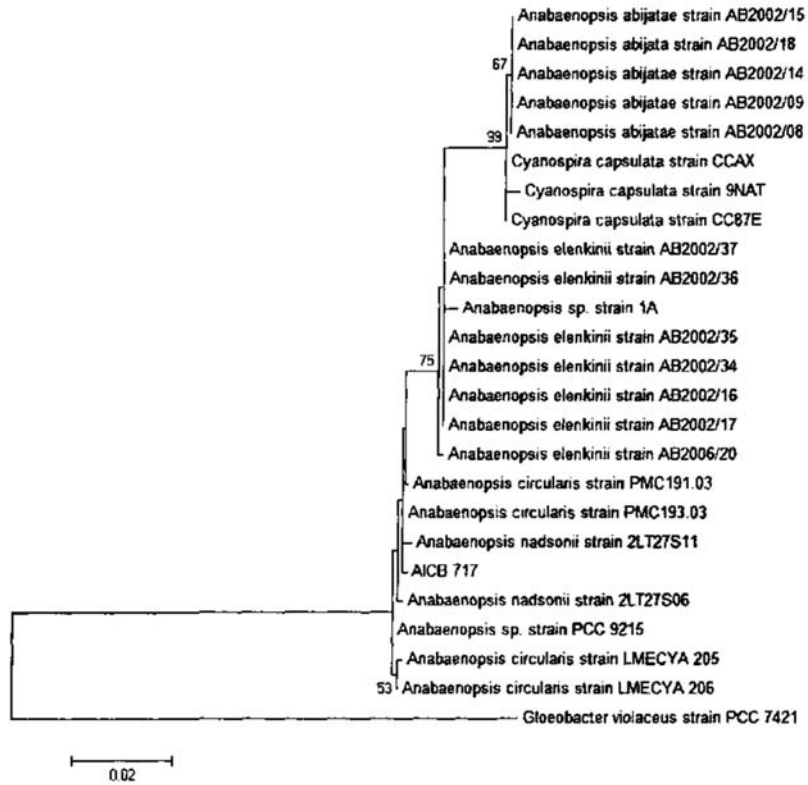


Fig. 2

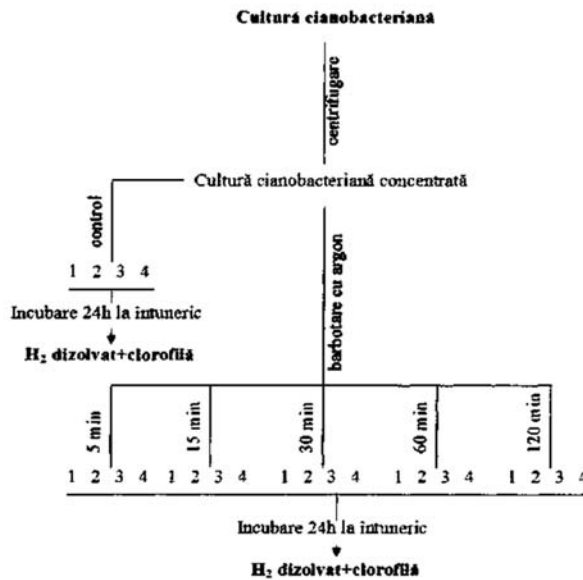


Fig. 3

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01);

C12P 3/00 (2006.01)

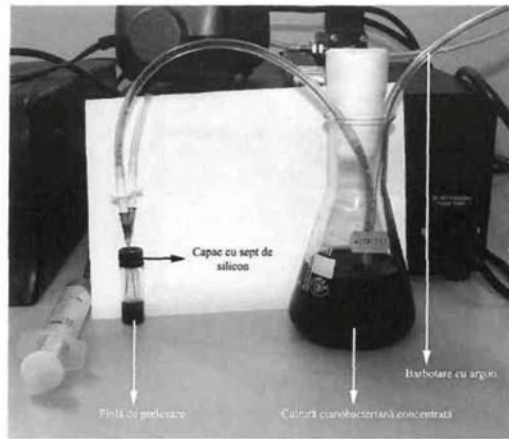


Fig. 4

AICB 717

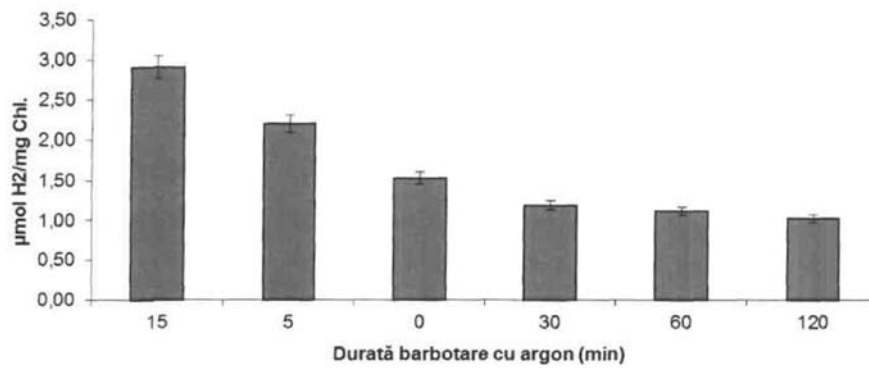


Fig. 5

AICB 717

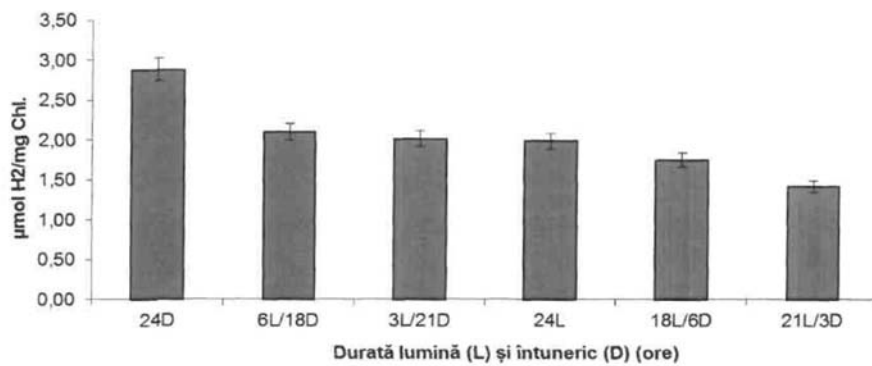


Fig. 6

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01);

C12P 3/00 (2006.01)

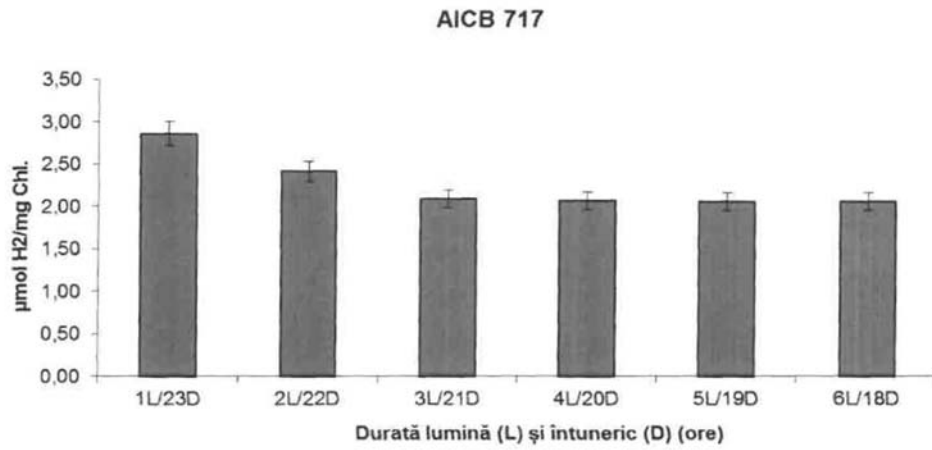


Fig. 7

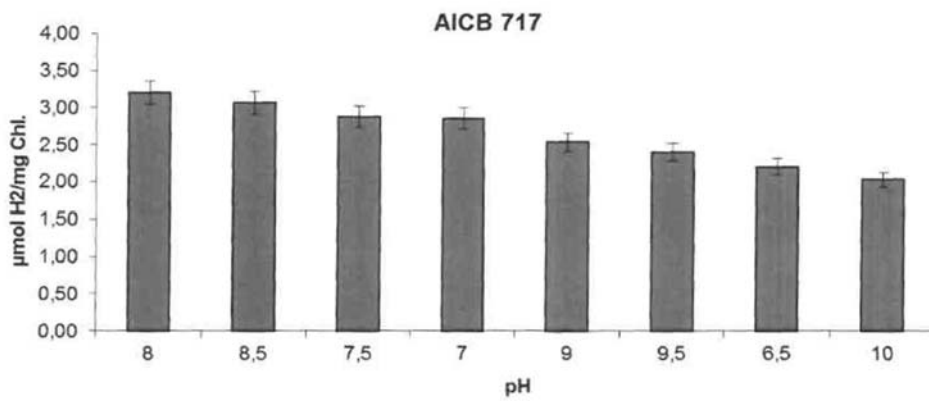


Fig. 8

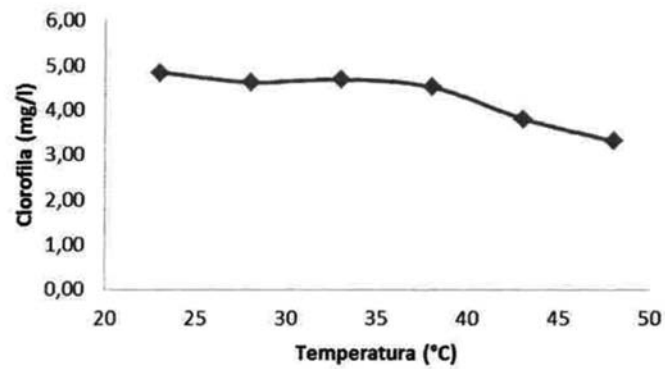


Fig. 9

(51) Int.Cl.

C12N 1/20^(2006.01);

C12P 3/00^(2006.01)

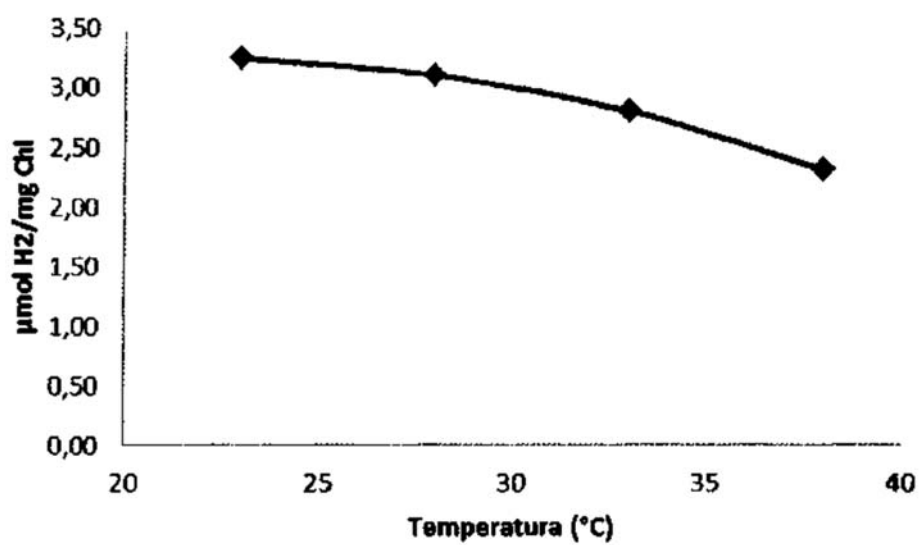


Fig. 10



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 386/2018