



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01374

(22) Data de depozit: 09.12.2011

(41) Data publicării cererii:
30.08.2013 BOPI nr. 8/2013

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• DRAGOȘ NICOLAE, STR. MUSCEL NR.4,
ET. 4, AP.9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• ROVINARU CAMELIA,
CALEA FERENTARI NR.3, BL.75, ET.7,
AP.29, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• BICA ADRIANA, STR. FLORILOR NR. 164,
SC. 2, AP. 24, SAT FLOREȘTI,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) TULPINĂ DE *CHLORELLA HOMOSPHAERA*, CU
PLASTICITATE ECOTEHNOLOGICĂ

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Chlorella homosphaera*, depusă la Culture Collection of Algae and Protozoa, cu numărul de depozit CCAP 211/121, care este destinată utilizării în procesele industriale de fixare a bioxidului de carbon din diferitele emisii gazoase sau pentru epurarea apelor uzate. Tulpina conform invenției prezintă o competență ridicată de colonizare a nișelor ecotehnologice specifice, datorită unei viteze de creștere de peste 0,275 OD/zi și a unui timp de dublare sub 4 zile, formează fitocenoză cu

eficiență ridicată în fixarea bioxidului de carbon și rezistă la concentrații de bioxid de carbon de 7% și peste, și tolerează concentrații ridicate de săruri, în special, carbonat și bicarbonat de sodiu, are capacitatea de a crește împreună cu bacterii benefice, pentru formarea de consorții microbiene, care se pot utiliza pentru reducerea nivelului de azot și fosfor din apele uzate, epurate.

Revendicări: 1



TULPINA DE *CHLORELLA HOMOSPHERA* CU PLASTICITATE ECOTEHNOLOGICĂ

Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Chlorella homosphaera* destinată utilizării în procesele industriale de fixare a bioxidului de carbon din diferitele emisii gazoase sau pentru epurarea apelor uzate.

Sunt cunoscute o serie întreagă de tulpini de *Chlorella*, selectate pentru diferite utilizări practice. Brevetul EP 1 142 985 descrie tulpina M-207A7 de *Chlorella*, obținută prin selecție mutatorie, care este capabilă să crească în medii care conțin 1% și peste clorură de sodiu, acumulând cantități de 4% și peste clorofilă în substanță uscată.

Cererea de brevet US 2010 / 00297292 se referă la o tulpină mutantă de *Chlorella prothecoides*, depozitată cu numărul PTA-10396 la American Type Culture Collection (ATCC), care are un conținut de cel puțin 16% trigliceride cu acizi grași nesaturați și cel puțin 40% proteine. Tulpina are un conținut redus de pigmenți asimilatori, carotenoizi și clorofilă, și este destinată ca supliment pentru îmbunătățirea calităților nutritive ale diferitelor alimente cărora pigmenții algali le-ar putea reduce acceptanța.

O problemă tehnică semnificativă, în cazul aerării mediului de cultură al algelor cu emisii industriale, în special gaze de ardere, este cea a rezistenței tulpinilor algale la concentrații ridicate de CO₂, NO_x și SO_x. Brevetul JP 3757325 prezintă tulpina HO-1 de *Chlorella sorokiana*, rezistentă la aerare cu gaze conținând 5...20% bioxid de carbon, 200 ppm SO_x, 50 ppm NO_x. Brevetul KR 100265034 (publicat și ca JP 3013990) expune o nouă tulpină de *Chlorella*, KR-1, depozitată sub numărul KCTC 0426BP, care este rezistentă la aerare cu gaze conținând 10...70% bioxid de carbon și 0...250 ppm bioxid de sulf.

În cazul utilizării tulpinilor de micro-alge în procesele de epurare a apelor uzate este necesar ca acestea să reziste diferiților poluanți existenți în aceștia. Cererea de brevet US 2010/002198 protejează o tulpină de *Chlorella* care aparține unei specii noi, identificată taxonomic, prin existența în genomul său a unei secvențe specifice de nucleotide. Această tulpină aparținând unei noi specii este utilizată pentru cultivare în medii cu 5% ape uzate, aerate cu emisii de gaze poluante provenite din procesele de epurare.

În condiții de cultivare industrială, în special în cazul incintelor deschise, tulpinile de *Chlorella* selectate pentru utilizări practice trebuie prezinte și: (i) o capacitate mare de concurență cu alte microorganisme fotosintetizante; și (ii) abilitatea de a forma consorții simbiotice cu efecte practice benefice, în special cu bacteriile care cresc în același mediu cu algele (bacteriile de ficosferă). La nici una din tulpinile descrise până în prezent nu au fost revendicate astfel de proprietăți, care să asigure în final colonizarea nișei ecotehnologice, cu formare de microbiocenoze algale industriale cu productivități ridicate. Prezenta invenție se referă la o tulpină de



[Handwritten signature]

Chlorella homosphaera 424, depozitată sub numărul CCAP 211/121 la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), SAM Research Services Ltd., Scottish Marine Institute, Aryll, UK). Tulpina prezintă o competență ridicată de colonizare a nișelor ecotehnologice specifice datorită unei viteze ridicate de creștere, de peste 0,275 OD/zi și a unui timp scurt de dublare, de sub 4 zile. Tulpina formează ficocenoze cu eficiență ridicată în fixarea bioxidului de ardere din emisii industriale sau în epurarea apelor uzate. Tulpina rezistă la concentrații de 7% și peste bioxid de carbon în gazele de aerare și tolerează concentrații ridicate de săruri, în special $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$. Are capacitatea de a crește împreună cu bacterii benefice, putând fi utilizată în consorții pentru epurarea apelor uzate.

Tulpina de *Chlorella homosphaera* 424 prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Capacitate ridicată de a sechestra cantități semnificative de CO_2 , în soluții nutritive minerale.
- ✓ Tolerarea concentrațiilor mari de $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$, care asigură o „interfață” fizico-chimică favorabilă pentru chemosorbția CO_2 în mediul de cultură, și a unor concentrații mari a speciilor de carbon anorganic dizolvat în mediul de cultură;
- ✓ Conversie ridicată a componentelor mediilor de creștere și a bioxidului de carbon în biomasă algală;
- ✓ Acumularea de lipide și alți compuși utili, cum sunt de exemplu carbohidrații, pe tot parcursul creșterii culturii algale.

Prezenta invenție se ilustrează prin următorul exemplu.

Exemplu. Tulpina de *Chlorella homosphaera* 424 a fost izolată dintr-o cultură semi-industrială de *Arthrospira platensis*, în aer liber, pe mediu nutrient Zarouch cu 16,8 g/L NaHCO_3 . Tulpina se caracterizează prin celule solitare sau dispuse în perechi, această dispunere sugerând o diviziune celulară precedentă. Forma este sferică sau subsferică, uneori ovală, polimorfismul fiind datorat atât condițiilor de creștere cât și ciclului de viață. În stadii îmbătrânite poate forma un strat de mucilagiu la suprafața celulelor. Celule sunt mici (4-5 μm mature, 1,5-3 μm autosporii). Reproducerea are loc fie prin diviziune mitotică simplă, fie prin formarea de autosporii ca urmare a 2 diviziuni succesive în interiorul peretelui celular al celulei parentale. Resturile pereților celulari parentali sunt prezente în suspensiile celulare și sunt vizibile în microscopia optică. Organizarea celulară este simplă, pereții celulari fără ornamentații aparente, cloroplastul unic este dispus parietal și este aparent lipsit de pirenoid. Tulpina crește bine pe un mediu nutritiv nespecific clorocococalelor și anume în mediul Zarrouk, tolerând variații mari ale pH în domeniul bazic (7,4-10).

Tulpina a fost selectată din colecția de microlage a Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca AICB, prin creștere pe mediu nutrient Zarouch cu 16,8 g/L NaHCO_3 . Selecția tulpinii din colecție a fost fundamentată pe baza următoarelor criterii: (i) capacitatea tulpinilor de a consuma cantități semnificative de CO_2 , în soluții nutritive complete minerale; (ii) tolerarea unor concentrații mari $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$, care



asigură o „interfață” fizico-chimică favorabilă pentru chemosorbția CO₂ în mediul de cultură: (iii) rate de creștere mari și timp de dublare scurt; (iv) randamente mari de obținere a biomasei algale; (v) acumularea de lipide și alți compuși valoroși pe parcursul creșterii culturilor.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1, tulpina *Chlorella homosphaera* 424 având rata de creștere exponențială cea mai mare și timpul de dublare cel mai scurt dintre tulpinile testate în condițiile experimentale date.

Tab.1. Rate de creștere și timpul de dublare al tulpinilor microalgale testate.

Nr. crt.	Tulpina	Denumirea taxonului	Rata de creștere exponențială (unit. OD/zi)	Timpul de dublare (zile)
1	AICB 25	<i>Chlorella fusca</i> Shihira et Krauss	0,088	11,33
2	AICB 166	<i>Chlorella fusca</i> Shihira et Krauss	0,253	3,95
3	AICB 170	<i>Chlorella fusca</i> Shihira et Krauss	0,120	8,31
4	AICB 272	<i>Chlorella fusca</i> Shihira et Krauss	0,213	4,70
5	AICB 292	<i>Chlorella fusca</i> Shihira et Krauss	0,262	3,81
6	AICB 425	<i>Chlorella fusca</i> Shihira et Krauss	0,138	7,27
7	AICB 638	<i>Chlorella fusca</i> Shihira et Krauss	0,114	8,79
8	AICB 424	<i>Chlorella homosphaera</i> Skuja	0,278	3,59
9	AICB 431	<i>Chlorella kessleri</i> Fott et Novakova	0,143	7,01
10	AICB 427	<i>Chlorella lobophora</i> Andreeva	0,122	8,17
11	AICB 307	<i>Chlorella luteoviridis</i> Chodat	0,134	7,45
12	AICB 570	<i>Chlorella luteoviridis</i> Chodat	0,229	4,36
13	AICB 396	<i>Chlorella saccharophila</i> (Kruger) Migula	0,151	6,62
14	AICB 27	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck	0,049	20,32
15	AICB 58	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck var. <i>autotrophica</i> Shihira et Krauss	0,065	15,38
16	AICB 103	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck	0,116	8,59
17	AICB 104	<i>Chlorella vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> Beijerinck f. <i>viride</i> Chodat	0,131	7,62
18	AICB 311	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck	0,083	12,08
19	AICB 329	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck	0,117	8,53
20	AICB 555	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck	0,066	15,04
21	AICB 565	<i>Chlorella</i> sp.	0,151	6,61
22	AICB 57	<i>Coelastrum astroideum</i> De Notaris	0,060	16,62
23	AICB 639	<i>Coelastrum astroideum</i> De Notaris	0,169	5,92
24	AICB 751	<i>Coelastrum astroideum</i> De Notaris	0,063	15,83
25	AICB 773	<i>Coelastrum</i> sp.	0,085	11,72
26	AICB 818	<i>Coelastrum</i> sp.	0,121	8,26
27	AICB 15	<i>Chlorobotris simplex</i>	0,065	15,87
28	AICB 152	<i>Chlorococcum hypnosporum</i> Starr	0,086	11,65
29	AICB 480	<i>Chlorococcum hypnosporum</i> Starr	0,193	5,19
30	AICB 408	<i>Chlorococcum infusionum</i> (Schrank) Meneghini in Schosser	0,093	10,80
31	AICB 43	<i>Chlorococcum minutum</i> Starr	0,109	9,18
32	AICB 579	<i>Chlorococcum robustum</i> (Gartner)	0,130	7,70
33	AICB 160	<i>Choricystis guttula</i> Hindak	0,094	10,63
34	AICB 125	<i>Monoraphidium griffithii</i> (Berkeley)	0,085	11,76
35	AICB 337	<i>Porphyridium purpureum</i>	0,102	16,23
36	AICB 141	<i>Scenedesmus opoliensis</i> P. Richter	0,061	16,47
37	AICB 51	<i>Synechocystis</i> sp.	0,0963	10,21



Tulpina *Chlorella homosphaera* 424 a fost cultivată într-un sistem integrat fotosintetizator original, descris pe larg în cererea de brevet A00288-2009. În esență acest sistem fotosintetizator original este compus dintr-un corp central sub formă de cuvă deschisă la partea superioară, în care sunt amplasate un număr variabil de celule de fotosinteză, legate în paralel prin conducte de alimentare cu soluții nutritive (sau soluții nutritive + masă algală sau masă algală adusă la stadiul de creștere exponențială), respectiv prin conducte de alimentare cu gaze având conținut variabil de dioxid de carbon. Deasupra cuvei fotobioreactorului se află amplasat sistemul de iluminare. Sistemul fotobioreactor integrat îmbină avantajele sistemului deschis de tip iaz, cu cele ale sistemului cu plăci plane, putând fi încadrat în clasa fotobioreactoarelor hibride. Tulpina *C. homosphaera* 424, cu rate ridicate de creștere, a fost considerată tulpina cu caracteristici optime de creștere în acest fotobioreactor original, datorită ratei sale de creștere și a timpului de dublare.

Pentru testarea creșterii tulpinii s-au încărcat celulele de fotosinteză cu mediu de cultură Zarouch cu 16,8 g/L NaHCO_3 și inoculul proaspăt preparat, în raport volumetric 9:1. Încărcarea s-a făcut până la umplerea celulelor de fotosinteză, astfel încât fluidul alimentat să deverseze în bioreactor, peste deversoarele de prea-plin. S-a cuplat sistemul de iluminare și apoi s-au introdus prin conducta de alimentare amestecul de gaze cu dioxid de carbon, vehiculate de suflanta S8, cu un debit prestabilit, care să permită barbotarea și să mențină o bună agitare a suspensiei în celulele de fotosinteză.

S-au măsurat zilnic, prin prelevare de probe următorii parametri: a) turbiditatea exprimată prin densitatea optică (unitati OD); măsurătorile au fost efectuate pe un aparat model TURB 550/TURB 550 IR, PROLABMAS, Indonezia; b) coeficientul de extincție ϵ ($\epsilon = 678$ nm); măsurătorile au fost înregistrate pe un spectrofotometru model UV-VIS Specord M400 Karl Zeiss Jena cu microprocesor și dublu fascicol și cuve $L=1$ cm; c) pH-ul și temperatura; a fost folosit un pH-metru model MultiLine P3 pH/LF, prevăzut cu sonda de temperatură, WTW GmbH Germania; d) concentrația CO_2 și raportul $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$; determinările au fost făcute prin analiză chimică; e) concentrația azotului în mediul de cultura și în biomasa; determinările au fost făcute prin analiză chimică; f) concentrația biomasei în mediul de cultură (g/L); determinările au fost făcute prin analiză gravimetrică; g) concentrația fosforului în mediul nutritiv (ppm); determinările au fost făcute prin analiză spectrometrică de emisie atomică cu plasmă cuplată inductiv (ICP); h) conținutul de carbon, hidrogen, azot și sulf, din biomasa algală uscată; determinările au fost făcute prin analiză elementală pe un aparat Perkin-Elmer 2400 Series II CHNS/O Analyser.

Parametrii procesului de creștere și parametrii sistemului de nutriție înregistrați pentru cultura tulpinii *Chlorella homosphaera* 424 sunt prezentați în tabelul 2 și confirmă rata mare de creștere și timpul de dublare scurt, care reprezintă baza unei plasticități tehnologice ridicate.



Tab.2. Parametrii procesului de creștere și parametrii sistemului de nutriție pentru *Chlorella homosphaera* 424

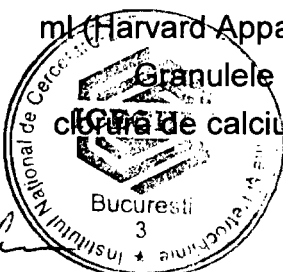
Timpu (zile)	OD	ϵ 678 nm	pH	T (°C)	NaHCO ₃ (%)	Na ₂ CO ₃ (%)	Biomasa (g/L)	P _{mediu} (ppm)	N _{cons.} (ppm)	C _{biomasa} (%)	H _{biomasa} (%)	N _{biomasa} (%)	S _{biomasa} (%)
0	0,02	0,0965	8,73	25	14,11	1,91	0,03	48,6	389	48,33	8,05	11,64	1,55
1	0,06	0,1165	8,16	25	12,77	2,44	0,12	45,2	373	46,29	7,81	11,08	1,38
2	0,16	0,1602	8,21	25	13,61	2,33	0,56	41,7	355	47,71	7,87	11,41	1,61
3	0,57	0,5690	8,38	25	14,62	2,01	1,10	35,5	308	48,17	8,13	11,87	1,44
4	0,95	3,9271	8,82	25	14,87	1,96	1,73	30,8	254	47,44	8	11,79	1,37
5	1,30	6,3490	8,29	25	15,54	1,64	2,73	26,2	203	46,74	7,92	11,58	1,46
6	1,55	9,3455	7,89	25	15,37	1,64	3,10	20,9	141	48,07	7,92	11,96	1,40
7	1,77	12,8375	7,81	25	13,52	3,77	3,26	15,2	79,8	47,75	8,01	11,52	1,49
8	1,88	13,9775	7,62	25	14,55	2,68	3,43	12,7	57	47,37	7,85	11,88	1,39
9	1,93	14,0475	7,51	25	16,80	2,23	3,60	7,7	24,5	47,02	8,07	11,73	1,45
10	1,98	14,2150	7,52	25	15,96	1,48	3,55	4,1	9,4	46,72	7,85	12,02	1,45
11	1,97	14,2155	7,48	25	14,62	1,85	3,55	1,2	3,5	46,62	7,89	11,78	1,40

Tulpina *Chlorella homosphaera* 424 a acumulat 30,3% proteine, 16,2% carbohidrați și 23,8% lipide. Acumularea de proteine și lipide face ca această tulpină să fie utilă atât pentru producere de ulei algal cu utilizări industriale (biocombustibili) cât și pentru biomasă proteică cu utilizări ca furaj, în special în acvacultură.

Prin co-immobilizarea microalgelor cu cea a bacteriilor din genul *Azospirillum* s-a dovedit creșterea capacității microalgelor de a reduce conținutul de azot și fosfor din apele uzate, datorită acumulării suplimentare de biomasă (de-Bashan *et al.*, 2004, Hernandez *et al.*, 2006). Tulpina *Chlorella homosphaera* 424 a fost co-immobilizată cu tulpina SF12 de *Azospirillum lipoferum* și s-a determinat acumularea de biomasă și de clorofilă după incubarea într-un mediu care simulează apele epurate. Procedura a implicat co-immobilizarea axenică a algelor și a bacteriilor de testat în ganule de alginat, incubarea granulelor cu microorganismele co-immobilizate timp de 72 h în apă epurată simulată, determinarea colorimetrică a azotului nitric și amoniacal și a fosforului total.

Granulele s-au format prin extrudarea suspensiei de celule de alge (10^5 ufc/ml / bacterii 10^6 ufc/ml) - alginat de sodiu printr-un ac bont, la o rată constantă de 0,25 ml/min. Această extrudare a fost realizată cu ajutorul unei pompe de tip seringă de 20 ml (Harvard Apparatus sau KD Scientific) într-o soluție de CaCl₂ 0,25 M.

Granulele sferice formate prin precipitarea ionotropă a alginatului în soluție de clorură de calciu se mențin timp de 30... 35 min în soluția de clorură de calciu, pentru



întărire. Se spală apoi prin introducere timp de 15 min în apă distilată și apoi se mențin granulele de alginat cu celule de alge / bacterii încapsulate până la utilizare în soluție fiziologică Ringer (NaCl 6g, KCl 0,075g, CaCl₂ 0,1 g, NaHCO₃ 0,1 g) axenică.

Apa epurată simulată s-a realizat prin dizolvarea într-un litru de apă distilată a 5 g de peptonă, 6,454 g NH₄NO₃, 0,366 g de NaH₂PO₄·H₂O, 16,959 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 0,075 g MgSO₄ · 7H₂O, 0,025 g CaCl₂ · 2H₂O, 0,025 g KCl, 1 ml soluție de microelemente. Componentele soluție stoc microelemente (g/l) sunt: 2, 86 H₃BO₃, 2,03 MnSO₄ · 4H₂O, 0,222 ZnSO₄ · 7H₂O, 0,018 MoO₃ și 0,079 CuSO₄ · 5H₂O. Apa epurată simulată s-a distribuit în erlenmeyer de 500 ml, câte 100 ml, după care s-a sterilizat prin autoclavare, la 121°C timp de 20 min. În fiecare pahar s-au introdus axenic câte 10 ml de granule de alginat.

S-a lucrat în față trei variante martor, probe tratate cu granule de alginat fără microorganisme, probe tratate cu granule de alginat conținând numai tulpina de *Azospirillum brasiliense* și probe tratate cu granule conținând numai tulpina de *C. homosphaera* 424.

Rezultatele, prezentate în tab.3, demonstrează existența unui sinergism al algelor co-immobilizate cu bacterii în reducerea cantității de azot și fosfor din mediul de incubare reprezentat de apa epurată simulată.

Tab. 3. Reducerea nivelului de azot și fosfor din apele epurate simulate incubate timp de 72 ore cu granule de alginat conținând tulpina de *C. homosphaera* 424 co-immobilizată cu bacterii *Azospirillum lipoferum*.

Varianta	Azot amoniacal după 72 ore (mg/ml)	Azot nitric după 72 ore (mg/ml)	Fosfor total după 72 ore (mg/ml)
Granule fără microorganisme	1,42±0,12	4,95±0,32	5,45±0,48
Granule cu <i>C. homosphaera</i> 424	1,16±0,07	3,48±0,24	4,08±0,28
Granule cu <i>A. lipoferum</i> SF12	0,94±0,06	3,15±0,21	4,14±0,38
Granule cu <i>C. homosphaera</i> 424 și <i>A. lipoferum</i> SF12	0,54±0,09	2,28±0,18	3,65±0,54

Tulpina *C. homosphaera* 424 are capacitatea de a crește împreună cu bacterii benefice, cum sunt cele din genul *Azospirillum*, și poate fi utilizată pentru formarea de consorții microbiene utilizabile în reducerea nivelului de azot și fosfor în apele uzate



TULPINA DE *CHLORELLA HOMOSPHAERA* CU PLASTICITATE ECOTEHNOLOGICĂ

Revendicări

1. Tulpină de *Chlorella homosphaera* 424, caracterizată prin aceea că este depozitată sub numărul CCAP 211/121 la Culture Collection of Algae and Protozoa, prezintă o competență ridicată de colonizare a nișelor ecotehnologice specifice datorită unei viteze ridicate de creștere, de peste 0,275 OD/zi și a unui timp scurt de dublare, de sub 4 zile, formează ficocenoze cu eficiență ridicată în fixarea bioxidului de ardere din emisii industriale cu acumularea de proteine și lipide, rezistă la concentrații de 7% și peste bioxid de carbon în gazele de aerare, tolerează concentrații ridicate de săruri, în special NaHCO_3 / Na_2CO_3 și are capacitatea de a crește împreună cu bacterii benefice, putând fi utilizată pentru formarea de consorții microbiene utilizabile în reducerea nivelului de azot și fosfor în apele uzate epurate.

