



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00847

(22) Data de depozit: 14.11.2013

(41) Data publicării cererii:  
30.06.2015 BOPI nr. 6/2015

(71) Solicitant:  
• 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.Cc6, 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

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o tulpină de *Nannochloris sp.*, utilizată pentru obținerea de biomasă prelucrabilă în combustibil. *Tulpina de Nannochloris sp. 424-1* este depozitată sub numărul CCAP 251/10, fiind obținută prin selecție mutatorie, prin cultivare pe mediu cu metronidazol, dintr-o tulpină sălbatică, având capacitatea de a crește la intensități luminoase de

100...1100  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , pe medii mixotrofe, producând până la 4, 5 g/l biomasă/zi, ce are un conținut de peste 24% lipide și/sau acizi grași liberi, cu lungimea catenei hidrocarbonate mai mică de 18 atomi de carbon, prelucrabilă în combustibil.

Revendicări: 1



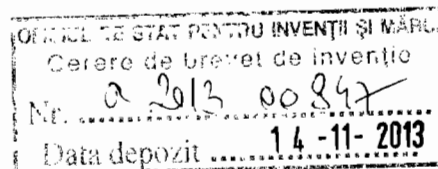
## TULPINA DE *NANNOCHLORIS* SP. PENTRU OBTINEREA DE BIOCOMBUSTIBIL PENTRU AVIATIE

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 biomasă prelucrabilă rapid în biocombustibil pentru aviație.

Sunt cunoscute diferite tulpini de microalge cu utilizări biotehnologice asociate fixării bioxidului de carbon din emisiile industriale. Brevetul ES 2371 838 B2 descrie tulpina HMS2 din genul *Nannochloris*, depozitată cu numărul CCAP 251/9 la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP). Tulpina *Nannochloris* HMS2 are capacitatea de a crește la un pH cuprins între 6 și 7, la intensități luminoase între 100 și 1000  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , acumulează de la 20 la 25% lipide din substanța uscată, fiind utilizabilă pentru producerea de suplimente nutritive și furajere cu acizi grași (poli)nesaturați, luteină și zeaxantină, ca și pentru obținerea de biodiesel, prin fixarea bioxidului de carbon din atmosferă.

Unul din biocombustibilii de interes pentru a fi obținuți din alge este bio-kerosenul, utilizabil în special pentru motoarele avioanelor. Brevetul SUA 8227216 B se referă la tulpinile de *Nannochloropsis* LARB-AZ 0202.0, depozitată cu numărul PTA-11048 la American Type Culture Collection (ATCC), LARB-AZ 0202, depozitată cu numărul PTA-11049 la ATCC, și LARB-AZ 202.3, depozitată cu numărul PTA-11050 la ATCC, la mutantele acestor tulpini, și la un procedeu de (co)cultivare a respectivelor tulpini pentru a obține acizi grași, cu lungimea lanțului hidrocarbonat mai mică de 18 atomi de carbon, care sunt destinați producerii de biocombustibili pentru aviație.

Unul din 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 zonei de intensitate luminoasă de saturație,  $I_k$ , al cărui prag este de obicei la 400  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  – 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 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 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 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 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 solare, cu acumularea de lipide și/sau de acizi grași liberi cu un profil corespunzător prelucrării ușoare în biocombustibil pentru aviație.

În condiții de cultivare industrială, în special în cazul în care se intenționează cultivarea mixotrofă pentru a stimula acumularea de lipide, tulpinile de alge selectate pentru utilizări practice trebuie prezente și: (i) o capacitate mare de concurență cu alte microorganisme fotosintetizante; (ii) abilitatea de a forma consorții simbiotice cu bacteriile care cresc în același mediu cu algele (bacteriile de ficosferă).

Până în prezent nu au descrise tulpini de alge la care să fie revendicate concomitent astfel de proprietăți de interes pentru utilizarea industrială, în special pentru obținerea de bio-kerosen / biocombustibil pentru aviație, respectiv: (i) capacitate de a crește la intensități luminoase de peste  $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , cu acumulare de lipide prelucrabile în biocombustibil pentru aviație; (ii) rezistența la concentrații ridicate de  $\text{CO}_2$ ; (iii) capacitate mare de concurență cu alte microorganisme fotosintetizante și abilitatea de a forma consorții simbiotice cu bacteriile de ficosferă. Toate aceste caracteristici asigură în final colonizarea nișei ecotehnologice, cu formare de microbiocenoze alge industriale cu productivități ridicate.

Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Nannochloris* sp. 424-1, depozitată sub numărul CCAP 251/10 la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), SAM Research Services Ltd., Scottish Marine Institute, Aryll, UK. Tulpina a fost obținută prin selecție mutatorie, prin cultivare pe mediu cu metronidazol, dintr-o tulpină sălbatică, și are capacitatea de a crește la intensități luminoase cuprinse între 100 și  $1100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , cu acumulare redusă de carotenoizi anti-oxidanți. Rezistă la concentrații de 7% și peste bioxid de carbon în gazele de aerare și tolerează concentrații ridicate de săruri, în special  $\text{NaHCO}_3$  /  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Prezintă o competență ridicată de colonizare a nișelor ecotehnologice specifice, datorită unei viteze ridicate de creștere, cuprinsă între 0,275 și 0,4 OD/zi și a unui timp scurt de dublare, de 1..3 zile. Pe medii mixotrofe, la intensități ale luminii care depășesc  $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , produce până la 4,5 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, prelucrabile în biocombustibil pentru aviație. Formează ficocenoze și consorții microbiene împreună cu bacterii benefice, cu eficiență ridicată în fixarea bioxidului de

carbon din emisii industriale și în reducerea nivelului de azot și fosfor în apele uzate epurate.

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

- ✓ Capacitate ridicată de a sechestra cantități semnificative de CO<sub>2</sub>, prin cultivare autotrofă sau mixotrofă;
- ✓ Capacitatea de a crește la intensități luminoase de peste 1000 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, cu acumulare redusă de carotenoizi anti-oxidanți;
- ✓ Rezistență la concentrații de 7% și peste bioxid de carbon în gazele de aerare;
- ✓ Tolerarea concentrațiilor mari de NaHCO<sub>3</sub> / Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, care asigură o „interfață” fizico-chimică favorabilă pentru chemosorbția CO<sub>2</sub> în mediul de cultură;
- ✓ Competență ridicată de colonizare a nișelor ecotehnologice specifice;
- ✓ Conversie ridicată biomasă algală a bioxidului de carbon și componentelor mediilor de creștere, inclusiv a celor mixotrofe;
- ✓ Acumularea de compuși care sunt prelucrabili în bio-kerosen / biocombustibil pentru aviație, respectiv de lipide și/sau acizi grași liberi, cu lungimea catenei hidrocarbonate mai mică de 18 atomi de carbon.

Prezenta invenție se ilustrează prin următorul exemplu.

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

Procedeele de selecție mutatorie utilizat pentru obținerea tulpinii mutatorii este alcătuit din următoarele etape: realizarea unei suspensii de microalge, care conține o populație de microorganisme cu variabilitate ridicată, prin mutagenza tulpinii sălbatică, indusă de 0,5 mM 5-fluorodeoxiuridină; aducerea suspensiei la o densitate optică de 0,25 la 600 nm, corespunzător la 10<sup>6</sup>...10<sup>7</sup> ufc/ ml; diluarea de 1000 ori a suspensiei prin diluții zecimale, până la 10<sup>3</sup>...10<sup>4</sup> ufc/ml; etalarea suspensiei de microalge pe mediu nutrient Zarouch cu 16,8 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 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 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 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.

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 cu dimensiuni reduse ale celor două fotosisteme de pigmenți implicate în recoltarea luminii. Mutantele selectate pe mediu cu metronidazol au o valoare ridicată a zonei de de intensitate luminoasă de saturație și o productivitate superioară în sistemele continue de cultivare, la intensități luminoase mari – a se vedea de ex. Nakajima și Ueda, 2000, J. Appl. Phycol., 12: 285-290.

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 viață. În stadii îmbătrânite poate forma un strat de mucilagiu la suprafața celulelor. Celule sunt mici (4-5  $\mu\text{m}$  mature, 1,5-3  $\mu\text{m}$  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 pirenoide. Tulpina crește bine pe un mediu Zarrouk, tolerând variații mari ale pH în domeniul bazic (7,4-10).

Tulpina *Nannochloris* sp. 424-1 a fost cultivată pe 25 ml mediu Zarrouk, distribuiți în flacoane Erlenmeyer de 200 ml, agitate pe un agitator termostatat Inova 42 R (New Brunswick - Eppendorf, Eppendorf, Hamburg, Germania), barbotate cu dioxid de carbon 7% (v/v) în aer, la o rată de aerare de 1 ml / ml mediu / min, și iluminate cu 250  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , cu un ciclu de 16 ore lumină / 8 ore întuneric. În aceste condiții tulpina a crescut cu 0,275 OD/zi, și un timp de dublare de 2,94 zile.

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 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 Zarouk cu 16,8 g/l  $\text{NaHCO}_3$ , 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.

Tab. 1. Compoziția mediului nutritiv Zarrouk și a mediului Zarouk suplimentat cu glicerină și hidrolizat din proteine algale (Zarouk mixotrof).

Compoziții mediu	Zarouk	Zarouk mixotrof
$\text{NaHCO}_3$	16,80 g/l	16,80 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,50 g/l	0,50 g/l
$\text{NaNO}_3$	1,875 g/l	1,875 g/l
Hidrolizat proteic cu conținut 5% azot	-	12,5
Glicerină	-	1 - 5
$\text{K}_2\text{SO}_4$	1,00 g/l	1,00 g/l
$\text{NaCl}$	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):  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 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;  $\text{MoO}_3$  (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.

\*\* 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 0,93g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ . După fierbere pentru o scurtă durată de timp și răcire la temperatura camerei se aduce soluția finală la un volum de 100 ml.

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 ore. 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.

Tab. 2. Creșterea autotrofă și mixotrofă a tulpinii *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 - 1100 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$	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 creștere, $R_{\text{exp}}$ , zile <sup>-1</sup>	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 biomasa 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 anti-oxidanți. 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  $\text{CO}_2$  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 ore. Aproape un sfert din biomasa uscată este constituită din lipide.

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.

Tab.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  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 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. Componentele soluție stoc microelemente (g/l) au fost: 2,86  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2,03  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,222  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,018  $\text{MoO}_3$  și 0,079  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . 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* Sp 7, și probe tratate cu granule conținând numai tulpina de *Nannochloris* sp 424-1.

Rezultatele, prezentate în tab. 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.

Tab. 3. Reducerea nivelului de azot și fosfor din apele epurate simulate incubate timp de 72 ore cu granule de alginat conținând tulpina de *Nannochloris* sp 424-1 co-immobilizată cu bacterii *Azospirillum brasiliense* Sp 7.

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>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

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 microbiene utilizabile în fixarea bioxidului de carbon prin cultivare pe ape uzate epurate, cu reducerea concomitentă a nivelului de azot și fosfor.

## Revendicări

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 între 100 și 1100  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , cu acumulare redusă de carotenoizi anti-oxidanți, rezistă la concentrații de 7% și peste bioxid de carbon în gazele de aerare, tolerează concentrații ridicate de săruri, în special  $\text{NaHCO}_3$  /  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , prezintă o competență ridicată de colonizare a nișelor ecotehnologice specifice, datorită unei viteze ridicate de creștere, cuprinsă între 0,275 și 0,4 OD/zi și a unui timp scurt de dublare, de 1..3 zile. Pe medii mixotrofe, la intensități ale luminii care depășesc 1000  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , produce până la 4,5 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, prelucrabile în biocombustibil pentru aviație, formează ficocenoze și consoții microbiene împreună cu bacterii benefice, cu eficiență ridicată în fixarea bioxidului de carbon din emisii industriale și în reducerea nivelului de azot și fosfor în apele uzate epurate.