



MD 4320 C1 2015.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4320** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12Q 1/06* (2006.01)
G01N 21/00 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2013 0076 (22) Data depozit: 2013.10.17	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.01.31, BOPI nr. 1/2015
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: ZOSIM Liliana, MD; BULIMAGA Valentina, MD; OLAN Olga, MD; PISOV Maria, MD; RUDIC Valeriu, MD; COJOCARI Angela, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de determinare a cantității biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la ficobiotehnologie, în special la un procedeu de determinare a cantității biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*, și poate fi utilizată în agricultură, industriile farmaceutică și cosmetică.

Procedeul, conform invenției, constă în aceea că se separă biomasa de lichidul cultural prin filtrare, apoi ea se spală cu o soluție de acetat de amoniu, se suspensionează în apă

2

distilată, se filtrează printr-un filtru cu porii de 0,3...0,5 mm, se suspensionează repetat în apă distilată, se măsoară densitatea optică la lungimea de undă de 590 sau 700 nm, iar cantitatea de biomasă se calculează prin înmulțirea valorilor obținute cu coeficienții de recalcul 0,84 sau 0,89, respectiv.

Revendicări: 1

MD 4320 C1 2015.08.31

(54) Process for determining the amount of *Nostoc linckia* cyanobacterium biomass

(57) Abstract:

1
The invention relates to phycobiotechnology, particularly to a process for determining the amount of *Nostoc linckia* cyanobacterium biomass, and can be used in agriculture, pharmaceutical and cosmetic industries.

The process, according to the invention, consists in that is separated the biomass from the culture liquid by filtration, then it is washed with an ammonium acetate solution, is

2
suspended in distilled water, is filtered through a filter with pores of 0.3...0.5 mm, is re-suspended in distilled water, is measured the optic density at the wavelength of 590 or 700 nm, and the amount of biomass is determined by multiplying the obtained results by the recalculation coefficients 0.84 or 0.89, respectively.

Claims: 1

(54) Способ определения количества биомассы цианобактерии *Nostoc linckia*

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к фикобиотехнологии, в частности к способу определения количества биомассы цианобактерии *Nostoc linckia*, и может быть использовано в сельском хозяйстве, фармацевтической и косметологической промышленности.

Способ, согласно изобретению, состоит в том что отделяют биомассу от культуральной жидкости путём фильтрации, затем её промывают раствором ацетата аммония, суспендируют в

2
дистиллированной воде, фильтруют через фильтр с порами 0,3...0,5 мм, суспендируют повторно в дистиллированной воде, измеряют оптическую плотность при длине волны 590 или 700 нм, а количество биомассы определяют путём умножения полученных результатов на перерасчётные коэффициенты 0,84 или 0,89, соответственно.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la ficobiotehnologie, în special la un procedeu de determinare a cantității biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*, și poate fi utilizată în agricultură, industriile farmaceutică și cosmetică.

Densitatea optică este folosită ca un parametru indirect de determinare a cantității de biomasă în suspensii celulare microbiene. Absorbanța luminii (densitatea optică) a unei suspensii poate fi direct proporțională cu densitatea celulară și folosirea unei curbe standard adecvate poate permite determinarea biomasei unei tulpini algale sau cianobacteriene. Cu toate acestea, varierea conținutului de pigmenți în celule poate influența asupra exactității determinărilor.

Este cunoscut un procedeu de determinare a ratei de creștere a biomasei tulpinilor *Nostoc linckia*, la fiecare 4 zile pe o perioadă de 20 zile, prin măsurarea valorilor densității optice la 560 nm [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în utilizarea lungimii de undă de 560 nm, la care interferează pigmentul ficoeritrina, al cărui maximum de absorbție se atinge la această lungime de undă, ceea ce duce la obținerea unor valori cantitative mai înalte ale biomasei.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este elaborarea unui procedeu de determinare a biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*, care să asigure o precizie mai înaltă la determinarea biomasei după densitatea optică.

Esența invenției constă în faptul că se separă biomasa de lichidul cultural prin filtrare, apoi ea se spală cu o soluție de acetat de amoniu, se suspensionează în apă distilată, se filtrează printr-un filtru cu porii de 0,3...0,5 mm, se suspensionează repetat în apă distilată, se măsoară densitatea optică la lungimea de undă de 590 sau 700 nm, iar cantitatea de biomasă se calculează prin înmulțirea valorilor obținute cu coeficienții de recalcul 0,84 sau 0,89, respectiv.

Rezultatul tehnic obținut constă în diminuarea erorii și majorarea preciziei de determinare a biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*.

Rezultatul tehnic se datorează posibilității utilizării a două lungimi de undă, astfel se previne aportul interferenței pigmentilor cu diminuarea erorii de determinare, totodată se efectuează omogenizarea suspensiei de cianobacterie prin filtrare printr-un filtru cu porii de 0,3...0,5 mm, ceea ce măsoară precizia măsurărilor.

Exemplu de realizare a invenției

Cianobacteria *Nostoc linckia* a fost cultivată pe mediul nutritiv cunoscut Gromov 6 în decurs de 14 zile, după care biomasa a fost separată de lichidul cultural prin filtrare și spălată cu soluție de 2,5% acetat de amoniu într-un raport de volum de 1:2. Biomasa obținută a fost filtrată printr-un filtru cu porii de 0,3...0,5 mm pentru omogenizare. Au fost preparate probe de biomasă în câteva diluții prin suspensionare în apă distilată și s-a măsurat densitatea optică la 590 și 700 nm. Paralel s-au uscat câte 5 ml de fiecare probă la 105°C până la masă constantă pentru a determina biomasa absolut uscată. Rezultatele obținute au fost incluse în tabelul 1.

Tabelul 1

Dependența densității optice de cantitatea biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia* colectată în a 14-a zi de cultivare

Metoda utilizată	*BAU prin cântărire, mg/10 ml	*Densitatea optică		*Coeficient de recalcul, Biomasa(mg/ml)/densitatea optică (DO)	
		590 nm	700 nm	K ₅₉₀	K ₇₀₀
Conform soluției propușe în invenție	3,0	0,344	0,319	0,871	0,900
	4,0	0,462	0,433	0,866	0,913
	4,25	0,523	0,491	0,812	0,869
	6,0	0,706	0,667	0,849	0,896
	6,5	0,787	0,751	0,826	0,867
	7,25	0,860	0,832	0,843	0,871
	7,5	0,902	0,861	0,831	0,872
	8,75	0,992	0,952	0,882	0,921
				Val. medie	Val. medie
				0,840	0,890

*p≤0,05

Valorile coeficienților de recalcul K_{590} și K_{700} reprezintă raportul dintre biomasa determinată prin cântărire (mg/ml) și densitatea optică la lungimile de undă de 590 și 700 nm, respectiv. Biomasa cianobacteriei după densitatea optică se determină conform ecuației:

$$m(\text{mg/ml}) = K_{590} \cdot \text{DO}_{590} \text{ sau } m(\text{mg/ml}) = K_{700} \cdot \text{DO}_{700}, \text{ unde:}$$

5 K_{590} și K_{700} – valorile medii ale coeficienților de recalcul la 590 și 700 nm, respectiv;

DO_{590} și DO_{700} – densitățile optice ale biomasei la 590 și 700 nm, respectiv.

Eroarea de determinare a biomasei conform procedurii propus în invenție (vezi tab. 2), după valoarea densității optice la 590 și 700 nm și conform celei mai apropiate soluții (560 nm) a fost calculată conform ecuației: eroarea ($\pm\%$) = $(m_2 - m_1) \cdot 100\% / m_1$,

10 unde: m_1 – biomasa absolut uscată determinată prin cântărire;

m_2 – biomasa determinată după valoarea densității optice.

Tabelul 2

Compararea procedeele de determinare a biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*

Nr. probei analizate	Conform celei mai apropiate soluții			Conform soluției propuse în invenție				
	**BAU după DO^* 560 nm	Eroarea, $\pm\%$	**BAU prin cântărire, mg/10 ml	**BAU după DO^*		Eroarea, $\pm\%$		**BAU prin cântărire, mg/10 ml
				590 nm	700 nm	590 nm	700 nm	
1	6,45	50,00	4,30	4,80	4,70	11,63	9,30	4,30
2	7,25	61,11	4,50	4,90	5,00	8,89	11,11	4,50
3	7,35	59,78	4,60	5,00	5,10	8,70	10,87	4,60
4	12,10	34,44	9,00	9,70	10,0	7,78	11,11	9,00
5	13,25	42,47	9,30	10,20	10,30	9,68	10,75	9,30
6	15,05	44,71	10,40	11,20	11,50	7,69	10,58	10,40

*Notă: DO - densitatea optică; ** $p \leq 0,05$

15 Eroarea de determinare a biomasei în cazul soluției propuse în invenție la 590 și 700 nm are valori mai diminuate și este în limitele de 7,69...11,63% și, respectiv, 9,3...11,1% comparativ cu eroarea de determinare a biomasei la 560 nm în cazul celei mai apropiate soluții, care se află în intervalul de 34,44...61,11%.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. G.V.N.S. Deviram, R. Gyana Prasuna. Effect of fungicides on proline content of *Nostoc* sp. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2012, 3(4), p. 152-157

(57) Revendicări:

Procedeu de determinare a cantității biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*, care constă în aceea că se separă biomasa de lichidul cultural prin filtrare, apoi ea se spală cu o soluție de acetat de amoniu, se suspensionază în apă distilată, se filtrează printr-un filtru cu porii de 0,3...0,5 mm, se suspensionază repetat în apă distilată, se măsoară densitatea optică la lungimea de undă de 590 sau 700 nm, iar cantitatea de biomasă se calculează prin înmulțirea valorilor obținute cu coeficienții de recalcul 0,84 sau 0,89, respectiv.

Șef Direcție Brevete:

GUȘAN Ala

Șef Secție Examinare:

GROSU Petru

Examinator:

LUPĂȘCU Lucian

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2013 0076

(22) Data depozit: 2013.10.17

(71) Solicitant: **UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD**

(54) **Titlul: Procedeu de determinare a cantității biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia***

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *C12Q 1/06* (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): “nostoc linckia”, “determinarea biomasei algale”

Int.Cl: *C12Q 1/06* (2006.01), *G01N 21/00* (2006.01), *C12N 1/12* (2006.01)

"Worldwide" (Espacenet): “nostoc linckia”, “algal biomass determination”

Int.Cl: *C12Q 1/06* (2006.01), *G01N 21/00* (2006.01), *C12N 1/12* (2006.01)

EA, CIS (Eapatis): “nostoc linckia”, “определение биомассы водорослей”

Int.Cl: *C12Q 1/06* (2006.01), *G01N 21/00* (2006.01), *C12N 1/12* (2006.01)

SU (nonpublic): “nostoc linckia”, “определение биомассы водорослей”

Int.Cl: *C12Q 1/06* (2006.01), *G01N 21/00* (2006.01), *C12N 1/12* (2006.01)

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

<http://asm.md/administrator/fisiere/rapoarte/f22.pdf>

https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file/Activitatea%20antiradicalica%20a%20extractelor%20din%20cianobacteria%20Nostoc%20Linckia%20pe%20durata%20ciclului%20vital.pdf

http://www.researchgate.net/publication/49637476_Hydrogen_production_and_metal-dye_bioremoval_by_a_Nostoc_linckia_strain_isolated_from_textile_mill_oxidation_pond

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1029/2006GL027819/pdf>

Becker G., Holfeld H., Hasselrot A.T., Fiebig D.M., Menzler D.A. Use of a microscope photometer to analyze in vivo fluorescence intensity of epilithic microalgae grown on artificial substrata. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63(4), p.1318-1325.

Sharma Mona, Anubha Kaushik, C.P. Kaushik. Prolonged hydrogen production by Nostoc in photobioreactor and multi-stage use of the biological waste for column biosorption of some dyes and metals. Biomass and Bioenergy, 54 (2013), 27-35

Sharma Mona, Anubha Kaushik, C. P. Kaushik. Waste biomass of *Nostoc linckia* as adsorbent of crystal violet dye: Optimization based on statistical model. Department of Environmental Science and Engineering, Guru Jambheshwar University of Science & Technology, Hisar-125001, India International Biodeterioration & Biodegradation - Int Biodeterior Biodegrad 01/2011; 65(3):513-521.

Liliana Cepoi, Ludmila Rudi, Vera Miscu, Angela Cojocari, Tatiana Chiriac, Daniela Sadovnic. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. Analele universităţii din oradea, fascicula biologie, tom. xvi / 2, 2009, p. 43-48

Bala Kiran, Nisha Rani and Anubha Kaushik. Chromium (VI) tolerance in two halotolerant strains of Nostoc. Journal of Environmental Biology, 2008, 29(2), p. 155-158

Serrano A., Losada M. Action spectra for nitrate and nitrite assimilation in blue-green algae. Plant Physiol., 1988, 86(4), p. 1116-1119.

Diao Y, Yang Z. Evaluation of morphological variation and biomass growth of *Nostoc commune* under laboratory conditions. Journal of Environmental Biology / Academy of Environmental Biology, India, 2014, 35(3), p. 485-489

Serrano A, Losada M. Action spectra for nitrate and nitrite assimilation in blue-green algae. Plant Physiol., 1988, 86(4), p. 1116-1119.

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 3297 F1 2007.04.30	1
A	SU 01180366 A1 1985.09.23	1
A	MD 230 Y 21010.06.30	1
A	MD 2368 C2 2004.01.31	1
A	MD 2409 C2 2004.0□.31	1
A	MD 3101 G2 2006.07.31	1
A	MD 3128 G2 2007.04.30	1
A	MD 3780 G2 2008.12.31	1
A	MD 3781 G2 2008.12.31	1
A	MD 4108 C1 2011.04.30	1
A, D, C	G.V.N.S. Deviram, R. Gyana Prasuna. Effect of fungicides on proline content of Nostoc sp. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2012, 3(4), p. 152-157	1

* categoriile speciale ale documentelor citate:

A – document care defineşte stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorităţii invocate, care nu aparţine stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidenţă principiul sau teoria pe care se bazează invenţia
X – document de relevanţă deosebită: invenţia revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când	E – document anterior dar publicat la data depozit naţional reglementar sau după aceasta dată

documentul este luat în considerație de unul singur	
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării	20.11.2014
Examinator	LUPAȘCU Lucian