



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00091

(22) Data de depozit: 09/02/2016

(41) Data publicării cererii:  
30/08/2017 BOPI nr. 8/2017

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
INGINERIE ELECTRICĂ ICPE-CA,  
SPLAIUL UNIRII NR.313, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• LINGVAY IOSIF, BD.CHIȘINĂU NR.19,  
BL.A 5, SC.1, ET.10, AP.41, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• RADU LĂCRĂMIOARA- ELENA,  
ALEEA CRICOVUL DULCE NR. 5, BL. 16,  
SC. 2, ET. 4, AP. 39, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• CARAMITU ALINA RUXANDRA,  
ALEEA AV.STĂLPEANU NR.5, BL.5, SC.4,  
ET4, AP.40, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• MITREA SORINA ADRIANA,  
STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR. 6, BL. PM56,  
SC.1, ET. 8, AP. 30, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• OPRINA GABRIELA,  
STR.NICOLAE BĂLCESCU NR.40 A,  
CÂMPINA, PH, RO;  
• VOINA ANDREEA,  
STR. CETATEA DE BALTĂ NR. 139-143,  
BL. 6, SC. C, ET. 4, AP. 45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU PENTRU DETERMINAREA FRECVENȚELOR  
REPREZENTATIVE ÎN COMPORTAREA CELULELOR  
MICROBIENE ȘI ALGALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru determinarea frecvențelor reprezentative în comportarea celulelor microbiene și algaie. Procedeu constă într-o singură determinare de spectroscopie dielectrică a caracteristicilor dielectrice ale biomasei în domeniul 0,5...500 Hz, și prelucrarea datelor obținute, urmată de reprezentarea grafică a funcțiilor tangenta unghiului de pierderi în

funcție de frecvență, și variația specifică a tangentei unghiului de pierderi în funcție de frecvență, în care se marchează discontinuitățile, din care rezultă frecvențele caracteristice biomasei testate, cu o precizie de  $\pm 0,1\%$ .

Revendicări: 2  
Figuri: 4



## PROCEDEU PENTRU DETERMINAREA FRECVENTELOR REPREZENTATIVE ÎN COMPORTAREA CELULELOR MICROBIENE ȘI ALGALE

Invenția se referă la un procedeu de determinare a frecvențelor reprezentative pentru comportarea culturilor microbiene și algaie, a frecvențelor câmpului electric la care au loc modificări substanțiale în dezvoltarea și metabolismul acestora.

Este cunoscut faptul că, câmpurile electromagnetice aplicate culturilor microbiene și / sau algale pot avea influențe majore asupra dezvoltării acestora [1]. Funcție de frecvența și intensitatea câmpului electromagnetic aplicat aceste influențe pot fi pozitive (de stimulare a dezvoltării) sau negative (de inhibare a creșterii – degradarea membranelor celulare până la distrugerea acestora, sterilizarea biomasei tratate) [2]. Din modele de mecanism de acționare a câmpurilor electromagnetice asupra dezvoltării celulelor vii elaborate [1] rezultă că în domeniul câmpurilor de extremă joasă frecvență ELF (de obicei sub 500Hz) influențele sunt complexe și se datorează în primul rând atât proceselor de transfer ionic prin membranele/peretii celulare producând perturbații în proprietățile mecanice și electrice ale lanțurilor lipidice, procese ce au loc la diverse frecvențe bine determinate și specifice tipului de celule și a nutrienților din mediul de creștere.

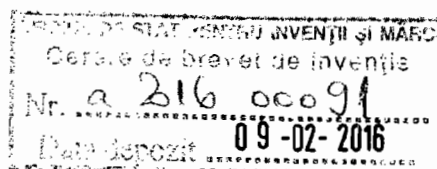
Sunt cunoscute procedeele microbiologice complexe prin care se fac determinări experimentale succesive la diverse frecvențe, forme de undă și intensități ale câmpului ELF aplicat, până la găsirea frecvenței la care se obțin modificările comportamentale / efectele microbiologice și/sau biochimice dorite [3, 4]. Aceste procedee prezintă dezavantajul că impun un volum extrem de mare de muncă și personal înalt calificat.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în determinarea rapidă și exactă a frecvențelor caracteristice ale ELF care aplicat în electro-bioreactoare produc modificări în comportamentul și biochimismul unei biomase date.

Procedeu pentru determinarea frecvențelor câmpului electric reprezentative în comportarea unei biomase date, conform invenției utilizează metoda (in sine cunoscută) a spectroscopiei dielectrice și înlătură dezavantajul menționat anterior, prin aceea că în loc de determinări microbiologice succesive pe biomase expuse la un câmp electric la câte o frecvență în tot domeniul ELF și monitorizarea eventualelor efecte, determinarea frecvențelor, la care în dezvoltarea și biochimismul materiei vii investigate au loc modificări, se realizează printr-o singură determinare de spectroscopie dielectrică, respectiv determinarea caracteristicilor dielectrice a biomasei investigate (componenta reală și imaginară a permitivității dielectrice, tangenta unghiului de pierderi) în domeniul 0,5 Hz – 500Hz și prelucrarea corespunzătoare a datelor obținute, urmată de reprezentarea grafică a funcțiilor  $tg \delta = F(f)$  (tangenta unghiului de pierderi în dielectru funcție de frecvență) și a  $\Delta tg \delta / \Delta f = F(f)$  (variația specifică a tangentei unghiului de pierderi dielectrice funcție de frecvență).

Procedeu pentru determinarea frecvențelor câmpului electric reprezentative pentru comportarea unei biomase date, la care în dezvoltarea celulelor vii din biomasă se produc modificări semnificative, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- determinarea se face rapid (un set de determinări durează maxim 30 minute);
- determinarea se poate face chiar și pe probe microbiologice mici (maxim 2 cm<sup>3</sup>);
- sensibilitate ridicată – se obțin rezultate precise chiar și pe probe cu conținut redus de celule vii – începând cu 0,1% masă celule vii în biomasă (celule vii+mediu de cultură = biomasă);
- precizie ridicată – frecvențele caracteristice biomasei investigate, conform invenției, se obțin cu o precizie mai bună de  $\pm 0,1\%$ ;



În continuare se prezintă două exemple de realizare a invenției în legătură cu **Figura 1** care prezintă evoluția comparativă a funcției  $tg\delta = F(f)$  pe celulele de *Aspergillus niger* crescute pe mediu de cultură tip Czapek-Dox cu zaharoză în diverse stadii de dezvoltare (36 și la 84 ore de incubare la  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) față de același mediu de cultură steril și **Figura 2**, care prezintă evoluția  $tg\delta = F(f)$  cu marcarea frecvențelor la care în comportarea celulelor de *Aspergillus niger* – crescute pe mediu de cultură tip Czapek-Dox cu zaharoză în diverse stadii de dezvoltare (36 și la 84 ore de incubare la  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) – se produc modificări semnificative, respectiv **Figura 3** care prezintă evoluția  $tg\delta = F(f)$  crescută pe mediu de cultură Czapek-Dox având ca nutrient amidon, după 84 ore de incubare la  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  și **Figura 4** în care se prezintă derivata funcției din Figura 3, respectiv evoluția  $\Delta tg\delta / \Delta f = F'(f)$  pe celulele de *Aspergillus niger* crescută pe mediu de cultură Czapek-Dox având ca nutrient amidon (după 40 ore de incubate la  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

Evoluția funcțiilor  $tg\delta = F(f)$  se stabilește prin metoda, în sine cunoscută, a spectroscopiei dielectrice și se obține prin reprezentarea grafică a rezultatelor înregistrărilor parametrilor dielectrice ai biomasei (celulele vii pe sau înglobate în mediul de cultură) introduse între electrozii celulei de măsurare a echipamentului de spectroscopie dielectrică, echipament ce este prevăzut cu un generator de semnal sinusoidal și un sistem automat de măsurare și înregistrare a permitivității, a conductivității și a defazajului semnalului de măsură aplicat pe mediul investigat. Echipamentul efectuează și înregistrează determinări succesive în domeniul frecvențelor de interes (uzual pentru culturi microbiologice între 0,5Hz și 200Hz) la frecvențe diferite ale semnalului de măsură, monoton crescătoare în pașii  $\Delta f$  ( $\Delta f$  – abaterea de frecvență între două determinări succesive cuprinsă între 5% și 0,1% din valoarea frecvențelor respective – în funcție de rezoluția urmărită) impuși prin programarea aparatului. Astfel se obțin pachete de date de măsură, care corespunzător prelucrate permit obținerea de diagrame ca în **figurile 1-4**.

În primul exemplu de realizare se prezintă rezultatele determinărilor de spectroscopie dielectrică, realizate la  $\Delta f=5\%$ , atât pe un mediu de cultură steril de tip Czapek-Dox (având compoziția 2g  $\text{NaNO}_3$ , 0,7g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5g  $\text{KCl}$ , 0,5g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01g  $\text{FeSO}_4$  în 1000mL apă distilată) având ca nutrient zaharoză (30g/1000mL), comparativ cu cele realizate pe același mediu de cultură inoculată (cca.  $10^5$ - $10^6$  spori/mL) cu *Aspergillus niger* în diverse stadii de dezvoltare a mușgaiului investigat (la 36 și la 84 ore de incubare la  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Din **figura 1** se constată că pe mediul de cultură steril evoluția funcției  $tg\delta = F(f)$  este monoton scăzătoare – nu prezintă discontinuități, ceea ce înseamnă că în mediul steril nu se produc procese chimice și/sau biochimice prin care să se modifice substanțial parametrii dielectrice ai reactanților întrate în proces față de cea a produșilor de reacție formați, precum și faptul că valorile  $tg\delta$  sunt relativ mari (cel puțin duble față de valorile înregistrate pe mediul cu creștere de *Aspergillus niger*) fapt ce se datorează mobilității libere (necon condiționate) a purtătorilor de sarcină (ionii rezultați prin disocierea sărurilor minerale adăugate mediului de cultură) în volumul probei investigate. Evoluțiile  $tg\delta = F(f)$  înregistrate pe același mediu de cultură inoculat cu spori de *Aspergillus niger* se constată mai multe discontinuități, respectiv variații mai bruște ale  $tg\delta$  funcție de frecvență, care se pun în evidență prin restrângerea reprezentării pe verticală (axa Y – până la valoare maximă a  $tg\delta = 0,01$ ) – **figura 2** din care se constată că funcție de stadiul de dezvoltare a biomasei (la 36 ore de incubare predomină procesul de formare a miceliului primar, spre deosebire de 84 de ore de incubare când predomină formarea și maturizarea fructificațiilor). Aceste discontinuități indică faptul că, la frecvențele respective pe de o parte se produc și se intensifică procesele/reacțiile chimice și/sau biochimice prin care se modifică substanțial parametrii dielectrice (componentele reale și imaginare ale permitivității dielectrice, precum și conductivitatea) ai reactanților întrate în proces față de cea a produșilor de reacție formați (de exemplu: reacții de condensare între grupările  $-\text{NH}_3^+$  și  $-\text{COO}^-$ ; reacții de complexare a ionilor metalici care reduc substanțial mobilitatea purtătorilor de sarcină din electrolit etc.), iar pe de o parte pot fi perturbate funcționarea pompelor ionice din membranele celulare, procese care au drept consecință modificări comportamentale în dezvoltarea culturilor microbiologice investigate. Aceste frecvențe caracteristice obținute pe mediile de cultură investigate,

Fig 1  
Fig 2  
Fig 3  
Fig 4

sunt marcate în **figura 2**, din care se constată că, în cazul *Aspergillus niger* crescut pe mediu Czapek-Dox și hrănit cu zaharoză, în stadiul de formare a miceliului primar dezvoltarea mușcăiului poate fi influențată cu un câmp electric de 1,8Hz, în stadiul de formare și maturizare a fructificațiilor cu un câmp electric de 2,9Hz, iar câmpurile electrice având frecvențele de 38,3Hz; 49,7Hz; 100Hz și 156,5Hz pot produce modificări comportamentale diferite în toate etapele de dezvoltare.

În al doilea exemplu de realizare se prezintă rezultatele determinărilor de spectroscopie dielectrică realizate pe celulele de *Aspergillus niger* crescută pe mediu de cultură Czapek-Dox având ca nutrient amidon (30g/1000mL), la 84 ore de incubare la  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  – la care datorită plăjei extinse a valorilor  $\text{tg}\delta$  înregistrate, în **figura 3**, se poate distinge o singură frecvență la care funcția  $\text{tg}\delta = F(f)$  prezintă discontinuități (1,5Hz), situație în care se procedează la derivarea funcției  $\text{tg}\delta = F(f)$  determinate experimental, adică a funcției  $\Delta\text{tg}\delta/\Delta f = F(f)$  care reprezintă evoluția funcție de frecvență a abaterilor valorilor  $\text{tg}\delta$  măsurate la două valori ale frecvenței semnalului de măsură succesive (**Figura 4**), procedură care permite identificarea frecvențelor la care câmpul electric aplicat biomasei investigate produce modificări în comportamentul/dezvoltarea acesteia. Astfel, din figura 4 se constată că dezvoltarea mușcăiului *Aspergillus niger* crescută pe mediu Czapek-Dox având ca nutrient amidon poate fi influențată prin suprapunerea mediului de creștere a unui câmp electric perturbator la următoarele frecvențe: 12,9Hz, 15,6Hz, 20,2Hz, 27,8Hz, 31,6Hz, 38,3Hz, 59,9Hz, 107Hz, 147Hz și 178Hz.

În mod similar cu primul și al doilea exemplu de realizare, determinarea frecvențelor reprezentative pentru comportarea culturilor microbiene și algale, a frecvențelor câmpului electric la care au loc modificări substanțiale în dezvoltarea și metabolismul acestora se poate realiza pentru orice mediu de cultură cu nutrienți diferiți și alte specii microbiologice, cu precizarea că în situațiile în care conținutul în celule vii a biomasei investigate este relativ mic (sub 1% din masa totală a probei), pentru determinarea/ marcarea frecvențelor reprezentative se va proceda la reprezentarea funcției  $\Delta\text{tg}\delta/\Delta f = F(f)$

Handwritten notes and signatures at the bottom right of the page, including a large signature and the name "C. M. M.".

**PROCEDEU PENTRU DETERMINAREA FRECVENȚELOR REPREZENTATIVE ÎN  
COMPORTAREA CELULELOR MICROBIENE ȘI ALGALE**

**REVEDICĂRI**

- 1) Procedeu de determinare a frecvențelor reprezentative pentru comportarea culturilor microbiene și algale care utilizează rezultatele determinărilor caracteristicilor dielectrice a biomasei prin metoda spectroscopiei dielectrice, *caracterizat prin aceea că*, valoarea frecvențelor reprezentative se obțin grafic prin marcarea discontinuităților pe diagrama de reprezentare a funcției  $\text{tg}\delta = F(f)$  obținute prin măsurători de spectroscopie dielectrică în domeniul frecvențelor cuprinse 0,5Hz și 200Hz cu pași de măsurare  $\Delta f$  cuprinși între 5% și 0,1%.
- 2) Procedeu de determinare a frecvențelor reprezentative pentru comportarea culturilor microbiene și algale, cu conținut relativ redus de celule vii în biomasă, conform revendicării 1, *caracterizat prin aceea că* valoarea frecvențelor reprezentative se obțin grafic prin marcarea discontinuităților pe diagrama de reprezentare a funcției  $\Delta\text{tg}\delta/\Delta f = F(f)$  obținute prin măsurători de spectroscopie dielectrică.

*[Handwritten signatures and initials]*

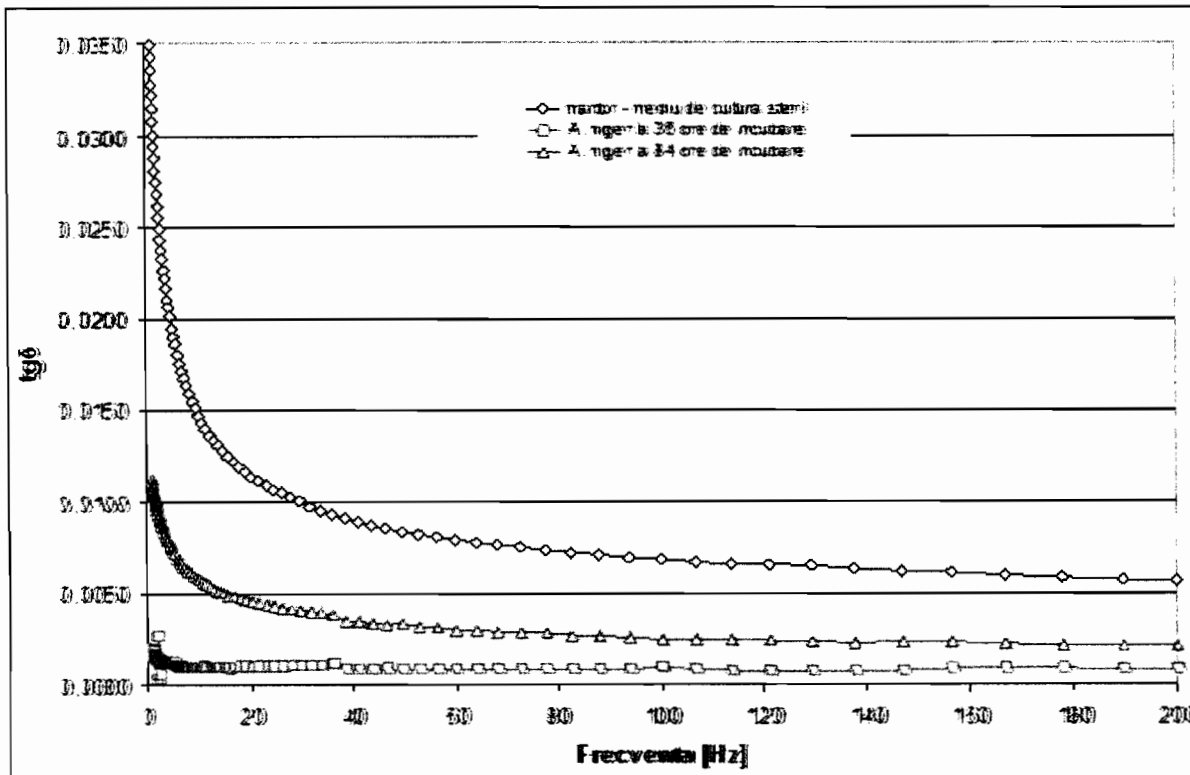


Figura 1. Evoluția  $tg\delta = F(f)$  – comparativ pe mediu de cultură steril și pe celulele de *Aspergillus niger* crescută pe mediu de cultură Czapek-Dox având ca nutrient zaharoză (36 și la 84 ore de incubare la  $30\pm 1$  °C)

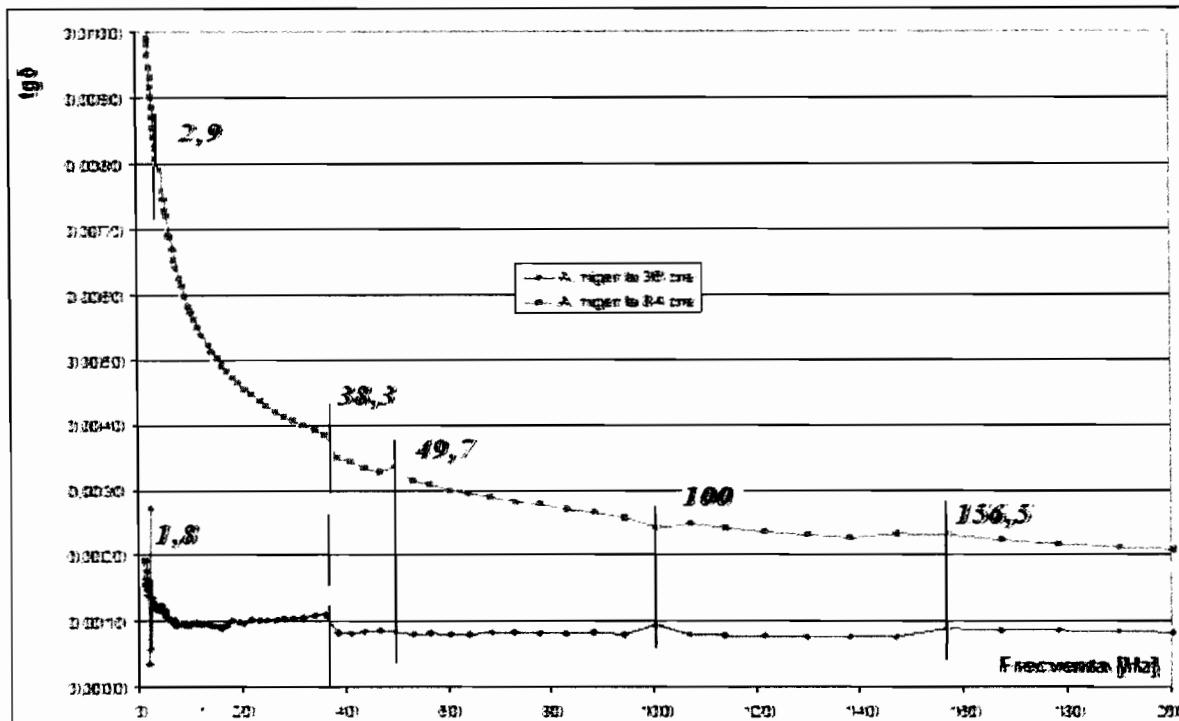


Figura 2. Evoluția  $tg\delta = F(f)$  pe celulele de *Aspergillus niger* crescută pe mediu de cultură Czapek-Dox având ca nutrient zaharoză (36 și la 84 ore de incubare la  $30\pm 1$  °C) – cu marcarea frecvențelor reprezentative.

Handwritten signatures and notes at the bottom right of the page, including names like 'Alina', 'Roc', and 'Shit'.

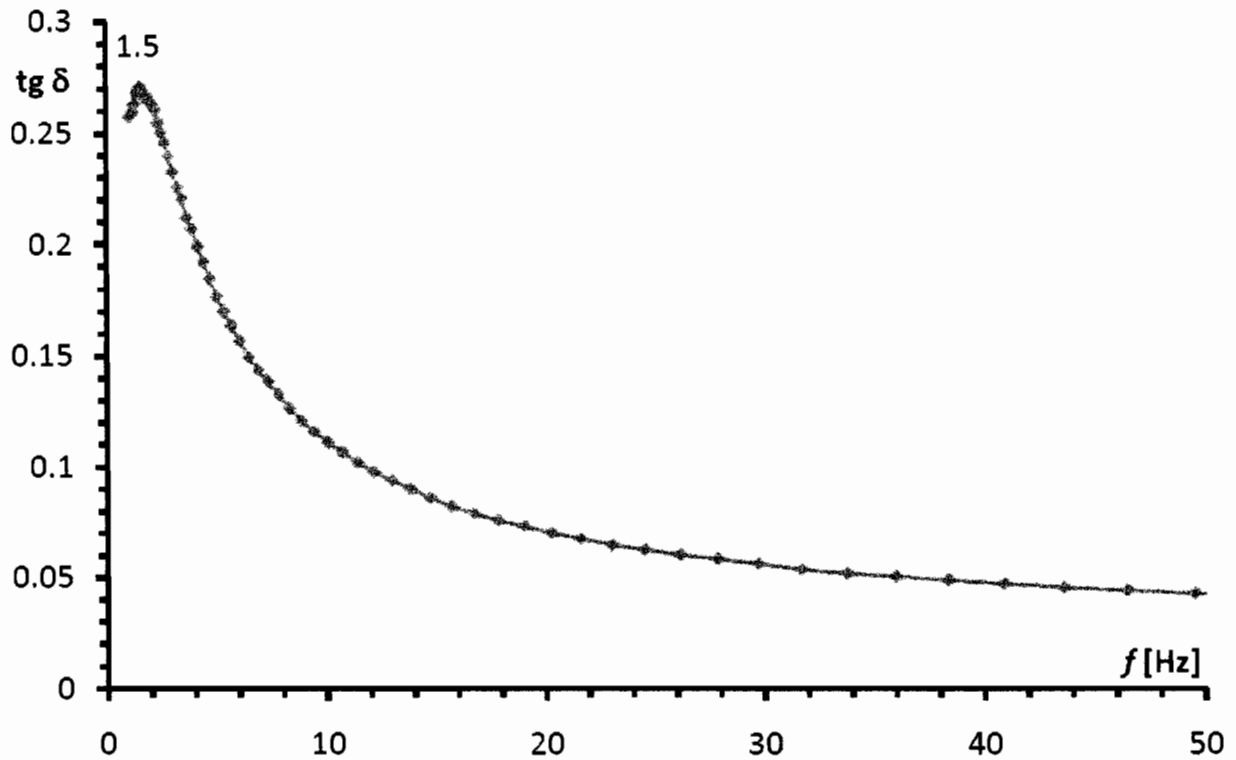


Figura 3. Evoluția  $tg\delta = F(f)$  pe celulele de *Aspergillus niger* crescute pe mediu de cultură Czapek-Dox având ca nutrient amidon, la 84 ore de incubare la  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$

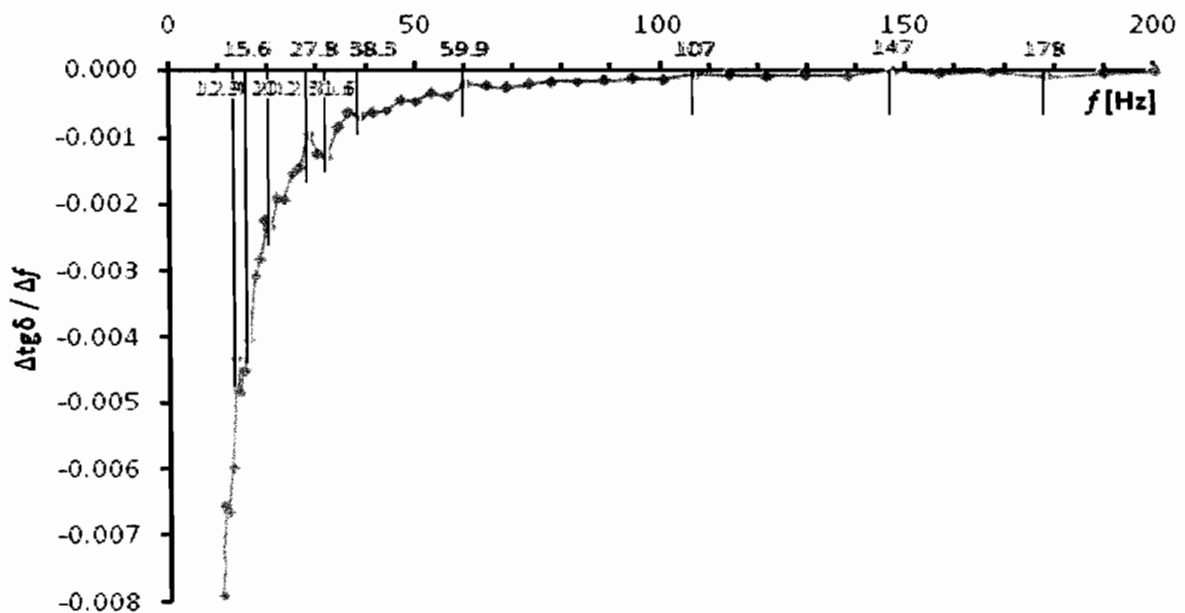


Figura 4. Evoluția derivatei  $\Delta tg\delta / \Delta f = F(f)$  pe celulele de *Aspergillus niger* crescute pe mediu de cultură Czapek-Dox având ca nutrient amidon (40 ore de incubare la  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) – cu marcarea frecvențelor reprezentative

Rec. C. Stănu  
 17/02/2016