



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

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

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

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

(71) Solicitant:  
• **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.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **FĂTU VIOREL,, COMUNA GRIVIȚA, IL, RO**

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

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de selecție a tulpinilor de microalge dintr-o suspensie care conține o populație de microorganisme adusă la o densitate optică de 0,25...550 nm și diluată de 1000 de ori, până la  $10^3$ ... $10^4$  ufc/ml, prin etalarea în plăci Petri a suspensiei pe un mediu mineral agarizat cu 1,5% agar și conținând 1 mM metronidazol, incubarea plăcilor Petri circa 72 h, în cicluri de 16 h lumină/6 h întuneric, la 25°C, preluarea digitală a imaginii coloniilor, prelucrarea

imaginilor cu un program soft de determinare a conținutului de clorofilă și lipide, selectarea coloniilor care prezintă concomitent valori ridicate atât ale conținutului de clorofilă de lipide, cât și replicarea lor pentru utilizări ulterioare, pentru producerea de biocombustibili și aditivi furajeri.

Revendicări: 1



4

## Procedeu de selecție a tulpinilor de microalge

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

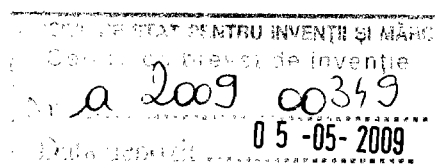
Microalgele au o capacitate de fixare a bioxidului de carbon care este de câteva ori mai mare decât cea a plantelor superioare. Biomasa rezultată este utilizată pentru obținerea de biocombustibili, aditivi furajeri, suplimente nutritive, biopreparate de uz agricol, compuși biologic activi (care sunt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

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  $\mu\text{moli fotoni } \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

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.

Cererea de brevet US20080124756 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 chelataza clorofiliană și pentru fosfogliceratkinaza. Selecția transformanților se realizează prin clonarea concomitentă a genei pentru luciferază în microalgele transformate (luciferază care produce bioluminescență pe baza ATP generat în fotosinteză).

Procedeu de selecție descris în cererea de brevet US20080124756 prezintă două dezavantaje: (i) realizează selecția exclusiv pentru criteriul rezistenței la fotoinhibare / 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).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu simplu și rapid pentru selectarea 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 ex. 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 mutagenză 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 min. 72 ore, la 25°C și la  $250 \mu E m^2 s^{-1}$ , cu un ciclu de 16 ore lumină / 8 ore întuneric; preluarea imaginii cu o (foto)cameră digitală cu un senzor de min. 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 lineare  $Y = aR + bG + cB$ , 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 lipide și repicarea lor pentru utilizări ulterioare.

Avantajele procedurii descris 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:



Intr-un Erlenmeyer de 25 ml se aduc 5 ml suspensie  $10^5$  ufc/ml (în mediu lichid BG-11) de cianobacterii *Synechococcus* PCC 6301. 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 mutagenază 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 ore lumină / 8 ore întuneric. Din suspensia de cianobacterii supuse mutagenzei 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.

Tab.1. Formula mediului mineral BG-11 folosit pentru cultivarea microalgelor.

Ingredient	$\text{g l}^{-1}$	mM
$\text{NaNO}_3$	1.5	17.65
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.04	0.18
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.075	0.30
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.036	0.25
Acid citric	0.006	0.03
Citrat feriamoniacal	0.006	0.03
EDTA (disodic monomagneziu)	0.001	0.003
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.02	0.19
Amestec de microelemente A5+Co	1 ml	
Apă distilată	până la 1 l	
pH după autoclavare și răcire 7.4		
<i>Soluția de microelemente A5+Co</i>		
Ingredient	$\text{g l}^{-1}$	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2.86	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.390	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079	
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.049	

Plăcile Petri se incubă timp de 72 ore, la  $25^\circ\text{C}$  și iluminare la  $250 \mu\text{E m}^2 \text{ s}^{-1}$  cu lămpi fluorescente de 15W, cu un ciclu de 16 ore lumină / 8 ore 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. Fotografiile 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 lineare  $Y = aR + bG + cB$ , 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 lipide și se trec pe mediu proaspăt pentru utilizări ulterioare.

Procedul descris mai sus a fost utilizat pentru selectarea unor tulpini mutante de cianobacterii care acumulează lipide și au o valoare ridicată a zonei de intensitate luminoasă de saturație,  $I_k$ .

Metronidazolul este un toxic care este activat de lanțul transportor de electroni și protoni din tilacoizi, iar prezența lui 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. Aceasta instalație a fost realizată din tuburi de sticlă lungi (de 50 ml, diametru 2 cm) în care s-au introdus tuburi de 0,2 cm din policarbonat pentru barbotarea amestecului îmbogățit în  $CO_2$  (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  $300 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ , cu un ciclu de 16 ore iluminare cu 8 ore pauză. În sedimentul cianobacterian a fost determinat conținutul de clorofilă a și lipide prin folosirea tehnicii de



prelucrare a imaginii descrise mai sus și a coeficienților de corelație ai ecuației lineare.

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 cloform : 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 cloform, urmată de îndepărtarea fazei apoase la trompa de apă. Din extract s-au reluat 100  $\mu$ l de cloform, care s-au evaporat sub jet de azot. Peste reziduu s-au adăugat 100  $\mu$ l apă și 2 ml de acid sulfuric 18M. Amestecul rezultat a fost hidrolizat prin fierbere 10 min la baie de apă și răcit. Peste hidrolizatul 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 minute la temperatura camerei. Densitatea optică s-a determinat la lungimea de undă  $\lambda=560$  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 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):

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

Rezultatele obținute sunt prezentate în tab. 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 saturare și acumulează lipide.

Tab. 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 procedeului descris și crescute la intensitate luminoasă ridicată.

Nr. crt.	Intensitatea culorilor primare			Conținut de lipide estimate ( $Y_L$ ) <sup>a</sup> (mg/g)	Conținut clorofilă a estimate ( $Y_C$ ) <sup>b</sup> (mg/g)	Conținut de lipide determinat (mg/g)	Conținut 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

<sup>a</sup>model RGB pentru estimarea lipidelor:  $Y_L = 28,31R + 25,13G + 8,59B$ .

<sup>b</sup>model RGB pentru estimarea clorofilei a:  $Y_C = 1,34R + 1,32G + 0,02B$ .



## Revendicare

1. 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 mutagenază 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 min. 72 ore, la 25°C și la  $250 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$ , cu un ciclu de 16 ore lumină / 8 ore întuneric; preluarea imaginii cu o (foto)cameră digitală cu un senzor de min. 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 lineare  $Y = aR + bG + cB$ , 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 lipide și repicarea lor pentru utilizări ulterioare.

