



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00847**

(22) Data de depozit: **14/11/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/02/2018** BOPI nr. **2/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2015 BOPI nr. **6/2015**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, 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;**

• **VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **ILIE LUCIA, BD.TIMIȘOARA NR.49,
BL.Cc 6, SC.A, ET.4, AP.14, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **STEPAN EMIL, BD.TIMIȘOARA NR.49,
BL.CC6, SC.A, ET.3, AP.12, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**ES 2371838 (B2); US 8227216 (B2);
JPH 0759558 (A); US 2011091945 (A1)**

(54) **TULPINĂ DE NANNOCHLORIS SP. PENTRU OBȚINEREA
DE BIOCOMBUSTIBIL PENTRU AVIAȚIE**



RO 130352 B1

1 Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Nannochloris sp.* destinată utilizării pentru
fixarea industrială a bioxidului de carbon din diferitele emisii de gaze, în vederea obținerii de
3 biomasă prelucrabilă rapid în biocombustibil pentru aviație.

5 Sunt cunoscute diferite tulpini de microalge cu utilizări biotehnologice asociate fixării
bioxidului de carbon din emisiile industriale.

7 **ES 2371838 B2** se referă la o tulpină HMS2 din genul *Nannochloris*, depozitată cu
numărul CCAP 251/9 la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), ce are capacitatea
de a crește la un pH cuprins în intervalul 6...7, la intensități luminoase de 100...1000 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$,
9 acumulează 20...25% lipide din substanța uscată, fiind utilizată atât pentru producerea de
suplimente nutritive și furajere cu acizi grași (poli)nesaturați, luteină și zeaxantină, cât și pentru
11 producerea de biodiesel prin fixarea bioxidului de carbon din atmosferă.

13 **US 8227216 B2** se referă la tulpinile de *Nannochloropsis* LARB-AZ 0202.0, depozitată
cu numărul PTA-11048 la American Type Culture Collection (ATCC), LARB-AZ 0202, depo-
zitată cu numărul PTA-11049 la ATCC, și LARB-AZ 0202.3, depozitată cu numărul PTA-11050
15 la ATCC, precum și la mutantele acestor tulpini, care produc o cantitate mare de acizi grași cu
lungimea lanțului hidrocarbonat mai mică de 18 atomi de carbon, utilizabili în producerea de
17 biocombustibil pentru aviație.

19 Unul dintre dezavantajele care limitează utilizarea practică a tulpinilor de microalge
descrise până în prezent este apariția fenomenelor de fotoinhibiție și fotooxidare, în cazul
depășirii zonei de intensitate luminoasă de saturație, I_k , al cărei prag este de obicei la 400 μE
21 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (a se vedea, de exemplu, review-ul Carvalho et al., 2011, *Appl Microbiol Biotechnol*,
89:1275-1288). Intensitatea luminii solare este mult peste intensitatea I_k , depășind uneori
23 1500 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ în timpul verii, la 45° latitudine nordică. Tulpina LARB-Z 0202.0 (sau mutantele
sale) a fost cultivată la o intensitate luminoasă de 350 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, intensitate de câteva ori mai
25 mică decât cea a luminii solare. Tulpina *Nannochloris* HMS2 acumulează cantități importante
de carotenoizi, luteină și zeaxantină, atunci când este cultivată la intensități luminoase de
27 800...1000 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, care sunt utile în cazul utilizării biomasei ca supliment nutritiv, dar care
complică procedeele de utilizare a biomasei în cazul producerii de biocombustibili, în special
29 biocombustibili pentru aviație. Sunt necesare tulpini de microalge care să crească la intensități
luminoase de peste 1000 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, caracteristice fotobioreactoarelor industriale expuse luminii
31 solare, cu acumularea de lipide și/sau de acizi grași liberi cu un profil corespunzător prelucrării
ușoare în biocombustibil pentru aviație.

33 **JPH 0759558 A** descrie o tulpină de *Nannochloris* ale cărei celule sunt solitare, au un
diametru de 1...2 μm , nu formează autospori, au un nucleu, un cloroplast, dar nu prezintă
35 pirenoid, tolerează o salinitate ridicată, conține clorofilă a, clorofilă b, zeaxantină și violaxantină,
crește optim la o temperatură de 30°C și un pH de 7,5. Dezavantajul utilizării acestei tulpini este
37 acumularea de cantități mari de carotenoizi, violaxantină și zeaxantină.

39 **US 2011091945 A1** se referă la metode de stimulare a creșterii biomasei algale utilizând
stimulenți biochimici, inducerea de lipide și controlul metaboliților din alge, pentru producerea
de biocombustibili. Unul dintre exemplele date se referă la tulpina *Chlorella sorokiniana* UTEX
41 2805, menținută pe mediu BG11 (NaNO_3 17,6 mM; K_2HPO_4 0,22 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 mM;
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mM; acid citric H_2O 0,03 mM; citrat feric de amoniu 0,02 mM; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
43 0,002 mM; Na_2CO_3 0,18 mM; H_3BO_3 46 μM ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 9 μM ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,77 μM ;
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,6 μM ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,3 μM ; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,17 μM), la un pH de $7 \pm 0,2$, la
45 o temperatură de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ și $100 \pm 10 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ intensitate luminoasă. Tratatamentul timp de
6 zile cu malathion a demonstrat o creștere a conținutului de lipide din alge cu 5...22%. În

RO 130352 B1

exemplele de realizare a metodelor descrise, speciile de alge pot fi selectate din grupul: 1
Gloeocystis, *Limnothrix*, *Scenedesmus*, *Chlorococcum*, *Chlorella*, *Anabaena*, *Chlamydomonas*,
Botryococcus, *Cricosphaera*, *Spirulina*, *Nannochloris*, *Dunaliella*, *Phaeodactylum*, *Pleurochrysis*, 3
Tetraselmis și orice combinație a acestora.

În condiții de cultivare industrială, în special în cazul în care se intenționează cultivarea 5
mixotrofă, pentru a stimula acumularea de lipide, tulpinile de alge selectate pentru utilizări
practice trebuie să prezinte: o capacitate mare de concurență cu alte microorganisme foto- 7
sintetizante, și abilitatea de a forma consorții simbiotice cu bacteriile care cresc în același
mediul cu algele (bacteriile de ficosferă). 9

Până în prezent nu au fost descrise tulpini de alge la care să fie revendicate concomitent 11
astfel de proprietăți de interes pentru utilizarea industrială, în special pentru obținerea de
bio-kerosen/biocombustibil pentru aviație, respectiv: capacitate de a crește la intensități 13
luminoase de peste $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu acumulare de lipide prelucrabile în biocombustibil pentru
aviație, rezistență la concentrații ridicate de CO_2 , capacitate mare de concurență cu alte micro- 15
organisme fotosintetizante, și abilitatea de a forma consorții simbiotice cu bacteriile de ficosferă.
Toate aceste caracteristici asigură în final colonizarea nișei ecotehnologice, cu formare de 17
microbiocenoze algale industriale, cu productivități ridicate.

Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Nannochloris* sp. 424-1, depozitată sub 19
numărul CCAP 251/10 la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), care a fost obținută
prin selecție mutatorie, prin cultivare pe mediu cu metronidazol, dintr-o tulpină sălbatică, are 21
capacitatea de a crește la intensități luminoase cuprinse în intervalul $1000 \dots 1100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu
acumulare de carotenoizi antioxidanți sub $0,54 \text{ mg/g s.u.}$, rezistă la concentrații de peste 7% 23
de bioxid de carbon în gazele de aerare, este capabilă de colonizarea nișelor ecotehnologice
specifice, datorită unei viteze de creștere cuprinsă în intervalul $0,275 \dots 0,4 \text{ OD/zi}$ și a unui timp 25
de dublare de $1 \dots 3$ zile; această tulpină este capabilă să formeze ficocenoze și consorții cu
Azospirillum brasiliense Sp 7, pentru a reduce nivelul de azot amoniacal, azot nitric și fosfor din 27
apele uzate la valori de $0,54 \pm 0,09$, $2,28 \pm 0,18$ și, respectiv, $3,65 \pm 0,54$ după 72 h de incubare
cu granule de alginat, pe mediu nutritiv Zarouk mixotrof, la intensități ale luminii ce depășesc 29
 $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, tulpina poate produce până la $4,5 \text{ g/l}$ biomasă pe zi, cu un conținut de peste
24% lipide și/sau acizi grași liberi, cu lungimea catenei hidrocarbonate mai mică de 18 atomi 31
de carbon, prelucrabili în biocombustibil pentru aviație.

Tulpina de *Nannochloris* sp. 424-1 prezintă următoarele avantaje:

- capacitate ridicată de a sechestra cantități semnificative de CO_2 , prin cultivare autotrofă 33
sau mixotrofă;

- capacitatea de a crește la intensități luminoase de peste $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu acumulare 35
redușă de carotenoizi antioxidanți;

- rezistență la concentrații de peste 7% bioxid de carbon în gazele de aerare; 37

- tolerarea concentrațiilor mari de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, care asigură o „interfață” 39
fizico-chimică favorabilă pentru chemosorbția CO_2 în mediul de cultură;

- competență ridicată de colonizare a nișelor ecotehnologice specifice;

- conversie ridicată biomasă algală a bioxidului de carbon și componentelor mediilor de 41
creștere, inclusiv a celor mixotrofe;

- acumularea de compuși care sunt prelucrabili în bio-kerosen/biocombustibil pentru 43
aviație, respectiv, de lipide și/sau acizi grași liberi, cu lungimea catenei hidrocarbonate mai mică
de 18 atomi de carbon. 45

Prezenta invenție se ilustrează prin următorul exemplu.

1 Exemplu

3 Tulpina de *Nannochloris* sp. 424-1 a fost izolată prin selecție mutatorie dintr-o tulpină
sălbatică, izolată inițial dintr-o cultură semiindustrială de *Arthrospira platensis*. Izolarea tulpinei
sălbatică inițiale s-a realizat pe mediu nutrient Zarouch cu 16,8 g/L NaHCO₃.

5 Procedeele de selecție mutatorie utilizat pentru obținerea tulpinii mutatorii este alcătuit
din următoarele etape:

7 1. realizarea unei suspensii de microalge, care conține o populație de microorganisme
cu variabilitate ridicată, prin mutageneza tulpinii sălbatică, indusă de 0,5 mM 5-fluoro-
9 deoxiuridină;

11 2. aducerea suspensiei la o densitate optică de 0,25 la 600 nm, corespunzătoare la
10⁶...10⁷ ufc/ml;

13 3. diluarea de 1000 de ori a suspensiei prin diluții zecimale, până la 103...104 ufc/ml;

15 4. etalarea suspensiei de microalge pe mediu nutrient Zarouch cu 16,8 g/L NaHCO₃,
care conține 1 mM de metronidazol, agarizat cu 1,5% agar și repartizat în plăci Petri;

17 5. incubarea plăcilor Petri cu microalge timp de minimum 72 h la 25°C și la 250 μE m⁻²s⁻¹,
cu un ciclu de 16 h lumină/8 h întuneric;

19 6. preluarea imaginii cu o (foto)cameră digitală cu un senzor de minimum 6 megapixeli;

21 7. selectarea imaginii fiecărei colonii, și transformarea imaginii coloniei în intensitate de
semnal RGB, cu ajutorul algoritmilor incluși într-un program software comercial;

23 8. 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;

25 9. selectarea coloniilor care prezintă concomitent valori ridicate ale conținutului de
clorofilă a și lipide;

27 10. repicarea acestora pentru utilizări ulterioare.

29 Metronidazolul este un toxic ce este activat de lanțul transportor de electroni și protoni
din tilacoizi, iar prezența lui în mediul de cultură determină selecția tulpinilor cu dimensiuni
reduse ale celor două fotosisteme de pigmenți implicate în recoltarea luminii. Mutantele selec-
tate pe mediu cu metronidazol au o valoare ridicată a zonei de intensitate luminoasă de satu-
rație, și o productivitate superioară în sistemele continue de cultivare, la intensități luminoase
mari - a se vedea, de exemplu, Nakajima și Ueda, 2000, J. Appl. Phycol., 12: 285-290.

33 Tulpina *Nannochloris* sp. 424-1, depozitată sub numărul CCAP 251/10 la Culture
Collection of Algae and Protozoa (CCAP), 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
37 viață. În stadii îmbătrânite poate forma un strat de mucilagiu la suprafața celulelor. Celule sunt
mici (4...5 μm mature, 1,5...3 μm autospori). Reproducerea are loc fie prin diviziune mitotică
39 simplă, fie prin formarea de autospori ca urmare a două diviziuni succesive în interiorul peretelui
celular al celulei parentale. Resturile pereților celulari parentali sunt prezente în suspensiile
41 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
43 pirenoid. Tulpina crește bine pe un mediu Zarrouk, tolerând variații mari ale pH-ului în domeniul
bazic (7,4...10).

45 Tulpina *Nannochloris* sp. 424-1 a fost cultivată pe 25 ml mediu Zarrouk, distribuită în
flacoane Erlnemayer de 200 ml, agitată pe un agitator termostatat Inova 42 R (New Brunswick
47 - Eppendorf, Eppendorf, Hamburg, Germania), barbotată cu dioxid de carbon 7% (v/v) în aer,

RO 130352 B1

la o rată de aerare de 1 ml/ml mediu/min, și iluminată cu $250 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu un ciclu de 16 h lumină/8 h întuneric. În aceste condiții tulpina a crescut cu 0,275 OD/zi, și un timp de dublare de 2,94 zile. 1 3

Tulpina *Nannochloris* sp. 424-1 a fost cultivată într-un sistem integrat fotosintetizator original, descris pe larg în brevetul **RO 0123480**. 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 *Nannochloris* sp. 424-1, cu rate ridicate de creștere, a fost considerată drept tulpina cu caracteristici optime de creștere în acest fotobioreactor original, datorită ratei sale de creștere și a timpului de dublare. 5 7 9 11 13 15

Pentru testarea creșterii tulpinii s-au încărcat celulele de fotosinteză cu mediu de cultură Zarouk cu 16,8 g/l NaHCO_3 , sau cu mediu Zarouk suplimentat cu glicerină și hidrolizat din proteine algale (mediu mixotrof), și inoculul proaspăt preparat, în raport volumetric 9:1. Formule de mediu Zarouk și Zarouk mixotrof sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos. 17 19

Tabelul 1

Compoziția mediului nutritiv Zarouk și a mediului Zarouk suplimentat cu glicerină și hidrolizat din proteine algale (Zarouk mixotrof) 21 23

Componenți mediu	Zarouk	Zarouk mixotrof
NaHCO_3	16,80 g/l	16,80 g/l
K_2HPO_4	0,50 g/l	0,50 g/l
NaNO_3	1,875 g/l	1,875 g/l
Hidrolizat proteic cu conținut 5% azot	-	12,5
Glicerină	-	1-5
K_2SO_4	1,00 g/l	1,00 g/l
NaCl	1,00 g/l	1,00 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20 g/l	0,20 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,04 g/l	0,04 g/l
Soluție de microelemente*	1 ml	1 ml
Soluție de Fe chelatat**	5 ml	5 ml

*Micronutrienți soluție stoc (g/l): H_3BO_3 , 2,860; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,030; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,222; MoO_3 (85%) 0,018; $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,079; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,494. 25 27 29 31 33 35

** Pentru prepararea soluției stoc de Fe chelatat s-au dizolvat în 80 ml de apă distilată 0,69 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 0,93 g Na_2EDTA . După fierbere pentru o scurtă durată de timp și răcire la temperatura camerei se aduce soluția finală la un volum de 100 ml. 39 41

RO 130352 B1

Încărcarea s-a făcut până la umplerea celulelor de fotosinteză, astfel încât fluidul alimentat să deverseze în fotobioreactor, 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.

Experimentele s-au realizat în condiții de laborator și seră, la $22 \pm 2^\circ\text{C}$ în timpul zilei, și $17 \pm 2^\circ\text{C}$ în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 h. În condiții de laborator iluminarea s-a realizat cu lămpi de halogen, la $250 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. În condiții de seră s-a utilizat lumina solară, cu intensități care atingeau $1100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ în timpul amiezii, suplimentată cu lumină cu intensitatea de $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub $500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

S-au efectuat determinări ale ratei exponențiale de creștere și ale timpului de dublare (Wood et al., 2005, *Algal culturing techniques*, 269-285) ale conținutului de lipide (Bligh și Dyer, 1959, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37:911-917) și de carotenoizi (Wright și Jeffrey, 1997, în Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds), *Phytoplankton Pigments in Oceanography*, Unesco Publishing, Paris, pp. 327-341)

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 2 de mai jos.

Tabelul 2

Creșterea autotrofă și mixotrofă a tulpinii de *Nannochloris sp 424-1* la diferite intensități luminoase

Parametrii de creștere	Cultură autotrofă		Cultură mixotrofă	
	250 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$	500-1000 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$	250 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$	500-1100 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Suplimentare mediu de cultură cu glicerină	-	-	2 g/l	5 g/L
Suplimentare mediu de cultură cu hidrolizat proteic (5% azot)	-	-	12,5 g/L	12,5 g/L
Rata exponențială de creștere, R_{exp} , zile ⁻¹	0,284	0,629	0,655	0,723
Timp de dublare, TD, zile	2,44	1,10	1,06	0,95
Concentrația de biomasă, g/l	1,2	2,3	2,7	4,5
Conținut lipide în biomasă uscată, % (g/100 g)	21,4	18,5	20,8	24,2
Conținut carotenoizi în biomasă uscată (mg/g s.u.)	0,43	0,54	0,37	0,48

Rezultatele demonstrează faptul că tulpina *Nannochloris sp 424-1* are capacitatea de a crește la intensități luminoase de peste $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu acumulare redusă de carotenoizi antioxidanți. Tulpina tolerează concentrații mari de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, specifice mediului utilizat, care asigură o „interfață” fizico-chimică favorabilă pentru chemosorbția CO_2 în mediul de cultură, și realizează o conversie ridicată în biomasă algală a bioxidului de carbon și a componentelor mediilor de creștere, inclusiv a celui mixotrof. În condiții mixotrofe, pe medii nutritive suplimentate cu glicerină până la 5 g/l și hidrolizat proteic adăugat într-o cantitate care să înlocuiască 25% din azotul total necesar, iluminat cu intensități care depășesc $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, tulpina acumulează 4,5 g/l pe zi, cu o rată de dublare mai mică de 24 h. Aproape un sfert din biomasa uscată este constituită din lipide.

RO 130352 B1

Compoziția în acizi grași a lipidelor acumulate de tulpina de *Nannochloris sp* 424-1 a fost determinat prin gaz-cromatografia esterilor metilici (Tang și Salley, 2008, Fuel, 87: 3006-3017). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3

Compoziția în acizi grași a lipidelor acumulate în tulpina *Nannochloris sp* 424-1

Acizi grași în lipide (%)	Cultură autotrofă		Cultură mixotrofă	
	250 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	500-1100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	250 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	500-1100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
C16	10,64	9,72	3,29	3,73
C18	-	-	-	-
C16:1n-9	8,2	9,84	5,76	10,22
C16:1n-7	3,54	5,54	21,86	24,2
C16:4n-3	1,2	1,35	0,35	0,21
C16:2n-6	2,3	2,72	5,98	4,12
C18	-	-	4,15	3,88
C18:1n-9	-	-	16,87	15,23
C18:1n-7	4,32	5,4	1,59	1,87
C18:2n-6	35,47	37,3	12,46	11,54
C18:3n-3	3,77	2,12	20,68	21,2
C18:3n-4	11,97	12,7	3,42	2,1
C18:3n-6	14,75	12,23	-	-

Tulpina *Nannochloris sp* 424-1 acumulează lipide care conțin resturi de acizi grași cu lungimea catenei hidrocarbonate mai mică de 18 atomi de carbon, ușor prelucrabili în biocombustibil de aviație.

Tulpina *Nannochloris sp* 424-1 a fost co-immobilizată cu tulpina Sp 7 de *Azospirillum brasilense* (DSM 1690), 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 granule 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 CaCl_2 0,25 M.

Granulele sferice formate prin precipitarea ionotropă a alginatului în soluție de clorură de calciu s-au menținut timp de 30...35 min în soluția de clorură de calciu, pentru întărire.

Apa epurată simulată s-a realizat prin dizolvarea într-un litru de apă distilată a 5 g de peptonă, 6,454 g NH_4NO_3 , 0,366 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 16,959 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,075 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,025 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,025 g KCl, 1 ml soluție de microelemente.

RO 130352 B1

1 Componentele soluție stoc microelemente (g/l) au fost: 2,86 H_3BO_3 , 2,03 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$,
0,222 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,018 MoO_3 și 0,079 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Apa epurată simulată s-a distribuit în
3 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.

5 S-au 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*
7 *brasiliense* Sp 7, și probe tratate cu granule conținând numai tulpina de *Nannochloris* sp 424-1.

9 Rezultatele prezentate în tabelul 4 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.

Tabelul 4

13 *Reducerea nivelului de azot și fosfor din apele epurate simulate, incubate timp*
15 *de 72 h cu granule de alginat conținând tulpina de Nannochloris sp 424-1 co-immobilizată cu*
bacterii Azospirillum brasiliense Sp 7

Varianta	Azot amoniacal după 72 h (mg/ml)	Azot nitric după 72 h (mg/ml)	Fosfor total după 72 h (mg/ml)
Granule fără microorganisme	1,42 ± 0,12	4,95 ± 0,32	5,45 ± 0,48
Granule cu <i>Nannochloris</i> sp 424-1	1,16 ± 0,07	3,48 ± 0,24	4,08 ± 0,28
Granule cu <i>A. brasiliense</i> Sp 7	0,94 ± 0,06	3,15 ± 0,21	4,14 ± 0,38
Granule cu <i>Nannochloris</i> sp 424-1 și <i>A. brasiliense</i> Sp 7	0,54 ± 0,09	2,28 ± 0,18	3,65 ± 0,54

25 Tulpina *Nannochloris* sp 424-1 are capacitatea de a crește împreună cu bacterii
benefice, cum sunt cele din genul *Azospirillum*, și poate fi utilizată pentru formarea de consorții
27 microbiene utilizabile în fixarea bioxidului de carbon prin cultivare pe ape uzate epurate, cu
reducerea concomitentă a nivelului de azot și fosfor.

1. Tulpină de *Nannochloris sp.* 424-1, depozitată sub numărul CCAP 251/10 la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), **caracterizată prin aceea că** a fost obținută prin selecție mutatorie, prin cultivare pe mediu cu metronidazol, dintr-o tulpină sălbatică, are capacitatea de a crește la intensități luminoase cuprinse în intervalul $1000 \dots 1100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu acumulare de carotenoizi antioxidanți sub $0,54 \text{ mg/g s.u.}$, rezistă la concentrații de peste 7% de bioxid de carbon în gazele de aerare, este capabilă de colonizarea nișelor ecotehnologice specifice, datorită unei viteze de creștere cuprinsă în intervalul $0,275 \dots 0,4 \text{ OD/zi}$ și a unui timp de dublare de $1 \dots 3$ zile. 3 5 7 9

2. Tulpină de *Nannochloris sp.* 424-1, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** este capabilă să formeze ficocenoze și consorții cu *Azospirillum brasiliense* Sp 7, pentru a reduce nivelul de azot amoniacal, azot nitric și fosfor din apele uzate la valori de $0,54 \pm 0,09$, $2,28 \pm 0,18$ și, respectiv, $3,65 \pm 0,54$, după 72 h de incubare cu granule de alginat. 11 13

3. Tulpină de *Nannochloris sp.* 424-1, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, pe mediu nutritiv Zarouk mixotrof, la intensități ale luminii ce depășesc $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, produce până la $4,5 \text{ g/l}$ biomasă pe zi, cu un conținut de peste 24% lipide și/sau acizi grași liberi, cu lungimea catenei hidrocarbonate mai mică de 18 atomi de carbon, prelucrabil în biocombustibil pentru aviație. 15 17 19

