



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00349**

(22) Data de depozit: **05.05.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.08.2013** BOPI nr. **8/2013**

(41) Data publicării cererii:
30.03.2011 BOPI nr. **3/2011**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
PROTECȚIA PLANTELOR,
BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR. 5,
BL. D 7, SC. E, ET. 2, AP. 45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **FĂTU VIOREL, COMUNA GRIVIȚA, IL, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 2008/0124756 A1; US 5871952 A

(54) **PROCEDEU DE SELECȚIE A TULPINILOR DE MICROALGE**



RO 126124 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de selecție a tulpinilor de microalge (cianobacterii și microalge eucariote) utilizate pentru producerea de biocombustibili și aditivi furajeri.

3 Microalgele au o capacitate de fixare a bioxidului de carbon care este de câteva ori mai mare decât cea a plantelor superioare. Biomasa rezultată este utilizată pentru obținerea de biocombustibili, aditivi furajeri, suplimente nutritive, biopreparate de uz agricol, compuși biologic activi (care sunt ingrediente ale unor medicamente, cosmetice, stimulatori de creștere pentru plante etc.).

7 Principala problemă tehnică, care limitează randamentul conversiei fotosintetice a bioxidului de carbon în compuși de interes practic, este aceea a apariției fenomenelor de fotoinhibiție, în cazul depășirii zonei de intensitate luminoasă de saturație, I_k . Intensitatea luminii solare este mult peste intensitatea I_k . La cianobacterii, aceste fenomene de fotoinhibiție se instalează la circa 250 $\mu\text{moli fotoni } (\mu\text{E}) \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectiv, la ceva mai puțin de 12,5% din lumina solară incidentă în timpul verii la 45° latitudine nordică, iar la algele eucariote, fotoinhibiția se instalează la circa 200 $\mu\text{moli fotoni } \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

15 Pentru depășirea acestei probleme tehnice a fenomenelor de fotoinhibiție rezultate la intensități ale luminii peste intensitatea luminoasă de saturație I_k , au fost propuse mai multe tipuri de soluții tehnice: (i) de creștere a densității populației de microalge în fotobioreactoare și a vitezei de amestecare; (ii) de proiectare a unor fotobioreactoare în care lumina să fie „diluată”, și (iii) de selectare a unor tulpini cu o rezistență mai mare la fotoinhibiție și care au o zonă a intensității luminoase de saturație mai apropiată de cea a intensității luminii solare.

23 Cererea de brevet **US 2008/0124756 A1** descrie un procedeu de realizare a unor microorganisme fotosintetice (microalge), modificate genetic pe baza tehnologiei antisens ARN. Această tehnologie este direcționată pentru blocarea unor promotori induși de lumină, specifici pentru Mg chelatază clorofiliană și pentru fosfogliceratkinaza. Selecția transformanților se realizează prin donarea concomitentă a genei pentru luciferază în microalgele transformate (luciferază care produce bioluminescență pe baza ATP generat în fotosinteză).

29 Procedeu de selecție, descris în cererea de brevet **US 2008/0124756 A1**, prezintă două dezavantaje: (i) realizează selecția exclusiv pentru criteriul rezistenței la fotoinhibiție/creșterii valorii intensității luminoase de saturație, I_k , și (ii) folosește pentru selecție un marker introdus prin manipulări genetice (gena care codifică pentru luciferază), care poate să nu se exprime în anumite tulpini valoroase și care trebuie eliminat apoi din tulpinile care vor fi industrializate (pentru că reduce randamentul conversiei fotosintetice, datorită utilizării ATP rezultat prin fotosinteză pentru bioluminescență).

35 **US 5871952 A** prezintă procedeu de selecție de celule mutante de alge H2 - producătoare, oxigen-tolerante, care cuprinde: (a) creșterea de celule de alge fotoautotrofe în lumină fluorescentă la fază log medie; (b) inducerea celulelor de alge fotoautotrofe crescute în lumină fluorescentă la fază log medie în etapa (a) în anaerobioză, prin: (1) resuspendarea celulelor într-o soluție tampon și supunerea suspensiei la anaerobioză cu un gaz inert; (2) incubarea suspensiei, în absența luminii la temperatură ambiantă; (c) tratarea celulelor din etapa (b) cu metronidazol, azidă de sodiu și oxigen adăugat la concentrații controlate în prezența luminii din spectrul vizibil; (d) spălarea de pe metronidazol și azidă de sodiu, pentru a obține o suspensie de celule finală; (e) însămânțarea suspensiei de celule finală pe un mediu minimal și incubare în lumină, la o temperatură potrivită pentru a permite coloniilor să apară; (f) numărarea numărului de colonii pentru a determina procentul de mutante supraviețuitoare și (g) testarea supraviețuitoarelor pentru a identifica mutantele H2-producătoare, oxigen-tolerante.

RO 126124 B1

Problema tehnică, pe care o rezolvă invenția, este de a realiza simplu și rapid selecția tulpinilor de microalge, cu o zonă a intensității luminoase de saturație mai apropiată de cea a intensității luminii solare și care acumulează concomitent compuși de interes practic (ca, de exemplu, lipide).

Procedeul de selecție, conform invenției, este alcătuit din următoarele etape: realizarea unei suspensii de microalge care conține o populație de microorganisme cu variabilitate ridicată, prin tehnici uzuale de extracție și izolare din mediu sau de mutageneză a unei tulpini deja izolate; aducerea suspensiei la o densitate optică de 0,25, la 550 nm, corespunzător la $10^6 \dots 10^7$ ufc/ml; diluarea de 1000 ori a suspensiei prin diluții zecimale, până la $10^3 \dots 10^4$ ufc/ml; etalarea suspensiei de microalge pe un mediu mineral, cum este mediul BG-11, care conține 1 mM de metronidazol, agarizat cu 1,5% agar și repartizat în plăci Petri; incubarea plăcilor Petri cu microalge timp de minimum 72 h, la 25°C și la $250 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu un ciclu de 16 h lumină/8 h întuneric; preluarea imaginii cu o (foto)cameră digitală cu un senzor de minimum 6 megapixeli; selectarea imaginii fiecărei colonii și transformarea imaginii coloniei în intensitate de semnal RGB, cu ajutorul algoritmilor incluși într-un program software comercial; determinarea conținutului de clorofilă a și de lipide conform ecuației liniare $Y = aR + bG + cB$, în care Y este conținutul de clorofilă a sau de lipide, R, G, B sunt valorile medii ale intensităților fiecărei culori primare, a, b și c sunt parametrii de corelație specifici pentru fiecare grup de microorganisme fototrofe; selectarea coloniilor care prezintă concomitent valori ridicate ale conținutului de clorofilă a și de lipide și repicarea acestora pentru utilizări ulterioare.

Avantajele procedurii descrise conform invenției sunt următoarele:

- este un procedeu simplu și ușor de aplicat, folosind aparatură și reactivi de laborator uzuale și echipamente și software de preluare și procesare a imaginii care sunt larg accesibile comercial;

- permite selectarea tulpinilor după cel puțin două criterii, atât după eficiența fotosintetică la valori ridicate ale intensității luminoase (care permite creșterea microalgelor în prezență de metronidazol), cât și după acumularea de lipide.

Procedeul descris prin prezenta invenție se ilustrează prin următorul exemplu.

Într-un Erlenmeyer de 25 ml, se aduc 5 ml suspensie 10^5 ufc/ml (în mediu lichid BG-11) de cianobacterii *Synechococcus* PCC6301. Se adaugă 5 ml de mediu lichid BG-11, care conține o concentrație inițială 1 mM de 5-fluorodeoxiuridină, atingându-se, în mediul final de mutageneză, o concentrație de 0,5 mM 5-fluorodeoxiuridină. Cianobacteriile sunt cultivate până la atingerea unei densități optice de 0,25, la 550 nm (corespunzător la $10^6 \dots 10^7$ ufc/ml), agitate pe masă rotativă, aerate aseptice cu un aer îmbogățit în bioxid de carbon (2%) și iluminate la o intensitate de $250 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu un ciclu de 16 h lumină/8 h întuneric. Din suspensia de cianobacterii supuse mutagenezei chimice, se realizează o diluție serială de 1:9, repetată de trei ori (diluare de 100 ori), până la atingerea unei densități optice de $10^3 \dots 10^4$ ufc/ml. Suspensia de microalge se etalează pe un mediu mineral BG-11, care conține 1 mM de metronidazol, agarizat cu 1,5% agar și repartizat în plăci Petri.

Tabelul 1

Formula mediului mineral BG-11, folosit pentru cultivarea microalgelor

Ingredient	g l ⁻¹	mM
NaNO ₃	1,5	17,65
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,04	0,18
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,075	0,30

RO 126124 B1

Tabelul 1 (continuare)

Ingredient	g l ⁻¹	mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,036	0,25
Acid citric	0,006	0,03
Citrat feriamoniacal	0,006	0,03
EDTA (disodic monomagneziu)	0,001	0,003
Na ₂ CO ₃	0,02	0,19
Amestec de microelemente A5+Co	1 ml	
Apă distilată	până la 1 l	
pH după autoclavare și răcire	7,4	
Soluția de microelemente A5+Co		
Ingredient	g l ⁻¹	
H ₃ BO ₃	2,86	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,390	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079	
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,049	

Plăcile Petri se incubează timp de 72 h, la 25°C și iluminare la 250 μE m² s⁻¹, cu lămpi fluorescente de 15 W, cu un ciclu de 16 h lumină/8 h întuneric. După incubare, plăcile Petri sunt fotografiate cu un aparat Canon EOS D40, prevăzut cu un senzor de 10,1 megapixeli și echipat cu un obiective macro EF 100/f2,8 USM. Pentru evitarea fenomenului de neclaritate a imaginii preluate, camera foto se fixează pe un tripod și iluminarea plăcii Petri se realizează cu un dispozitiv flash circular, cu diode luminescente, amplasat în jurul obiectivului. Fotografii rezultate sunt apoi prelucrate cu ajutorul unui soft Adobe photoshop CS3. Se selectează imaginea fiecărei colonii și se transformă imaginea coloniei în intensitate de semnal RGB, cu ajutorul algoritmilor incluși în programul Adobe photoshop CS3.

Preluarea imaginii plăcilor Petri și procesarea acestor imagini se poate realiza cu orice fel de camere foto sau video care au un senzor de cel puțin 6 M și cu orice soft care include algoritmi pentru descompunerea imaginii în culorile primordiale RGB și alocarea de valori pentru intensitate („strălucire”-brightness).

Din valorile medii de intensitate („strălucire”- brightness), caracteristice fiecărei colonii, se determină conținutul de clorofilă a și de lipide, conform ecuației liniare $Y = aR + bG + cB$, în care Y este conținutul de clorofilă a sau de lipide, R, G, B sunt valorile medii ale intensităților fiecărei culori primare, a, b și c sunt parametrii de corelație specifici pentru fiecare grup de microorganisme fototrofe. Pentru cianobacterii, valorile acestor parametrii sunt -1,34, 1,32 și -0,02, pentru clorofila a, respectiv, -28,31; 25,12 și 8,59, pentru lipide. Se selectează coloniile care prezintă concomitent valori ridicate ale conținutului de clorofilă a și de lipide, și se trec pe mediu proaspăt, pentru utilizări ulterioare.

Procedeele descrise mai sus au fost utilizate pentru selectarea unor tulpini mutante de cianobacterii care acumulează lipide și au o valoare ridicată a zonei de intensitate luminoasă de saturație, I_k .

RO 126124 B1

Metronidazolul este un toxic care este activat de lanțul transportor de electroni și protoni din tilacoizi, iar prezența acestuia în mediul de cultură determină selecția tulpinilor care au antene foarte scurte ale celor două fotosisteme (și care au o valoare ridicată a zonei de de intensitate luminoasă de saturație).

Tulpinile selecționate au fost cultivate pe o instalație de laborator similară fotobioreactoarelor cu bule. Această instalație a fost realizată din tuburi de sticlă lungi (de 50 ml, diametrul 2 cm) în care s-au introdus tuburi de 0,2 cm din policarbonat, pentru barbotarea amestecului îmbogățit în CO₂ (5%). Acest amestec, aflat la o presiune de 2 bari, a fost barbotat în mediu, la o rată de 0,2 ml/ml mediu/min, fiind trecut prin filtre microbiene, pentru asigurarea axenicității. Iluminarea s-a realizat cu tuburi fluorescente, la o rată maximă de 300 μE·m⁻²·s⁻¹, cu un ciclu de 16 h iluminare cu 8 h pauză. În sedimentul cianobacterian, a fost determinat conținutul de clorofilă a și de lipide, prin folosirea tehnicii de prelucrare a imaginii descrise mai sus și a coeficienților de corelație ai ecuației liniare.

Determinarea chimică a lipidelor s-a realizat prin metoda colorimetrică cu reactiv fosfovanilinic, în varianta pentru (ciano)bacterii descrisă de Izard și Limberg, 2003. Această metodă implică ultrasonicarea sedimentului de cultură de cianobacterii, urmată de extracția ultrasonicatului în amestec de cloroform : metanol, în raport de 2:1: 0,8 (sub agitare, la frigider). Lipidele au fost separate de materialul hidrosolubil prin diluare cu un volum de cloroform, urmată de îndepărtarea fazei apoase la trompa de apă. Din extract, s-au reluat 100 μl de cloroform, care s-au evaporat sub jet de azot. Peste reziduu, s-au adăugat 100 μl apă și 2 ml de acid sulfuric 18 M. Amestecul rezultat a fost hidrolizat prin fierbere 10 min la baie de apă și răcit. Peste hidrolizatului răcit, s-au adăugat 5 ml de reactiv fosfovanilinic (0,120 g vanilină s-au dizolvat în 20 ml de apă, volumul final fiind adus la 100 cu acid fosforic de 85%). După agitare, s-a lăsat la întuneric, timp de 45 min, la temperatura camerei. Densitatea optică s-a determinat la lungimea de undă λ=560 nm, în cuvă de 10 mm. Pentru transformarea densităților optice în concentrații lipidice, s-a folosit o curbă etalon (0,1...1 mg/ml).

Determinarea biochimică a conținutului de clorofilă a s-a realizat prin spectrofotometrie, după extracția celulelor cu metanol. Clorofila s-a determinat în extractele metanolice, folosind ecuația modificată a lui Lee și Shen (2004):

$$\text{Clorofila a (mg l}^{-1}\text{)} = 13,43 \times \text{OD}_{665}$$

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 2. Aceste rezultate demonstrează că procedeul de selecție propus prin prezenta invenție permite selectarea tulpinilor de microalge care au o valoare ridicată a intensității luminoase de saturație și acumulează lipide.

Tabelul 2

Valorile conținutului de lipide și de clorofilă a, estimate din valorile intensităților medii ale culorilor primare RGB și determinate prin tehnici biochimice în tulpini de cianobacterii selectate conform procedurii descrise și crescute la intensitate luminoasă ridicată

Nr. crt.	Intensitatea culorilor primare			Conținut de lipide, estimat (Y _L) ^a (mg/g)	Conținut de clorofilă a, estimat (Y _C) ^b (mg/g)	Conținut de lipide, determinat (mg/g)	Conținut de clorofilă a, determinat (mg/g)
	Roșu	Verde	Albastru				
1	122,21	137,23	28,22	229,86	25,05	223,50	11,20
2	124,34	141,38	22,87	227,85	28,03	79,80	22,80
3	121,74	137,32	27,91	242,77	26,09	243,80	25,40

^a model RGB, pentru estimarea lipidelor: Y_L = 28,31R + 25,13G + 8,59B

^b model RGB, pentru estimarea clorofilei a: Y_C = 1,34R + 1,32G + 0,02B.

1

Revendicare

3

Procedeu de selecție a tulpinilor de microalge, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: realizarea unei suspensii de microalge care conține o populație de microorganisme cu variabilitate ridicată, prin tehnici uzuale de extracție și izolare din mediu sau de mutageneză a unei tulpini deja izolate; aducerea suspensiei la o densitate optică de 0,25, la 550 nm, corespunzător la $10^6 \dots 10^7$ ufc/ml; diluarea de 1000 ori a suspensiei prin diluții zecimale, până la $10^3 \dots 10^4$ ufc/ml; etalarea suspensiei de microalge pe un mediu mineral, cum este mediul BG-11, care conține 1 mM de metronidazol, agarizat cu 1,5% agar și repartizat în plăci Petri; incubarea plăcilor Petri cu microalge timp de minimum 72 h, la 25°C și la $250 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu un ciclu de 16 h lumină/8 h întuneric; preluarea imaginii cu o (foto)cameră digitală cu un senzor de minimum 6 megapixeli; selectarea imaginii fiecărei colonii și transformarea imaginii coloniei în intensitate de semnal RGB, cu ajutorul algoritmilor incluși într-un program software comercial; determinarea conținutului de clorofilă a și de lipide, conform ecuației liniare $Y = aR + bG + cB$, în care Y este conținutul de clorofilă a sau de lipide, R, G și B sunt valorile medii ale intensităților fiecărei culori primare, a, b și c sunt parametrii de corelație specifici pentru fiecare grup de microorganisme fototrofe; selectarea coloniilor care prezintă concomitent valori ridicate ale conținutului de clorofilă a și de lipide, și repicarea acestora pentru utilizări ulterioare.

5

7

9

11

13

15

17

19



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 769/2013