



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00091**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/10/2022** BOPI nr. **10/2022**

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

(73) Titular:  
• **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  
BALȚĂ NR. 139-143, BL. 6, SC. C, ET. 4,  
AP. 45, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**CRISTINA STANCU ȘI AL., "INFLUENCE  
OF 50 HZ ELECTROMAGNETIC FIELD ON  
THE YEAST (SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE) METABOLISM", THE 8<sup>th</sup>  
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON  
ADVANCED TOPICS IN ELECTRICAL  
ENGINEERING, BUCHAREST, 2013;**  
**M. S. MASOUD ȘI AL., "DIELECTRIC  
SPECTROSCOPY OF SOME  
HETERONUCLEAR AMINO ALCOHOL  
COMPLEXES", SPECTROCHIMICA ACTA  
PART A, VOL. 65, PP. 127-132, 2006**

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



# RO 132117 B1

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

5           Este cunoscut faptul că, câmpurile electromagnetice aplicate culturilor microbiene  
și/sau algale pot avea influențe majore asupra dezvoltării acestora [1]. Funcție de frecvența  
7       și intensitatea câmpului electromagnetic aplicat, aceste influențe pot fi pozitive (de stimulare  
a dezvoltării) sau negative (de inhibare a creșterii - degradarea membranelor celulare până  
9       la distrugerea acestora, sterilizarea biomasei tratate) [2]. Din modele de mecanism de  
acționare a câmpurilor electromagnetice asupra dezvoltării celulelor vii elaborate [1] rezultă  
11      că în domeniul câmpurilor de extremă joasă frecvență ELF (de obicei sub 500 Hz) influențele  
sunt complexe și se datorează în primul rând proceselor de transfer ionic prin membranele/  
13      pereții celulari producând perturbații în funcționarea pompelor ionice și, implicit, modificarea  
proprietăților mecanice și electrice ale lanțurilor lipidice, procese ce au loc la diverse  
15      frecvențe bine determinate și specifice tipului de celule și a nutrienților din mediul de creștere  
[3, 4]. Pe de altă parte, aminoacizii care intră în procesele biochimice de sinteză a enzimelor  
17      și a proteinelor specifice materiei vii sunt molecule polare care, expuse în câmp electric  
alternativ, cu o frecvență dată, se orientează funcție de pulsațiile câmpului electric aplicat și  
19      răspunde prin mișcări oscilante, determinate de frecvența câmpului electric aplicat, de  
momentul dipol al moleculei date, volumul moleculei și vâscozitatea mediului. Prin molecula  
21      de aminoacid astfel agitată se reduce energia de activare și crește viteza procesului de  
sinteză biochimică în care participă [2].

23           Pe de altă parte, este cunoscut faptul că, prin expunere la câmp electric intens,  
membrana celulară este perforată prin străpungere electrică [6], iar la ELF de intensitate  
25      redușă (uzual sub 5 V/m biomasă), la anumite frecvențe distincte, se produc modificări în  
comportamentul dielectric al biomasei [5] și în metabolism, modificări care duc la stimularea  
semnificativă a creșterii și multiplicării microorganismelor [6].

27           De asemenea, sunt cunoscute procedeele pentru determinarea frecvențelor  
reprezentative ale câmpurilor ELF la care se produc modificări în comportamentul celulelor  
29      microbiene și care presupun analize și procedee microbiologice complexe, care prevăd  
determinări experimentale succesive la diverse frecvențe, forme de undă și intensități ale  
31      câmpului ELF aplicat, până la găsirea frecvenței la care se obțin modificările compor-  
tamentale/efectele microbiologice și/sau biochimice dorite [3, 4]. Aceste procedee prezintă  
33      dezavantajul că necesită materiale consumabile și echipamente cu costuri ridicate și impun  
un volum extrem de mare de muncă și personal înalt calificat.

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

39           Procedeul pentru determinarea frecvențelor câmpului electric reprezentative în  
comportarea unei biomase date, conform invenției, utilizează metoda (în sine cunoscută)  
41      spectroscopiei dielectrice și înlătură dezavantajul menționat anterior, prin aceea că în loc de  
determinări microbiologice succesive pe biomasă expuse la un câmp electric la câte o frec-  
43      vență din domeniul ELF și monitorizarea prin investigații microbiologice specifice a eventua-  
lelor efecte, determinarea frecvențelor, la care în dezvoltarea și biochimismul materiei vii  
45      investigate se pot produce modificări, se realizează printr-o singură determinare de spectro-  
scopie dielectrică, respectiv determinarea caracteristicilor dielectrice ale biomasei investigate  
(componenta reală și imaginară a permitivității dielectrice, tangenta unghiului de pierderi) prin  
47      aplicarea unui semnal de măsură în domeniul 0,5-200 Hz și prelucrarea corespunzătoare a  
datelor obținute, respectiv reprezentarea grafică a funcțiilor  $\text{tg } \delta = F(f)$  (tangenta unghiului

# RO 132117 B1

de pierderi în dielectric funcție de frecvență), iar în cazul biomaselor cu un conținut redus de sub 1% de celule vii a funcției  $\Delta \text{tg } \delta / \Delta f = F(f)$  (variația specifică a tangentei unghiului de pierderi dielectrice funcție de frecvență). 1  
3

Procedeul 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: 5

- determinarea se face rapid (un set de determinări durează maximum 30 min); 7
- determinarea se poate face chiar și pe probe microbiologice mici (maximum 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); 9  
11
- precizie ridicată - frecvențele caracteristice biomasei investigate, conform invenției, se obțin cu o precizie mai bună de  $\pm 0,1\%$ . 13

În continuare, se prezintă două exemple de realizare a invenției în legătură cu fig. 1..4, respectiv: 15

- fig. 1, care prezintă evoluția comparativă a funcției  $\text{tg } \delta = F(f)$  pe celulele de *Aspergillus niger* crescute pe mediu de cultură tip Czapek-Dox cu zaharoză în diverse stadii de dezvoltare (la 36, respectiv 84 h de incubare la  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) față de același mediu de cultură steril; 17  
19

- fig. 2, care prezintă evoluția  $\text{tg } \delta = F(f)$  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 (la 36, respectiv 84 h de incubare la  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) - se produc modificări semnificative; 21  
23

- fig. 3, care prezintă evoluția  $\text{tg } \delta = F(f)$  crescută pe mediu de cultură Czapek-Dox având ca nutrient amidon, după 84 h de incubare la  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 25

- fig. 4, în care se prezintă derivata funcției din fig. 3, respectiv evoluția  $\Delta \text{tg } \delta / \Delta f = F(f)$  pe celulele de *Aspergillus niger* crescută pe mediu de cultură Czapek-Dox având ca nutrient amidon (după 40 h de incubate la  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ). 27

Evoluția funcțiilor  $\text{tg } \delta = F(f)$  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 0,5 Hz și 200 Hz) 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 fig. 1..4. 29  
31  
33  
35  
37  
39  
41

Aplicarea metodei spectroscopiei dielectrice, utilizată uzual pentru caracterizarea dielectrică a materialelor, - inclusiv a materiei vii, pentru determinarea frecvențelor reprezentative în comportarea culturilor microbiene și algale, conform invenției, presupune că, câmpul electric produs pe celula vie investigată prin aplicarea semnalului de măsură să fie suficient de mici pentru a nu provoca modificări ireversibile în funcționarea membranei celulare, ceea ce impune ca tensiunea semnalului de măsură aplicat pentru determinarea caracteristicilor dielectrice să fie suficient de mare pentru a asigura o măsurare a parametrilor dielectrice, dar 43  
45  
47

# RO 132117 B1

1 să fie mai mică decât valoarea la care se produc modificări ireversibile în funcționarea  
membranei celulare. În aceste condiții, valoarea tensiunii trebuie să fie de sub 50% din  
3 potențialul membranei celulelor vii conform invenției.

În primul exemplu de realizare se prezintă rezultatele determinărilor de spectroscopie  
5 dielectrică, realizate la  $\Delta f = 5\%$ , atât pe un mediu de cultură steril de tip Czapek-Dox (având  
compoziția 2 g  $\text{NaNO}_3$ , 0,7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g KCl, 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01  
7 g  $\text{FeSO}_4$  în 1000 mL apă distilată) având ca nutrient zaharoză (30 g/1000 mL), comparativ  
cu cele realizate pe același mediu de cultură inoculată (circa  $10^5$ - $10^6$  spori/mL) cu *Aspergillus*  
9 *niger* în diverse stadii de dezvoltare a mucegaiului investigat (la 36, respectiv 84 h de  
incubare la  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) având un conținut masic în celule vii de circa 2%. Din fig. 1 se constată  
11 că pe mediul de cultură steril evoluția funcției  $\text{tg}\delta = F(f)$  este monoton descrescătoare - nu  
prezintă discontinuități, ceea ce înseamnă că în mediul steril nu se produc procese chimice  
13 și/sau biochimice prin care să se modifice substanțial parametrii dielectrice ai reactanților  
intrați în proces față de cea a produșilor de reacție formați, precum și faptul că valorile  $\text{tg}\delta$   
15 sunt relativ mari (cel puțin duble față de valorile înregistrate pe mediul de creștere cu  
*Aspergillus niger*) fapt ce se datorează mobilității libere (necondiționate) a purtătorilor de  
17 sarcină (ionii rezultați prin disocierea sărurilor minerale adăugate mediului de cultură) în  
volumul probei investigate. Evoluțiile  $\text{tg}\delta = F(f)$  înregistrate pe același mediu de cultură  
19 inoculat cu spori de *Aspergillus niger* prezintă mai multe discontinuități, respectiv variații mai  
bruste ale  $\text{tg}\delta$  funcție de frecvență, care se pun în evidență prin restrângerea reprezentării  
21 pe verticală (axa Y - până la valoare maximă a  $\text{tg}\delta = 0,01$ ) - fig. 2 din care se constată că  
frecvențele la care apar discontinuitățile sunt funcție de stadiul de dezvoltare a biomasei  
23 respectiv la 36 h de incubare predomină procesul de formare a miceliului primar, spre  
deosebire de 84 h de incubare când predomină formarea și maturizarea fructificațiilor. Aceste  
25 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  
27 parametrii dielectrice (componentele reale și imaginare ale permitivității dielectrice, precum  
și conductivitatea) ai reactanților intrați în proces față de cea a produșilor de reacție formați  
29 (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  
31 pe de altă parte poate fi perturbată funcționarea pompelor ionice din membranele celulare,  
procese care conduc la modificări comportamentale în dezvoltarea culturilor microbiologice  
33 investigate. Aceste frecvențe caracteristice obținute pe mediile de cultură investigate, sunt  
marcate în fig. 2, din care se constată că, în cazul *Aspergillus niger* crescut pe mediu  
35 Czapek-Dox și hrănit cu zaharoză, în stadiul de formare a miceliului primar, dezvoltarea  
mucegaiului poate fi influențată cu un câmp electric de 1,8 Hz, în stadiul de formare și  
37 maturizare a fructificațiilor cu un câmp electric de 2,9 Hz, iar câmpurile electrice având  
frecvențele de 38,3 Hz; 49,7 Hz; 100 Hz și 156,5 Hz pot produce modificări comportamentale  
39 diferite în toate etapele de dezvoltare.

În al doilea exemplu de realizare se prezintă rezultatele determinărilor de spec-  
41 troscopie dielectrică realizate pe celulele de *Aspergillus niger* crescute pe mediu de cultură  
Czapek-Dox având ca nutrient amidon (30 g/1000 mL), la 84 h de incubare la  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  - la  
43 care datorită plajei extinse a valorilor  $\text{tg}\delta$  înregistrate și a conținutului de celule vii de sub  
0,2% în biomasa investigată, în fig. 3, se poate distinge o singură frecvență la care funcția  
45  $\text{tg}\delta = F(f)$  prezintă discontinuități (1,5 Hz), 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  
47 funcție de frecvență a abaterilor valorilor  $\text{tg}\delta$  măsurate la două valori ale frecvenței  
semnalului de măsură succesive (fig. 4), procedură care permite identificarea frecvențelor

# RO 132117 B1

la care câmpul electric aplicat biomasei investigate produce modificări în comportamentul/dezvoltarea acesteia chiar pe medii cu conținut redus de cellule vii. Astfel, din fig. 4 se constată că dezvoltarea mucegaiului *Aspergillus niger* crescut pe mediu Czapek-Dox având ca nutrient amidon poate fi influențată prin suprapunerea mediului de creștere a unui câmp electric perturbator la următoarele frecvențe: 12,9 Hz, 15,6 Hz, 20,2 Hz, 27,8 Hz, 31,6 Hz, 38,3 Hz, 59,9 Hz, 107 Hz, 147 Hz și 178 Hz.

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  $\Delta \text{tg} \delta / \Delta f = F(f)$ .

## Bibliografie

- [1] Barnabas Gikonyo, PhD "*Advances in Biofuel Production - Algae and Aquatic Plants*", Apple Academic Press, Toronto New JERSEY 2014. (Capitolul 6. - pag. 155-212). 17
- [2] Ryan W. Hunt, Andrey Zavalin, Ashish Bhatnagar, Senthil Chinnasamy and Keshav C. Das, "*Electromagnetic Biostimulation of Living Cultures for Biotechnology, Biofuel and Bioenergy Applications*", Int. J. Mol. Sci. 2009, (10), pp. 4515-4558. 19
- [3] Li Z.-Y.; Guo S.-Y.; Lin L.; Cai M.-Y. "*Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of Spirulina platensis in an air-lift photobioreactor*", Bioresour. Technol. 2007, 98, 700-705. 21
- [4] Zrimec A.; Jerman L.; Lahajnar G. "*Alternating electric fields stimulate ATP synthesis in Escherichia coli. Cell.*" Mol. Biol. Lett. 2002, 7, 172-174. 25
- [5] C. Stancu, M. Lingvay, I. Szatmari and I. Lingvay, "*Influence of 50 Hz electromagnetic field on the yeast (saccharomyces cerevisiae) metabolism*", 2013, 8<sup>th</sup> International Symposium On Advanced Topics In Electrical Engineering (ATEE), 2013, pp. 1-4, doi: 10.1109/ATEE.2013.6563449. 27
- [6] E. Radu, D. Lipcinski, N. Tănase, I. Lingvay, "*Influența câmpului electric de 50 Hz asupra dezvoltării culturilor de Aspergillus niger*", The influence of the 50 Hz electric field on the development and maturation of *Aspergillus niger*, EEA- Electrotehnica, Electronica, Automatizări, Vol. 63, Nr. 3, 2015, pp. 68-74. 31

# RO 132117 B1

## Revendicări

1

3

1. Procedeu de determinare a frecvențelor reprezentative pentru comportarea culturilor microbiene și algale, care utilizează un câmp electric în domeniul frecvențelor ELF de mică intensitate, care nu periclitează integritatea membranelor celulare, **caracterizat prin aceea că**, valoarea frecvențelor reprezentative rezultă prin reprezentarea grafică a rezultatelor experimentale obținute prin tehnica spectroscopiei dielectrice realizate cu un semnal de măsură în domeniul 0,5 și 200 Hz, la frecvențe diferite monoton crescătoare în pași de măsurare  $\Delta f$  cuprinși între 5% și 0,1%, urmată de trasarea funcției  $F$  de variație a pierderilor dielectrice  $\text{tg}\delta$  funcție de frecvență  $f$ , respectiv a curbei  $\text{tg}\delta = F(f)$  pe care se identifică și se marchează frecvențele la care  $\text{tg}\delta$  prezintă variații bruște, discontinuități care indică modificări reprezentative în biochimismul culturilor microbiene și algale.

5

7

9

11

13

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**, în scopul creșterii sensibilității, valoarea frecvențelor reprezentative se obține grafic prin marcarea discontinuităților pe curba de reprezentare a funcției de variație a abaterilor specifice în frecvență a pierderilor dielectrice  $\Delta\text{tg}\delta/\Delta f$  funcție de frecvență  $f$ , respectiv a curbei  $\Delta\text{tg}\delta/\Delta f = F(f)$  obținute prin tehnica spectroscopiei dielectrice în domeniul frecvențelor ELF, uzual cuprinse între 0,5 și 200 Hz.

15

17

19

(51) Int.Cl.

G01N 27/00 (2006.01),

G01N 33/483 (2006.01)

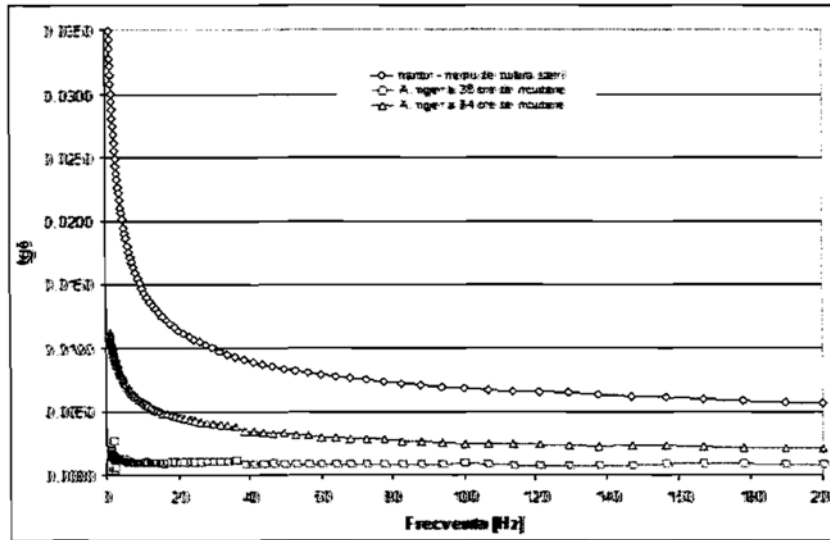


Fig. 1

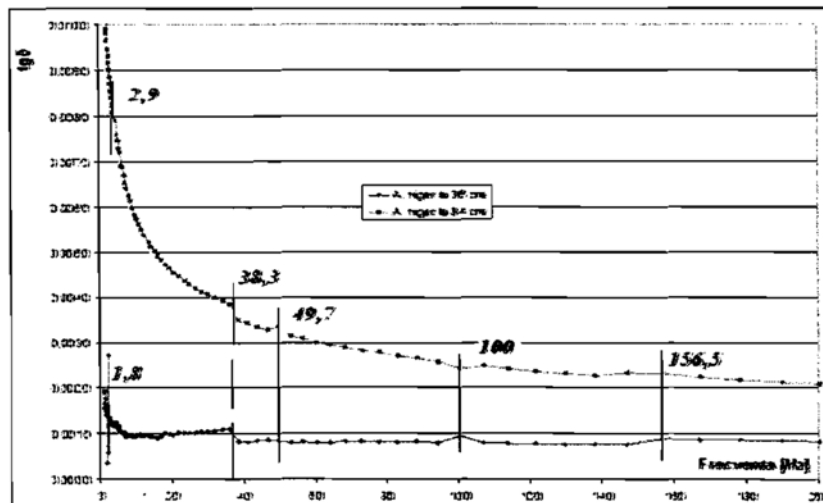


Fig. 2

(51) Int.Cl.

G01N 27/00 (2006.01);

G01N 33/483 (2006.01)

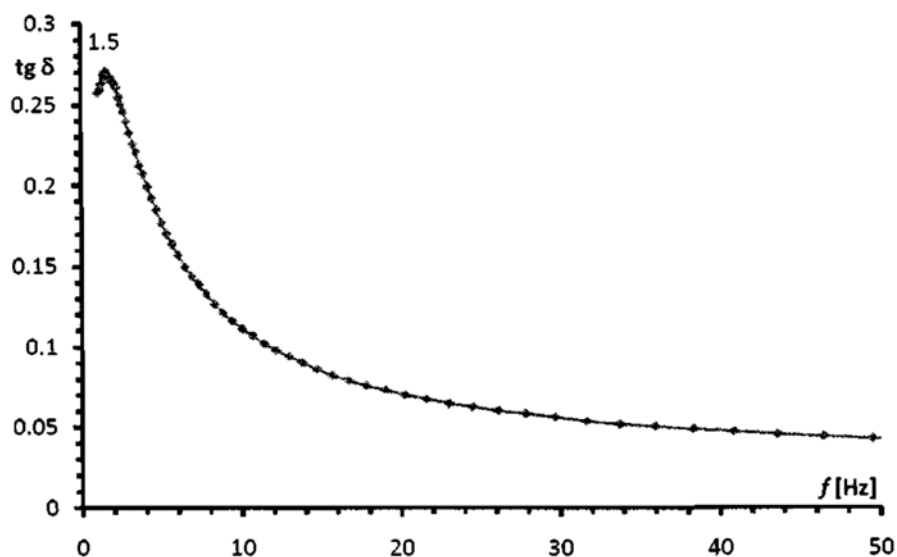


Fig. 3

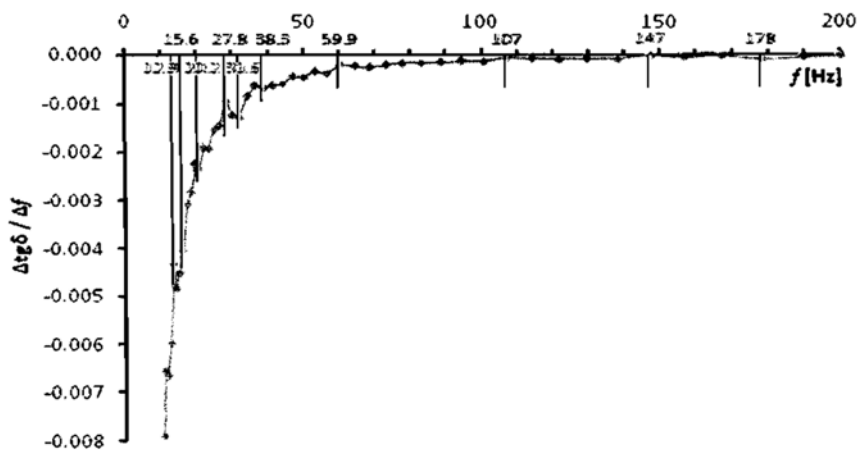


Fig. 4



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 459/2022