

**UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
CATEDRA DE BIOLOGIE EXPERIMENTALĂ**

Rezumatul tezei de doctorat

**MARKERI MORFOLOGICI, BIOCHIMICI ȘI
MOLECULARI PENTRU IDENTIFICAREA
TULPINILOR DE *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* ÎNALT
PRODUCĂTOARE DE HIDROCARBURI**

**Cond. științific:
Prof. Dr. NICOLAE DRAGOȘ**

**Doctorand:
ADRIANA BICA**

CLUJ-NAPOCA

2010

CUPRINS

1. INTRODUCERE.....	3
2. OBIECTIVELE STUDIULUI.....	5
3. MATERIAL ȘI METODE.....	5
3.1 Material biologic	5
3.2 Metode de cultivare și analiză a creșterii	6
3.3 Metode de microscopie optică și electronică	7
3.4 Analiza cantității și calității hidrocarburilor prin GC-MS	7
3.5 Analiza cantității și calității acizilor grași prin GC-MS	8
3.6 Analiza cantității și calității pigmentilor carotenoidici prin HPLC.....	8
3.7. Analiza filogenetică pe baza ADNr 18S	8
4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	9
4.1 Caracterizarea creșterii tulpinilor AICB cu și fără administrare de CO ₂	9
4.2 Caracterizarea morfologică și ultrastructurală a tulpinilor AICB	12
4.2 Identificarea și cuantificarea hidrocarburilor la tulpinile AICB	15
4.3 Identificarea și cuantificarea acizilor grași la tulpinile AICB.....	20
4.4 Identificarea și cuantificarea pigmentilor carotenoidici la tulpinile AICB	25
4.5. Poziția filogenetică a algei <i>B. braunii</i> , tulpinile AICB pe baza genelor pentru ARNr 18S.....	28
5. Concluzii finale	32
6. Bibliografie selectivă.....	33

1. INTRODUCERE

Microalgele verzi (Chlorophyta), organisme capabile de fotosinteză oxigenică, contribuie alături de alte specii fitoplanctonice la producerea a peste jumătate din producția globală de oxigen. Diversitatea de forme, mărimi și căi metabolice este responsabilă de răspândirea microalgelor în habitate acvatice din toate regiunile geografice. Similaritățile structurale și funcționale cu plantele superioare, organizarea celulară simplă, capacitatea de a sintetiza o gamă variată de metaboliți secundari cu aplicații în industria farmaceutică, alimentară, cosmetică și petrochimică etc., sunt considerente pe care se bazează alegerea algelor verzi drept organisme model în studii de ultrastructură, biochimice și moleculare (*Chlorella spp.*, *Chlamydomonas spp.*, *Dunaliella spp.* etc). Lucrarea de față se referă la specia *Botryococcus braunii*, o algă verde cu potențial biotehnologic în sinteza comubustibililor lichizi.

Între algele verzi, genul *Botryococcus* (clasa Trebouxiophyceae) se remarcă prin capacitatea de a sintetiza cantități însemnate de hidrocarburi (până la 75% din biomasa uscată), nesaturate, similare hidrocarburilor fosile din depozitele de țiței (Moldowan și Seifert, 1980). Analizele fizico-chimice ale kerogenului din cărbunii algali identificați în diverse zone geografice au evidențiat o compoziție similară cu hidrocarburile algei verzi *B. braunii*. Această constatare a reprezentat premisa numeroaselor studii care au urmărit în primul rând evaluarea diversității chimice a tulpinilor. În această direcție s-au remarcat îndeosebi, cercetările lui Pierre Metzger, Claude Largeau, Eliette Casadevall și alții, aparținând Laboratorului de Chimie Bioorganică și Fizică Organică din Paris. Concluziile lor au stat la baza clasificării tulpinilor în cele trei tipuri de rase chimice, A, B și L. Rasa A produce alcadiene ($C_{23}-C_{31}$) și alcatriene ($C_{27}-C_{31}$), în timp ce rasa B sintetizează preponderent hidrocarburi de tipul triterpenelor numite botriococcene și scvalene ($C_{30}-C_{37}$) cu formula generală C_nH_{2n-10} . Tulpinile *B. braunii* din cele două rase prezintă un areal de răspândire mai mare, fiind semnalate în regiuni temperate, tropicale și alpine. Puținele tulpini care sunt cunoscute ca aparținând rasei L au fost colectate numai din zone tropicale (Metzger și colab., 1988). Dintre aceste rase, rasa B este cea mai potrivită pentru aplicațiilor biotehnologice datorită conținutului mai ridicat de hidrocarburi, mai mare față de celelalte rase, dar rata redusă de diviziune reprezintă un inconvenient major în această direcție. Numeroase încercări au fost derulate pentru îmbunătățirea procesului de creștere, coroborat cu sinteza hidrocarburilor. Un timp de dublare de aproximativ 3 zile a fost obținut în condiții de

administrare de CO₂ (1%) și agitare mecanică, o valoare mult mai scăzută în comparație cu alte alge verzi (*Chlorella spp.*, *Scenedesmus spp.*).

Capacitatea de a sintetiza predominant un anumit tip de hidrocarburi reprezintă deocamdată singurul criteriu de diferențiere al tulpinilor acestei alge. Gradul ridicat de diversitate morfologică face imposibilă sistematizarea acestora din acest punct de vedere, fapt sesizat în literatura de specialitate în care a fost propus fie un gen cu 13 specii (Komárek și Marvan, 1992), fie cu 2 specii (Zalessky, 1926; Komárková, J., 1991). Analize filogenetice pe baza markerilor moleculari (ADNr 18S) susțin un gen monospecific, *B. braunii* fiind singura specie a genului (Plain și colab., 1993).

Lucrarea de față și-a propus: 1) caracterizarea morfologică, biochimică și moleculară a unor tulpini de *B. braunii* din Colecția de Alge și Cianobacterii a Institutului de Cercetări Biologice, Cluj-Napoca (AICB); 2) evaluarea potențialului biotehnologic prin prisma ratei de creștere și a sintezei hidrocarburilor la tulpinile studiate.

Gradul de originalitate pe plan național și internațional al acestei lucrări reiese din mai multe aspecte. În primul rând, prin cele 30 de tulpini investigate (rasele chimice A și B), izolate din material biologic colectate din diverse zone ale Transilvaniei, acest studiu reprezintă o valorificare a colecției AICB, unică în țara noastră prin numărul și diversitatea microorganismelor fotosintetizante.

Pe plan internațional, caracterul de noutate al tezei este reliefat prin analiza unui număr mare de tulpini aparținând algei *B. braunii*, dar și prin aspectele multiple care au fost urmărite. Acestea s-au referit la observații morfologice, monitorizarea creșterii în sistem batch cu/fără barbotare de CO₂, identificarea calitativă și cantitativă a hidrocarburilor, carotenoidelor, clorofilelor și acizilor grași sintetizați. Analizele filogenetice pe baza secvențelor ADNr 18S au urmărit identificarea unor markeri moleculari care ar putea susține clasificarea tulpinilor în cele două rase chimice A și B. Având în vedere potențialul biotehnologic al acestei alge a fost propus un set de tulpini AICB capabile de sinteza unor cantități importante de hidrocarburi (botriococcene și scvalene metilate), într-un proces de creștere cu o valoare minimă a timpului de dublare al biomasei.

2. OBIECTIVELE STUDIULUI

- ❖ Caracterizarea procesului de creștere pe baza parametrilor specifici (curba de creștere, pH-ul, densitatea optică, rata de creștere exponențială, timpul de dublare, pigmenții clorofilieni) în condiții de cultivare cu și fără administrare de CO₂;
- ❖ Caracterizarea morfologică și ultrastructurală a 30 de tulpini ale algei *B. braunii*, din rasele chimice A și B, cu scopul de a evidenția trăsăturile specifice rasei chimice;
- ❖ Identificarea și cuantificarea hidrocarburilor sintetizate de tulpinile AICB, aparținând raselor A și B;
- ❖ Determinarea calitativă și cantitativă a acizilor grași și reliefaarea diferențelor constatate între tulpinile celor două rase;
- ❖ Analiza cantitativă și calitativă a pigmentilor carotenoidici identificați în extractele tulpinilor AICB, rasele A și B;
- ❖ Analiza filogenetică pe baza markerului nuclear ADN_r 18S, cu scopul de a evidenția o posibilă susținere genetică pentru departajarea tulpinilor de *B. braunii* în rasele chimice A și B.

3. MATERIAL ȘI METODE

3.1 Material biologic

Materialul biologic care a făcut obiectul acestui studiu a constat din 30 de tulpini ale *B. braunii*, depozitate în Colecția de Alge și Cianobacterii (AICB) a Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca (tab. 1). Acestea au fost colectate din algoflora Transilvaniei (jud. Cluj, Mureș, Bihor și Sibiu). Cu o singură excepție AICB 476 care provine dintr-un bazin acvatic salin (Ocna Sibiului), toate tulpinile AICB analizate au fost colectate din bazine acvatice dulcicole sau salmastre. În prezent, toate tulpinile AICB investigate, aparținând algei *B. braunii* sunt menținute în colecție pe mediul BG 11.

Tabel nr. 1

Lista tulpinilor AICB, aparținând speciei *B. braunii*, investigate morfologic, biochimic și molecular.

Nr. crt.	Codul tulpinii	Rasa	Biotop	Localizare geografică	Mediul nutritiv	Stadiul actual
1	AICB 53	A	baltă eutrofă	Sălicea (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
2	AICB 413	B	baltă eutrofă	Cheile Turului (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
3	AICB 414	B	baltă piscicolă	Mărtinești (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
4	AICB 415	A	baltă piscicolă	Turda (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
5	AICB 416	B	baltă piscicolă	Mărtinești (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală

6	AICB 418	B	baltă piscicolă	Mărtinești (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
7	AICB 434	B	baltă eutrofă	Mărtinești (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
8	AICB 438	B	baltă piscicolă	Mărtinești (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
9	AICB 440	B	baltă piscicolă	Mărtinești (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
10	AICB 441	A	baltă salmastră	Turda (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
11	AICB 442	B	baltă piscicolă	Mărtinești (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
12	AICB 462	A	baltă salmastră	Turda (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
13	AICB 464	A	baltă salmastră	Turda (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
14	AICB 472	A	baltă dulcicolă	Turda (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
15	AICB 475	A	baltă salmastră	Turda (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
16	AICB 476	A	lac salin	Ocna Sibiului (jud. Sibiu)	BG 11	tulpină unialgală
17	AICB 749	A	baltă eutrofă	Turda (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
18	AICB 851	A	baltă piscicolă	Țaga Mare (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
19	AICB 855	A	baltă piscicolă	Tăureni (jud. Mureș)	BG 11	tulpină unialgală
20	AICB 856	A	lac	Lacul Steluței (jud. Bihor)	BG 11	tulpină unialgală
21	AICB 857	A	baltă piscicolă	Tăureni (jud. Mureș)	BG 11	tulpină unialgală
22	AICB 858	A	baltă piscicolă	Tăureni (jud. Mureș)	BG 11	tulpină unialgală
23	AICB 859	A	baltă piscicolă	Tăureni (jud. Mureș)	BG 11	tulpină unialgală
24	AICB 860	A	baltă piscicolă	Tăureni (jud. Mureș)	BG 11	tulpină unialgală
25	AICB 861	A	baltă piscicolă	Tăureni (jud. Mureș)	BG 11	tulpină unialgală
26	AICB 862	A	baltă piscicolă	Tăureni (jud. Mureș)	BG 11	tulpină unialgală
27	AICB 870	B	baltă piscicolă	Cristuru (jud. Bihor)	BG 11	tulpină unialgală
28	AICB 872	B	baltă piscicolă	Tăureni (jud. Mureș)	BG 11	tulpină unialgală
29	AICB 874	A	baltă eutrofă	Turda (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală
30	AICB 878	A	baltă eutrofă	Turda (jud. Cluj)	BG 11	tulpină unialgală

3.2 Metode de cultivare și analiză a creșterii

Protocolul de analiză a creșterii a presupus utilizarea unui inocul prelevat din preculturi aflate în fază exponențială de creștere. Au fost folosite vase de creștere de aprox. 250 ml ori 500 ml cu soluție nutritivă BG 11. Vasele de creștere au fost menținute la temperatura camerei ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), iluminate permanent cu lumină fluorescentă albă (2500 lucși) și agitate continuu cu flux de aer. Perioada de cultivare s-a încadrat în intervalul 30-100 zile. Toate cele 30 de tulpini AICB care au făcut obiectul acestui studiu au fost cultivate în acest mod cel puțin o dată.

O a doua modalitate de creștere a presupus inocularea unui volum de aproximativ 100 ml suspensie algală într-un bioreactor de tip Applikon, prevăzut cu anexe necesare pentru realizarea unei iluminări permanente, 24h/zi ($630 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Unele tulpini AICB au fost crescute cu sau fără administrare de CO_2 , în bioreactorul Applikon. CO_2 a fost administrat sub formă de amestec aer- CO_2 în diverse proporții. Indiferent de concentrația CO_2 în amestec, prin reglarea debitului, s-a obținut un debit efectiv al CO_2 în vasul de cultură (1 litru) de 0,02 l/min. Schimbul de gaze dintre suspensia algală și aer a fost facilitat printr-o agitare mecanică

permanentă (400 rpm). Temperatura a fost menținută la o valoare constantă de 25°C. Valoarea pH-ului a fost urmărită zilnic.

Curbele de creștere au fost calculate după Sorokin (1973), pe baza densității optice. Valorile brute au fost logaritmice în baza 2, diferențele față de inocul ($\Delta \log_2$) fiind reprezentate grafic (curba de creștere). Logaritizarea în baza 2 a fost necesară deoarece permite o calculare facilă atât a ratei de creștere cât – mai ales – a timpului de dublare.

Extracția pigmentilor s-a efectuat în acetonă. Identificarea componentelor pigmentari s-a făcut pe baza lungimii maxime de absorbție, respectiv: 663 nm pentru clorofila *a*, 645 nm pentru clorofila *b* și 480 nm pentru totalul de carotenoide. Exprimarea cantitativă s-a făcut pe baza coeficienților specifici de absorbție după metoda lui Arnon (1949) pentru clorofile, iar pentru carotenoide s-a utilizat metoda lui Goodwin (1976) și Britton și colab. (1995).

3.3 Metode de microscopie optică și electronică

În ceea ce privește microscopia optică, protocolul de lucru a presupus observarea directă a fiecărei tulpini la un microscop optic Olympus BX-41 și fotografierea digitală și efectuarea măsurătorilor necesare (dimensiuni ale celulelor și coloniilor, etc).

Pentru observarea în SEM, eșantioanele de suspensie algală au fost analizate cu ajutorul unui microscop electronic cu baleiaj tip Jeol JSM 5510LV, la o tensiune de accelerare de 10 kV și cu un spot mărimea 5.

Investigațiile TEM au permis obținerea unor secțiuni ultrafine utilizând un microscop TEM Jeol JEM 1010.

3.4 Analiza cantității și calității hidrocarburilor prin GC-MS

În cazul algei *Botryococcus braunii* am utilizat un amestec de extracție: cloroform: metanol: apă în raportul de 1 : 1 : 0,5 (v/v/v). Separarea amestecului în două faze specifice a făcut posibilă extragerea hidrocarburilor în cloroform, care constituie faza inferioară.

Cuplajul gaz cromatografie – spectrometrie de masă s-a dovedit a fi nu numai o tehnică de detecție foarte sensibilă, ci și cea mai sigură metodă de identificare a compușilor separați. În spectrometrul de masă, moleculele separate prin gaz cromatografie sunt fragmentate în fragmente ionizate, accelerate și ulterior detectate în funcție de sarcina electrică, specifică fiecărui compus. Separarea s-a realizat cu programarea liniară a temperaturii coloanei de la 60° C până la 280-300°C. Ca fază mobilă s-a utilizat azotul (pentru detectorul cu ionizare în flacără) respectiv heliul (pentru spectrometrul de masă). S-a utilizat în acest scop un gaz cromatograf Agilent Technologies 6890 N cuplat cu un spectrometru de masă Agilent Technologies 5973 N.

3.5 Analiza cantității și calității acizilor grași prin GC-MS

Au fost identificați și dozați în special acizi grași cu catene lungi (C_{12} - C_{22}), saturați, respectiv nesaturați, cu diverse grade de nesaturare. Acizii grași au fost determinați din aceleași extracte ale biomasei algale din care s-au analizat și hidrocarburile, prelucrate așa cum s-a arătat mai sus. Pentru separarea acizilor grași s-a utilizat o coloană capilară conținând o fază staționară polară. O bună separare s-a putut obține prin programarea liniară a temperaturii coloanei într-un gaz cromatograf gaz - cromatograf HP 4890 D. Analiza cantitativă a acizilor grași s-a realizat prin metoda normării ariilor. Ariile picurilor cromatografice au fost calculate electronic.

3.6 Analiza cantității și calității pigmentilor carotenoidici prin HPLC

Extracția carotenoidelor din suspensiile algale s-a efectuat prin saponificare directă a acestora cu o soluție de 30% KOH în etanol. Spectrofotometru Pekin-Elmer Lambda 3 conectat la un înregistrator Perkin Elmer R 100 A a fost utilizat pentru măsurarea absorbanelor extractelor de carotenoide (în vederea determinării conținutului total de carotenoide) și a soluțiilor de referință (în vederea determinării cu acuratețe a concentrației acestora). Monitorizarea separărilor a fost efectuată la lungimea de undă de 450 nm, separările fiind conduse la o temperatură de 35°C; în aceste condiții, presiunea din sistem a înregistrat o valoare constantă de 144 bar. S-a utilizat un sistem HPLC Agilent 1100. Analiza cantitativă a carotenoidelor a fost limitată la carotenoidele pentru care au existat standarde disponibile, s-a bazat pe metoda standardului extern, procedura de lucru fiind cea a lui Hart (1995).

3.7. Analiza filogenetică pe baza ADNr 18S

Obținerea secvențelor de ADNr 18S a presupus extracția de ADN genomic, folosind kituri comerciale cu ajutorul cărora am obținut un grad ridicat de puritate. Folosind amorse specifice (Senousy și colab., 2004) am efectuat reacția PCR standard. Fragmentele obținute au fost direct secvențate sau clonate în prealabil în vectori de clonare (pGEM-T). Secvențarea s-a realizat folosind analizorul genetic ABI Prism 310 și Beckman Coulter 8800 (ICEI). Fragmentele genice obținute au fost asamblate folosind programul *Vector NTI Advanced v. 9.0*. Validarea secvențelor s-a efectuat folosind opțiunea blastn (BLAST-NCBI). Pentru alinierea multiplă a secvențelor obținute au fost extrase din baza de date Entez Gene (NCBI) 42 secvențe ADNr 18S. Pentru aliniere a fost folosit programul *Mega 4.1*.

Pentru construirea arborilor filogenetici pe baza secvențelor ADN_r 18S obținute în urma secvențării am folosit două metode distincte: fenetică (de distanță) (metoda „Evoluției Minime”) și cladistică (metoda „Parcimoniei Maxime”).

4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.1 Caracterizarea creșterii tulpinilor AICB cu și fără administrare de CO₂

Evaluarea procesului de creștere al tulpinilor AICB prin parametri calculați au evidențiat diferențe majore în funcție de tulpină și condițiile de creștere. Culturile barbotate cu aer ambiental și fără agitare, au prezentat valori ale ratei de creștere între 0,03-0,31 DO/zi cu un timp de dublare de la 3,27 la 33,14 zile (tab. 2).

Tabel nr. 2

Parametrii de creștere calculați pe baza măsurării densității optice a suspensiilor algale la tulpinile AICB studiate.

Parametrul calculat	Tulpina AICB									
	53		851		416		418		442	
	+ CO ₂	-CO ₂	+ CO ₂	+ CO ₂	-CO ₂	+ CO ₂	-CO ₂	+ CO ₂	-CO ₂	-CO ₂
Rata exponențială de creștere	1,72	0,1	0,17	0,3	0,31	2,01	0,24	0,25	0,08	0,03
Timpul de dublare	0,58	9,69	6,05	3,35	3,27	0,5	4,12	4,05	12,21	33,44

Notă: Timpul de dublare este cuantificat în zile iar rata exponențială de creștere în unități relative de DO/zi.

Administrarea de amestec CO₂ în aer, în condiții de agitare permanentă a îmbunătățit procesul de creștere. În aceste condiții, rata de creștere s-a situat în intervalul 0,17-2,01, iar timpul de dublare a prezentat un minim de 0,5 și un maxim de 6,05 zile (tab. 2., fig. 1-4).

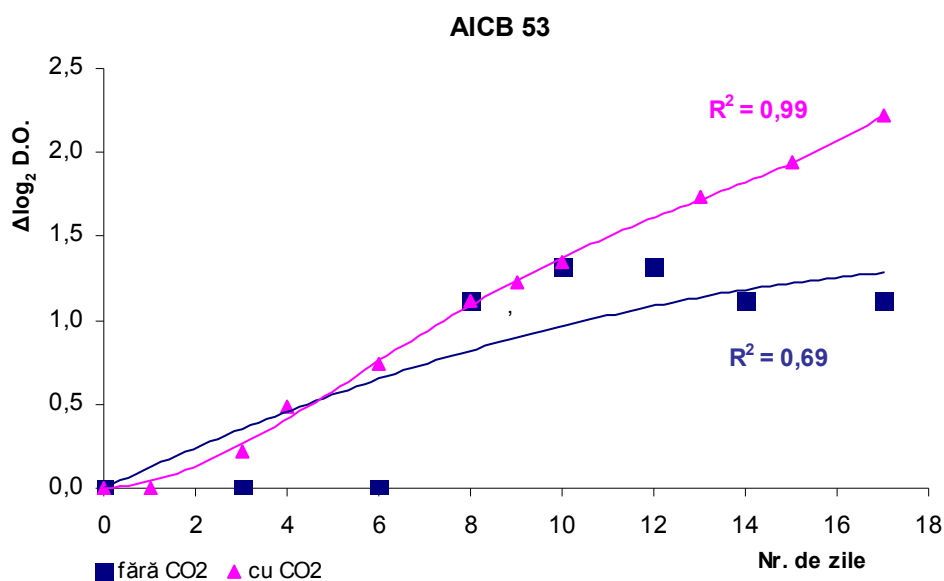


Fig. 1. Curbele de creștere obținute pe baza D.O. (600 nm) la tulpina AICB 53 (rasa A), cultivată în bioreactorul Applikon, în prezența și absența CO₂ (0,02 l/min).

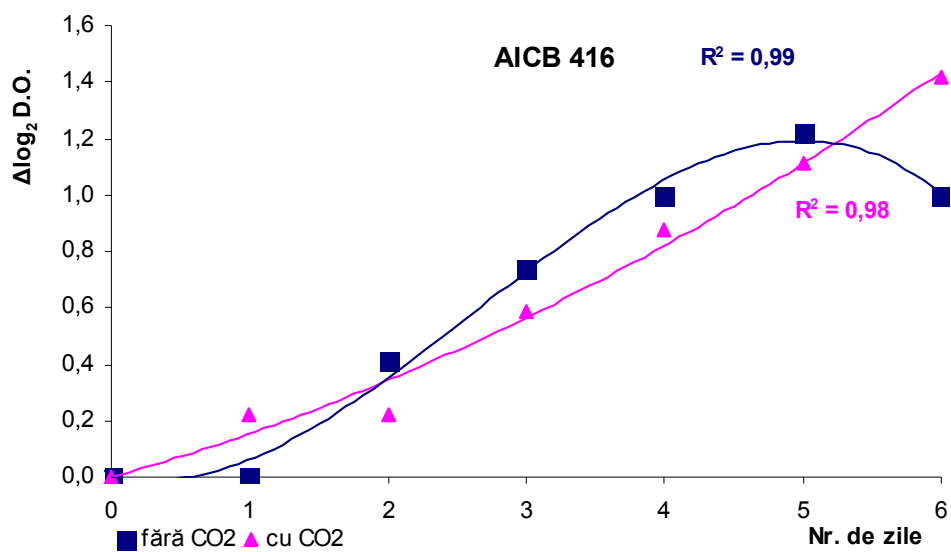


Fig. 2. Curbele de creștere obținute pe baza D.O. (600 nm) la tulpina AICB 416 (rasa B), cultivată în bioreactorul Applikon, în prezența și absența CO₂ (0,02 l/min).

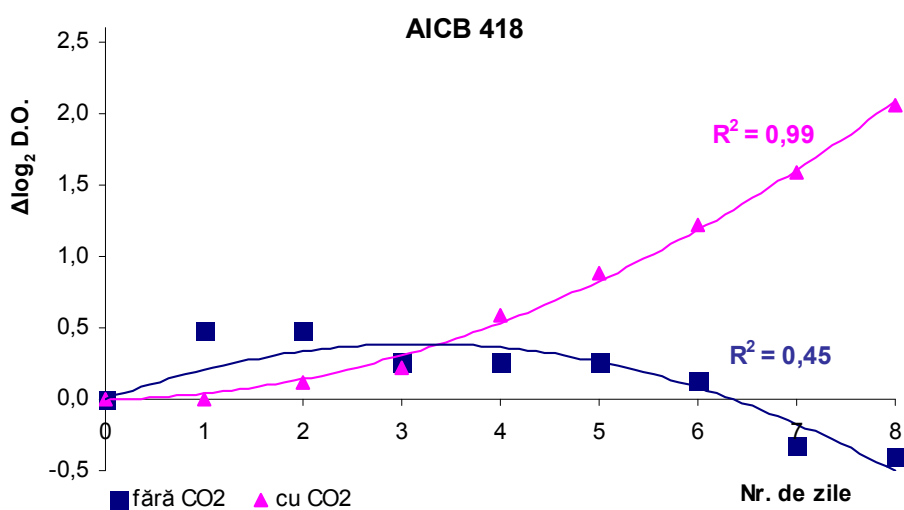


Fig. 3. Curbele de creștere obținute pe baza D.O. (600 nm) la tulpina AICB 418 (rasa B), cultivată în bioreactorul Applikon, în prezența și absența CO₂ (0,02 l/min).

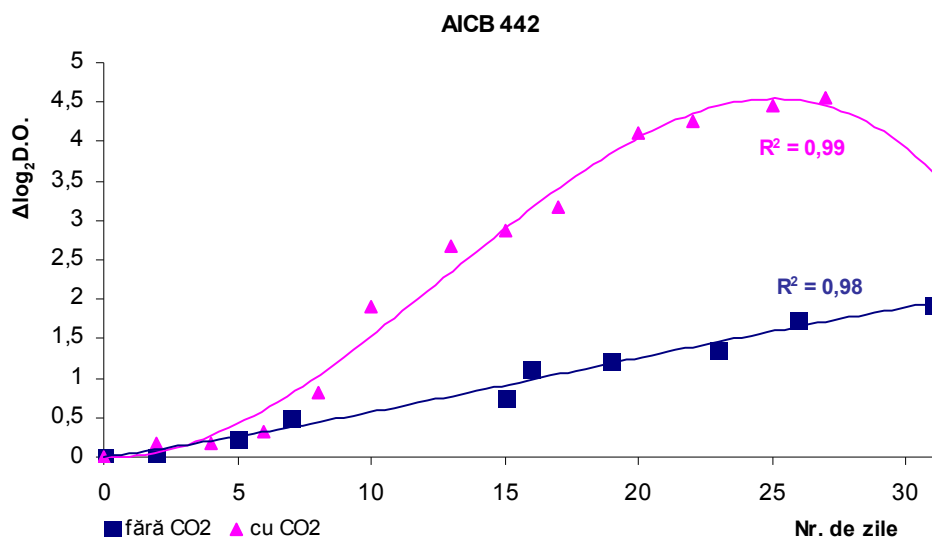


Fig. 4. Curbele de creștere obținute pe baza D.O. (600 nm) la tulpina AICB 442 (rasa B), cultivată în bioreactorul Applikon, în prezența și absența CO₂ (0,02 l/min).

În timp ce conținutul minim de pigmenți clorofilieni a fost relativ constant pentru tulpinile celor două rase (0,52% rasa B și 0,50% rasa A) limita superioară a fost mai ridicată pentru tulpinile rasei A. Diferențele majore ale valorilor raportului clorofile/carotenoide, observate între cele două rase, au evidențiat capacitatea tulpinilor rasei A de a sintetiza cantități mai ridicate de clorofile și mai scăzute în cazul carotenoidelor (fig. 5). Acestea din urmă au fost prezente într-un procentaj mai ridicat la tulpinile rasei B, care au produs cantități mai reduse de clorofile.

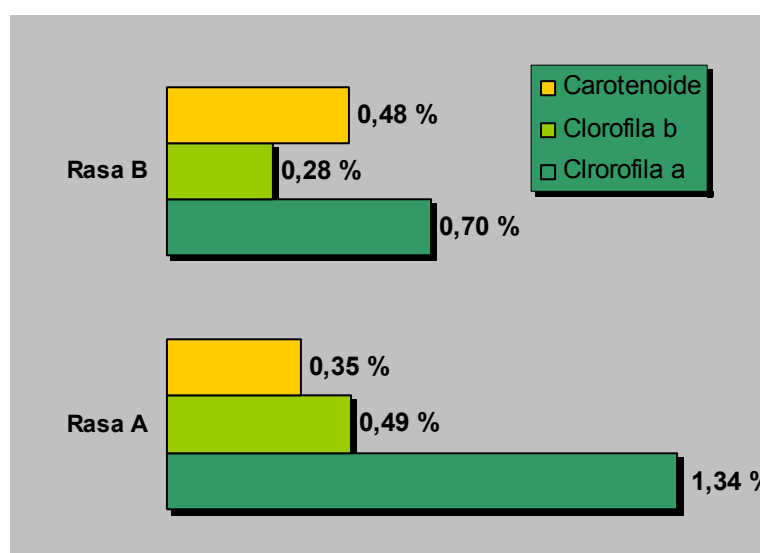


Fig. 5. Reprezentarea conținutului de clorofila a, clorofila b și carotenoide la tulpinile AICB aparținând raselor chimice A și B, cultivate în absența CO₂.

Deși toate tulpinile cultivate în condiții de administrare cu CO₂ au manifestat rate de creștere exponențiale mai ridicate, conținutul de clorofilă a scăzut în cazul tulpinilor rasei A și a unei tulpini din rasa B (fig. 6). Cu excepția tulpinii AICB 53, tendințele de creștere/scădere a conținutului de pigmenți clorofilieni a urmat aceeași tendință cu procesul de sinteză al hidrocarburilor.

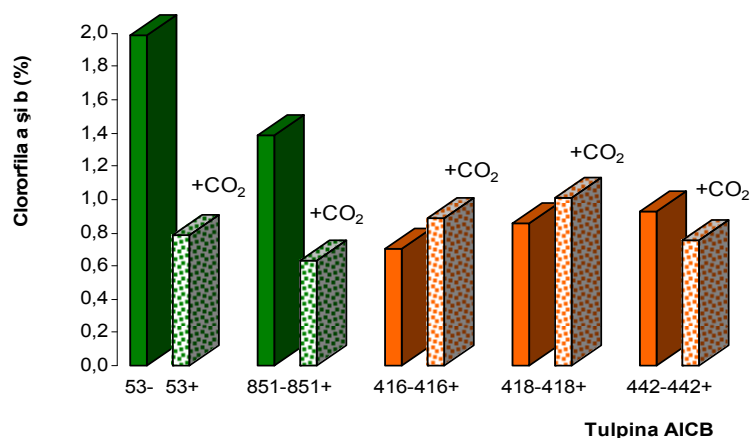


Fig. 6. Reprezentarea conținutului de clorofilă *a* și *b* la tulpinile AICB aparținând raselor chimice A și B, cultivate în prezența/absența CO₂.

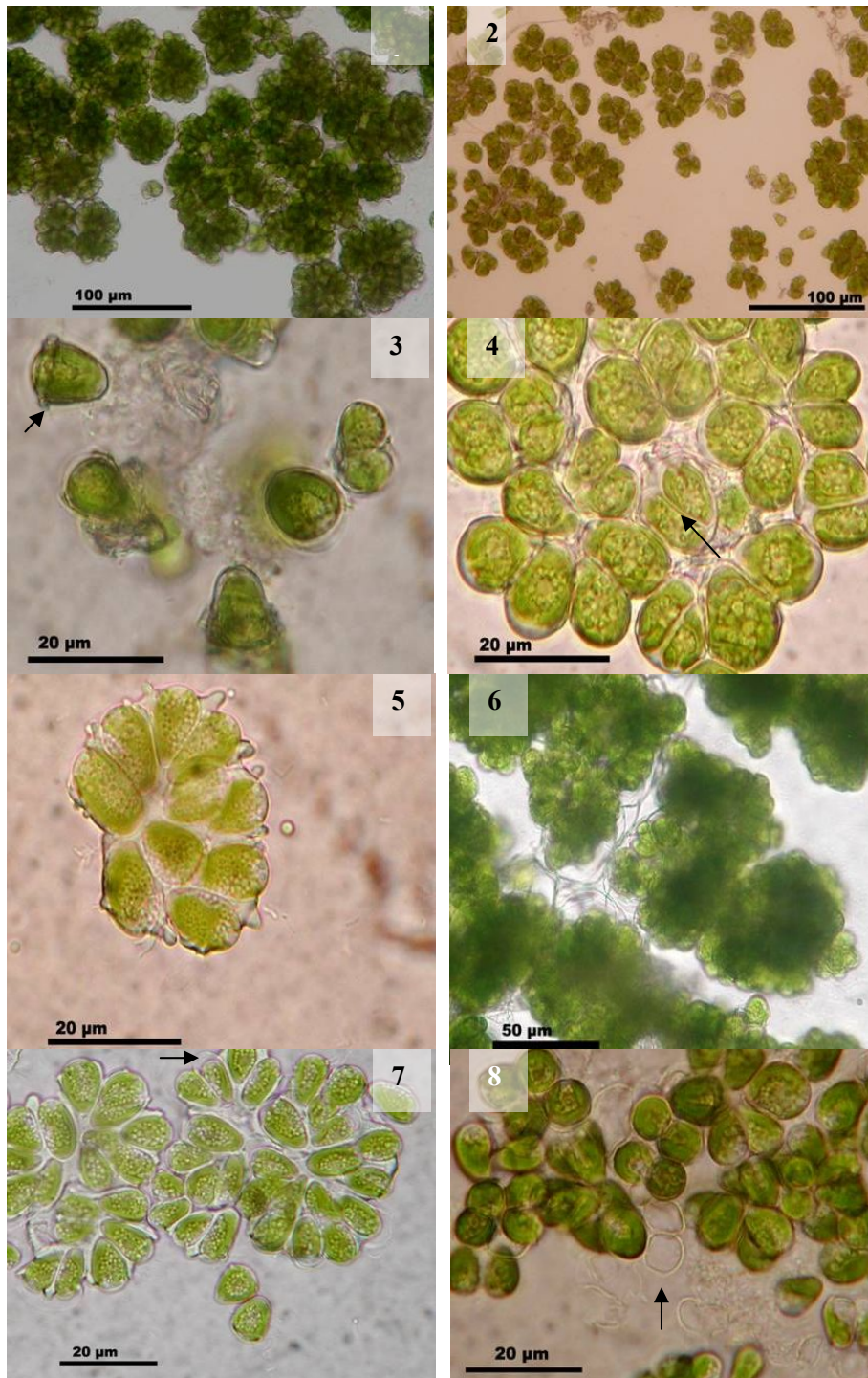
4.2 Caracterizarea morfologică și ultrastructurală a tulpinilor AICB

Examinările în microscopia optică au evidențiat anumite trăsături distinctive la tulpinile celor două rase. Acestea au fost detaliate în explicațiile celor 3 planșe (Pl. 1-3). Caracterele morfologice ale coloniilor provenite din culturi crescute în prezența CO₂ nu se modifică, cu excepția matricii extracelulare mai ample, în cazul în care a fost sesizată o sinteză mai mare a hidrocarburilor.

Abordarea ultrastructurală (TEM) în caracterizarea tulpinilor AICB nu a surprins diferențe semnificative între tulpinile celor două rase (A și B).

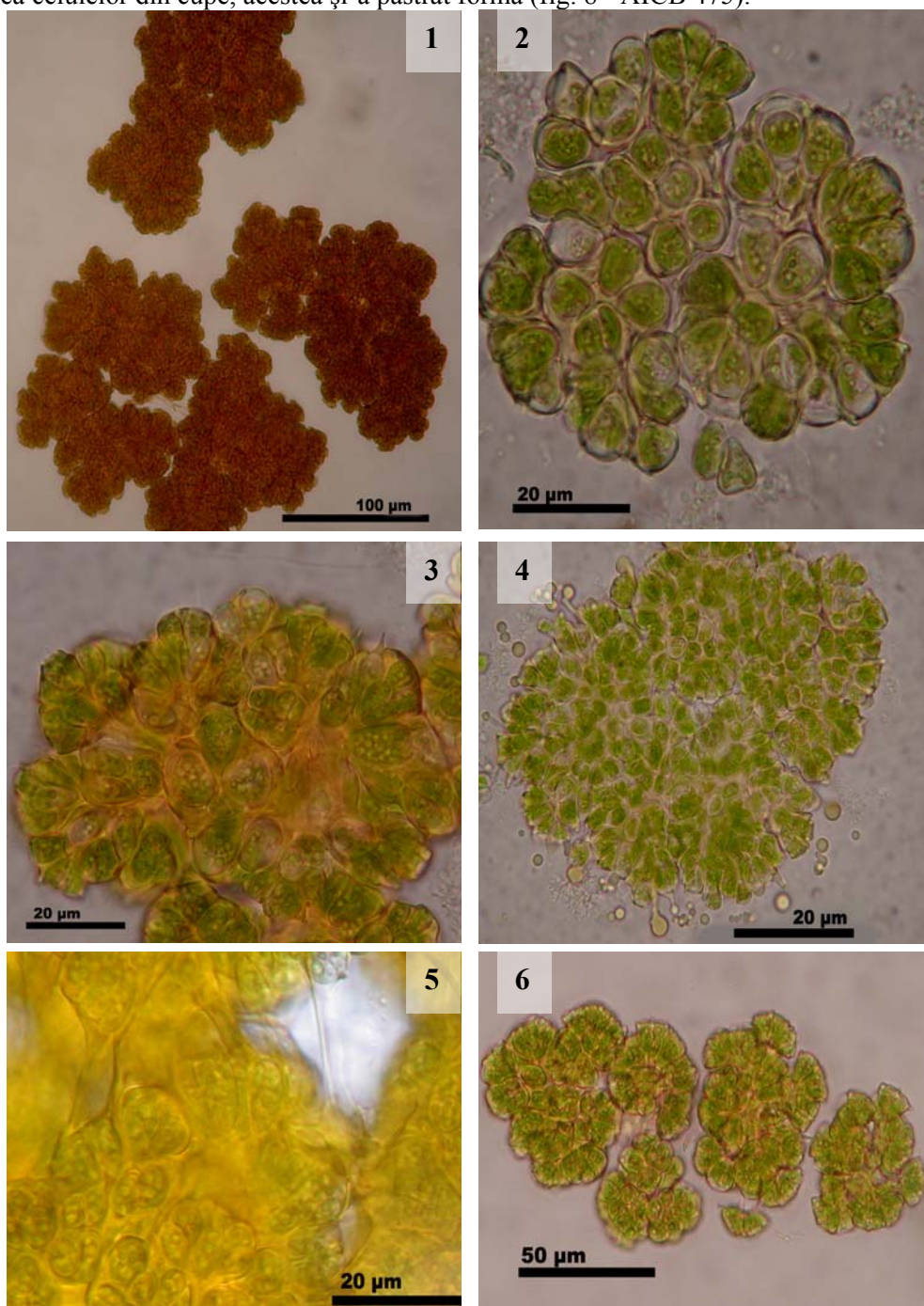
La tulpinile rasei A (AICB 851, 53), hidrocarburile sunt localizate cu precădere în interiorul celulei sub formă de corpuri lipidice. În cazul rasei B (AICB 440), acestea sunt externalizate, între plasmalemă și peretele celular (TLS) formând împreună cu straturile succesive ale TLS, o matrice extracelulară abundentă. Corpurile lipidice sunt înconjurată de formațiuni tubulare (probabil REN) și numeroși poliribozomi. Cloroplastul a fost evidențiat parietal în imediata vecinătate a plasmalemei. Pirenoidul a fost vizibil la tulpina AICB 440, alături de numeroase granule de amidon, în timp ce tulpina AICB 851 este aparent lipsită de

această formațiune. RER și aparatul Golgi au fost observate în regiunea apicală a celulei, sub cupa de hidrocarburi.

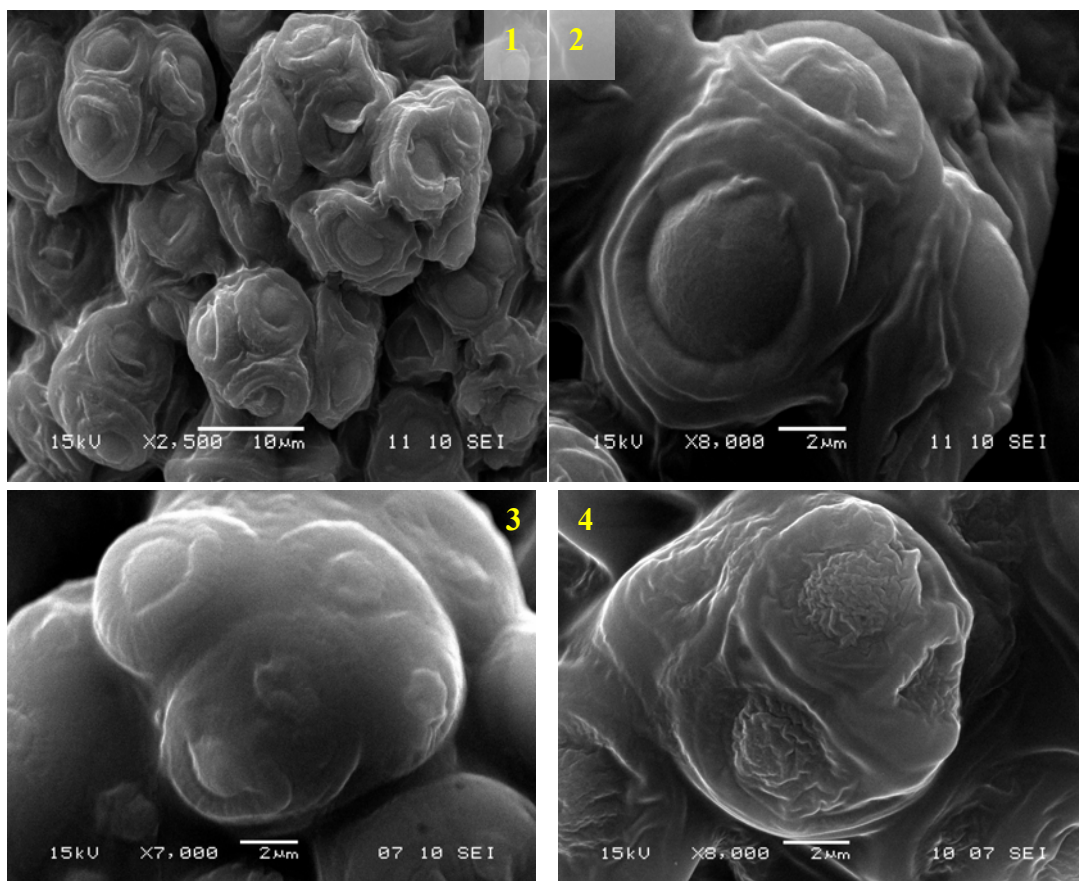


Planșa I (fig. 1-8). *Botryococcus braunii*, rasa A – microscopie optică. Colonii variabile ca număr de celule și consistență; au fost observate colonii compacte, cu număr mare de celule la tulpina AICB 859 (fig. 1) și colonii laxe cu număr mai mic de celule la AICB 441 (fig. 2). De asemenea, au fost prezente și celulele singulare la care au fost observate formațiuni îngroșate în regiunea superioară a cupei (evidențiat prin săgeată) (fig. 3 - AICB 861). La unele tulpini (AICB 53) celulele nu au prezentat numai forme tipice (fig. 4), planul de diviziune fiind localizat longitudinal (evidențiat prin săgeată). Prin presare pe lama microscopică, hidrocarburiile au fost eliberate la periferia coloniei sub formă de picături (fig. 5 - AICB 857). Elementele structurale fibroase, au fost observate în unele suspensii (fig. 6 - AICB 415). Uneori, celulele au prezentat o

calotă care acoperă regiunea apicală (evidențiată prin săgeată) (fig. 7 - AICB 857). După eliberarea celulelor din cupe, acestea și-a păstrat forma (fig. 8 - AICB 475).



Planșa II (fig. 1-6). *Botryococcus braunii*, rasa B – microscopie optică. Coloniile sunt compacte, cu număr mare de celule (fig. 1 – AICB 442), înglobate complet în matricea extracelulară (fig. 3 – AICB 872). Celulele au un aspect piriform tipic și pot fi observate doar prin presare pe lama microscopică (fig. 2, fig. 4 – AICB 872). Formațiuni fibrilare care interconectează coloniile între ele au fost observate la toate tulpinile AICB analizate (fig. 5 – AICB 413). Unele colonii pot fi mai mici (fig. 6 – AICB 872), dar organizarea botrioidă se păstrează și în acest caz.



Planşa III (fig. 1,2). *Botryococcus braunii*, rasa A – SEM. Celulele sunt acoperite de teaca poliglucidică impregnată cu hidrocarburi pe aproximativ două treimi din suprafața lor, apexul proeminând la periferie (fig. 1, 2 - AICB 415); **(fig. 3, 4).** *Botryococcus braunii*, rasa B – SEM. Coloniile au un aspect compact, cu matrice extracelulară bine dezvoltată. Cupa impregnată cu hidrocarburi, acoperă în întregime (fig. 3 – AICB 438) sau aproape în întregime (fig. 4 – AICB 870) apexul celular.

4.3 Identificarea și cuantificarea hidrocarburilor la tulpinile AICB

Din punct de vedere al calității și cantității hidrocarburilor sintetizate au fost investigate un număr de 30 de tulpini AICB aparținând speciei *B. braunii*, 10 din rasa B și 20 din rasa A. În cazul a 20 de tulpini aparținând ambelor rase am efectuat 2-3 extracte lipidice provenite din experimente de creștere distincte. Cinci tulpini AICB (2 din rasa A și 3 din rasa B) au fost cultivate în condiții de administrare de CO₂.

Tulpinile AICB aparținând rasei B au sintetizat un conținut mai mare de hidrocarburi (16,77%), comparativ cu tulpinile rasei A (5,26%) (fig. 7).

În extractele lipidice ale tulpinilor AICB au fost evidențiate atât diolefine (alcadiene și alcatriene), cât și hexaolefine (hexadiene), indiferent de rasa chimică. Proporția celor două categorii de hidrocarburi au fost diferite la cele două rase. Astfel, prima categorie a predominat la tulpinile rasei A (4,92%) și a fost mai puțin reprezentată la tulpinile rasei B

(2,74%). Hexadienele au reprezentat fracțiunea majoritară la tulpinile rasei B (14,41%) și au fost prezente într-o fracțiune nesemnificativă la tulpinile rasei A (0,39%) (fig. 7, 8).

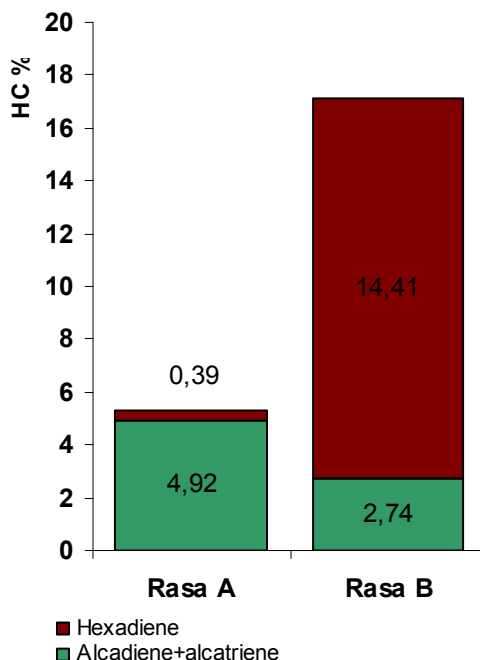


Fig. 7. Valorile procentuale ale conținutului absolut al alcadienelor, alcatrienelor (verde) și hexadienelor (maron) la tulpinile AICB aparținând celor două rase chimice.

Indiferent de rasa chimică, alcadiena C_{29} a fost cea mai bine reprezentată la tulpinile AICB analizate, iar alcadiena C_{27} a lipsit în majoritatea extractelor lipidice. Dintre hexadiene, compusul C_{30} (cel mai probabil scvalena) a predominat la tulpinile rasei A. La tulpinile rasei B, acest statut l-au avut omologii superiori ai hexadienelor C_{31} , C_{32} (cel mai probabil botriococene).

Administrarea unei concentrații de 0,02 l/min CO_2 a contribuit la creșterea conținutului de hidrocarburi la trei tulpini (AICB 53, 416, 418), în timp ce la celelalte două s-a observat scăderea acestuia (AICB 851, 442) (fig. 10). Aceste rezultate au fost independente de rasa chimică căreia i-au aparținut tulpinile. Creșterea a avut loc pe seama alcadienei C_{29} la tulpina AICB 53 (rasa A) și pe baza hexadienelor C_{31} , C_{32} , la tulpinile rasei B (AICB 416, 418) (fig. 11). Scăderea conținutului absolut al hidrocarburilor s-a datorat absenței alcadienei C_{29} la tulpinile AICB 442 (rasa B) și 851 (rasa A) (fig. 11). În acest ultim caz, am observat creșterea cantității alcadienei C_{31} .

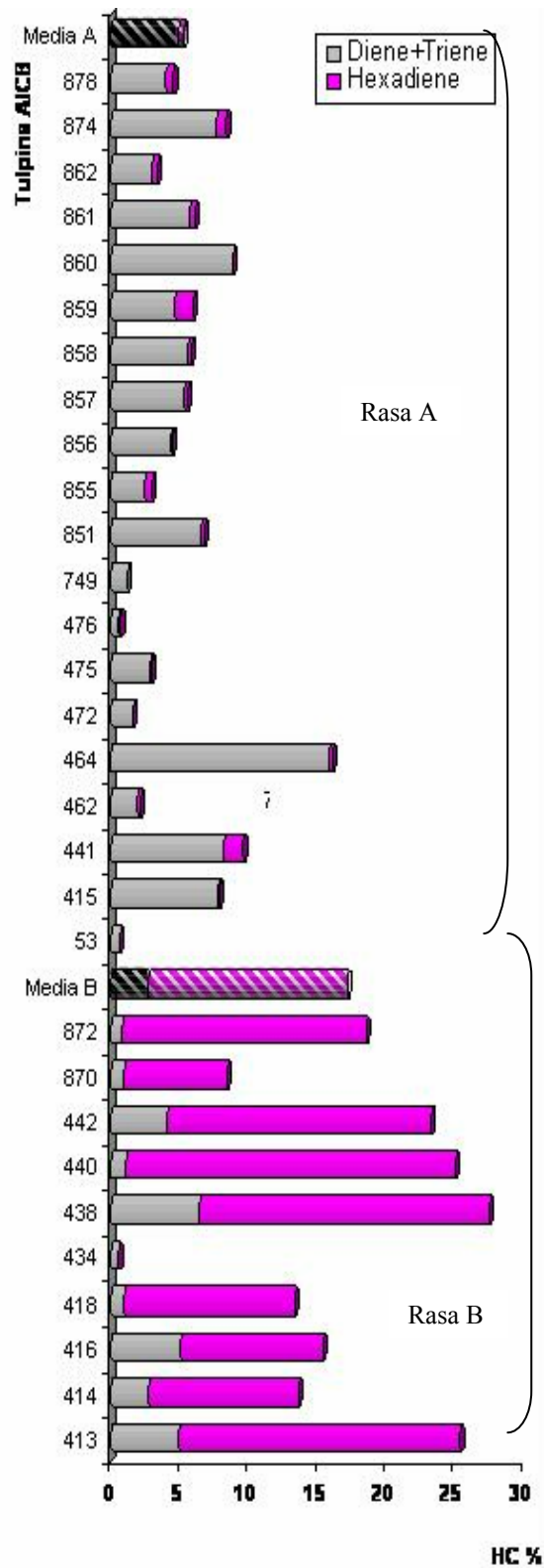


Fig. 8. Valorile procentuale ale conținutului absolut al alcadienelor, alcatrienelor (gri) și hexadienelor (mov) la tulpinile AICB analizate.

Valorile procentuale ale diferitelor tipuri de HC la tulpinile AICB

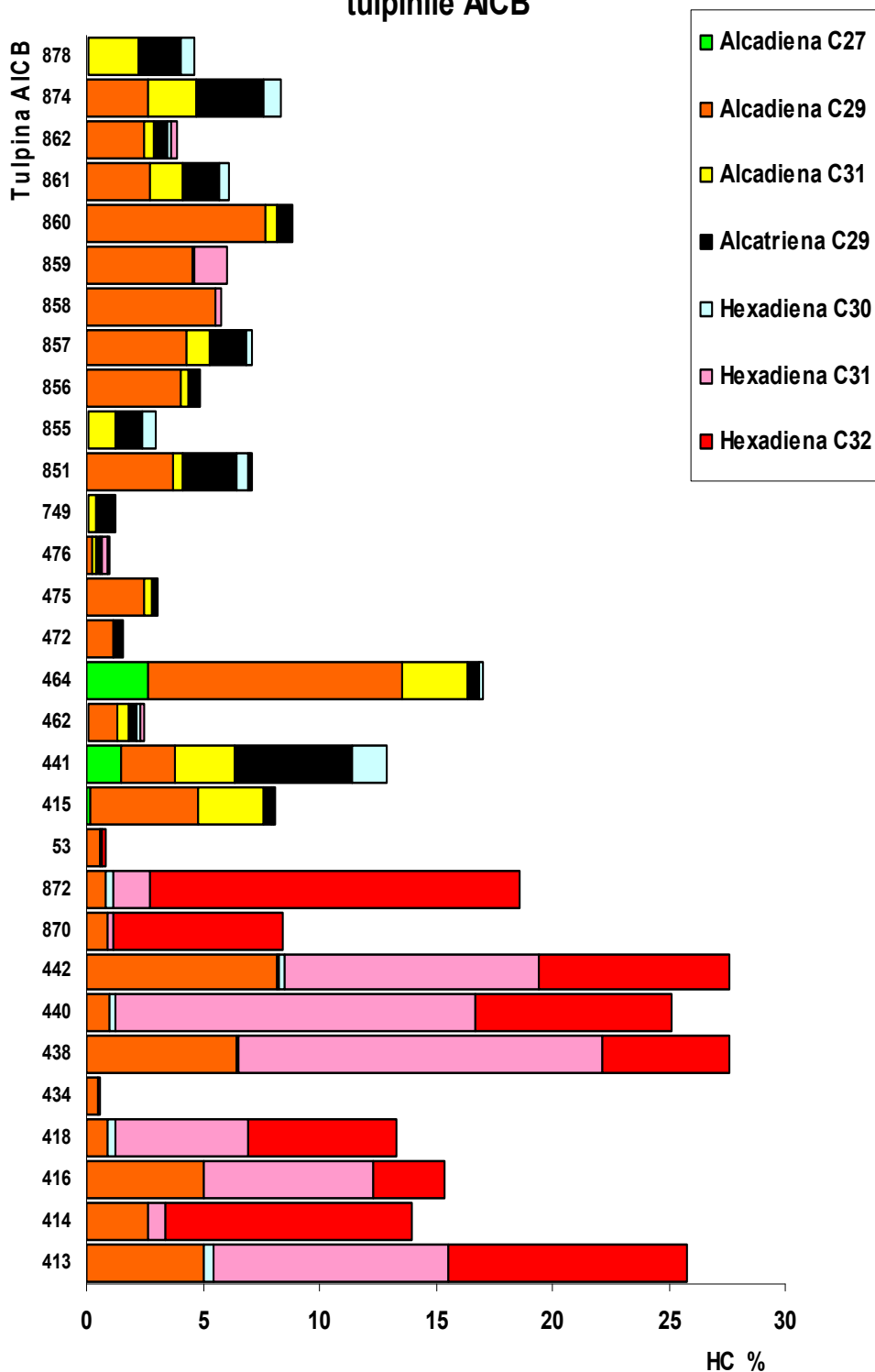


Fig. 9. Reprezentarea grafică a diferitelor tipuri de hidrocarburi sintetizate de tulpinile AICB ale algei *B. braunii*, aparținând celor două rase chimice.

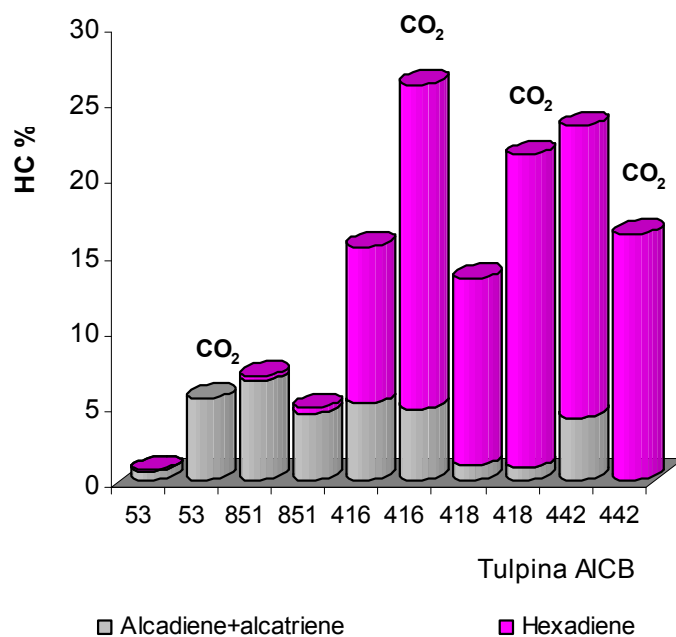


Fig. 10. Reprezentarea grafică a conținutului absolut al celor două categorii de hidrocarburi la tulpinile AICB rasa A (53, 851) și rasa B (416, 418, 442), cultivate în prezența și absența CO₂.

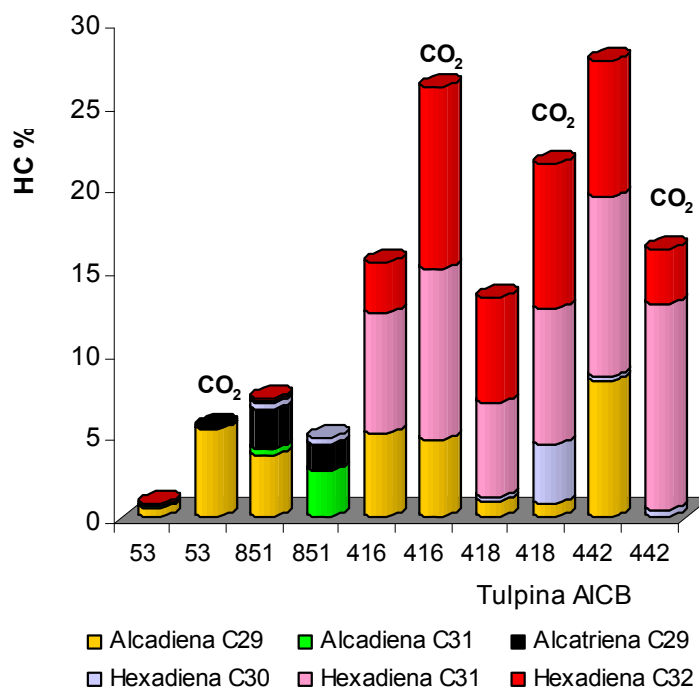


Fig. 11. Reprezentarea grafică a diferitelor tipuri de hidrocarburi la tulpinile AICB rasa A (53, 851) și rasa B (416, 418, 442), cultivate în prezența și absența CO₂.

4.4 Identificarea și cuantificarea acizilor grași la tulpinile AICB

Rezultatele obținute în cazul celor 30 de tulpini AICB analizate au evidențiat proporția majoritară a acizilor grași nesaturați (73,70%) față de acizii grași saturați (26,29%) (fig. 12).

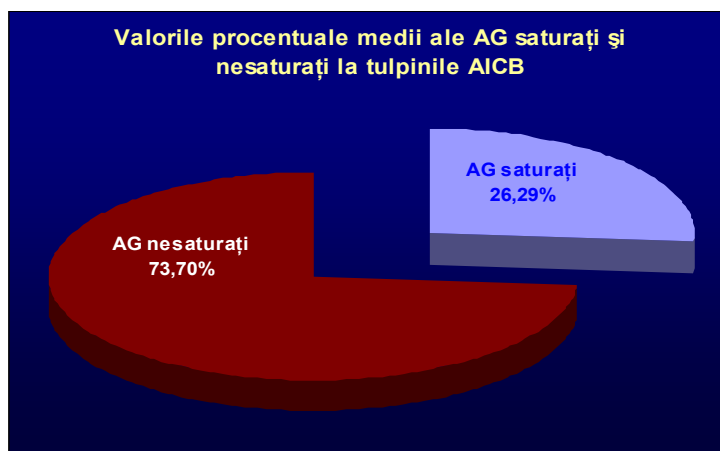


Fig. 12. Reprezentarea grafică a procentului acizilor grași (AG) saturați și nesaturați la tulpinile *B. braunii* AICB.

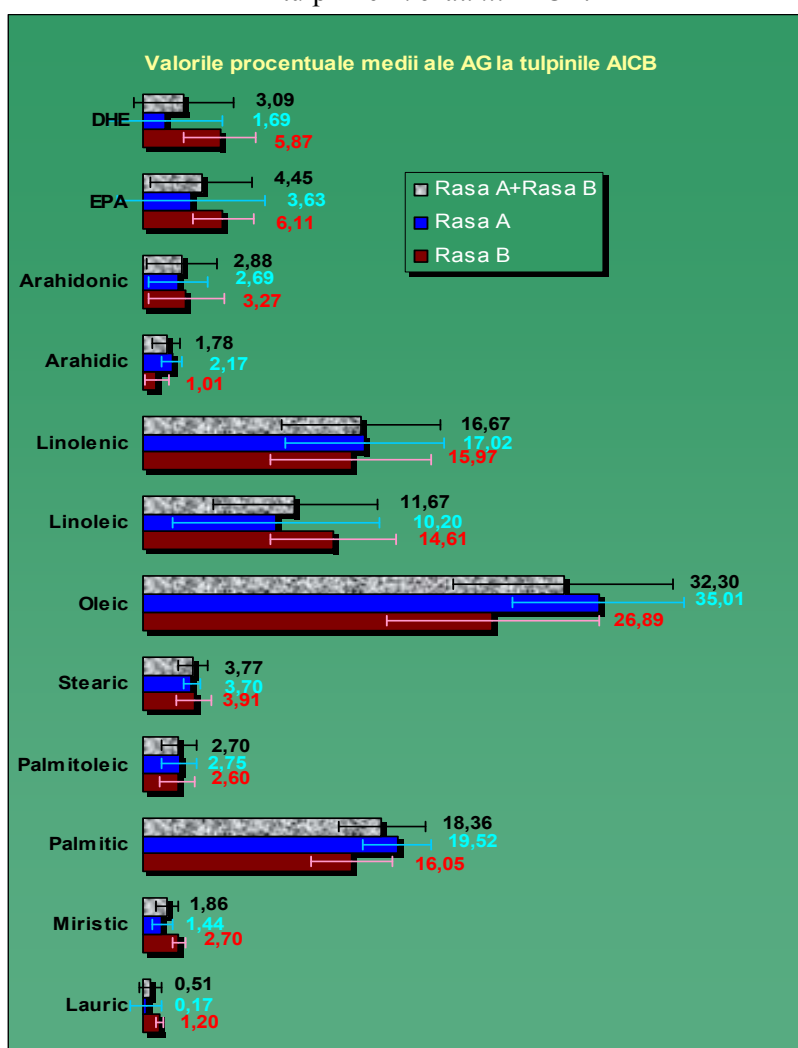
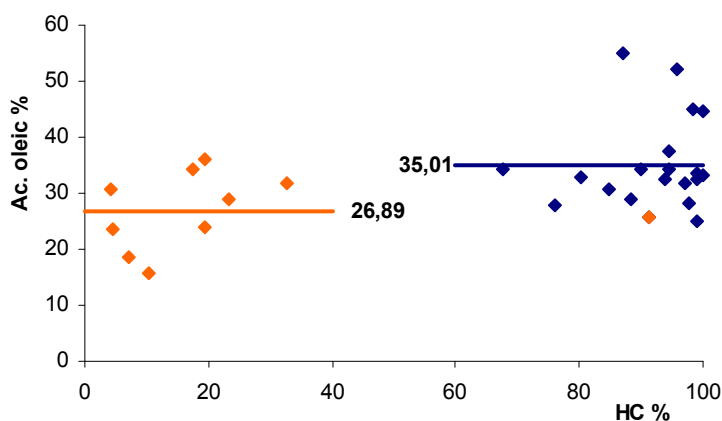
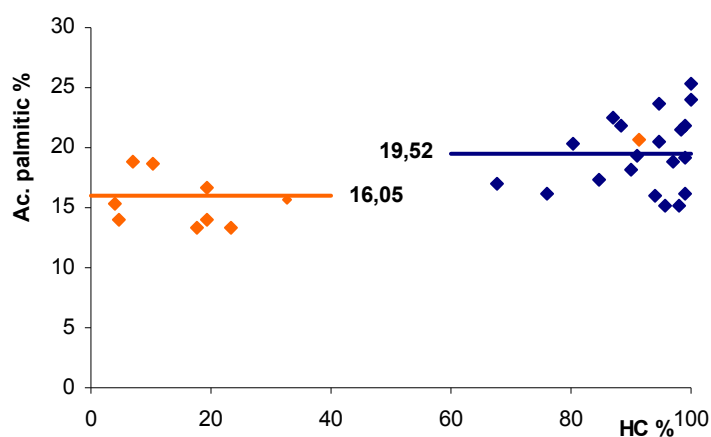


Fig. 13. Reprezentarea grafică a valorile procentuale medii ale acizilor grași (AG), calculate la toate tulpinile AICB și separat în funcție de rasa chimică (A și B).

În majoritatea extractelor lipidice au fost evidențiate 5 tipuri de acizi grași saturați (26,29%) și 7 tipuri de acizi grași nesaturați (73,7%) cu grade diferite de nesaturare. Cu excepția acizilor lauric, arahidic, arahidonic, EPA și DHE, majoritatea acizilor grași au fost prezenți în toate extractele lipidice.

Cu excepția acizilor oleic și palmitic, acizii grași au fost mai bine reprezentați la tulpinile rasei B. Preponderența acizilor palmitic și oleic la tulpinile rasei A concordă cu capacitatea acestora de a sintetiza cantități mai mari de diolefine (4,92%), față de rasa B (2,79%) (fig. 13).



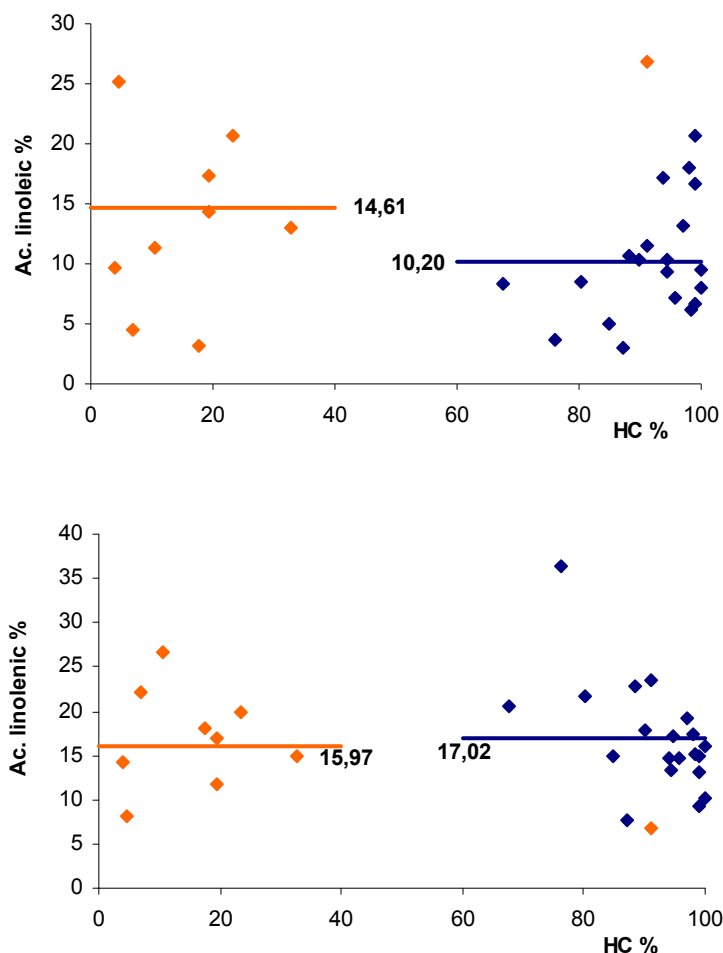


Fig. 14. Reprezentarea grafică a procentelor de HC (hidrocarburi de tipul alcadienelor și alcatrienelor) și acizilor oleic, palmitic, linoleic și linolenic la tulpinile AICB, aparținând celor două rase chimice A (albastru) și B (portocaliu). Valorile numerice reprezintă conținutul relativ de acid gras, respectiv conținutul absolut de hidrocarbură (g/100g biomasă uscată). Mediile aritmetice aferente fiecărei rase au fost evidențiate prin linii.

Acizii oleic (31%), palmitic (19%), linoleic (17%) și linolenic (12%) au reprezentat fracțiunile majoritare din totalul acizilor grași (fig. 13). Valorile mai mari ale acizilor palmitic și oleic argumentează în favoarea utilizării acestor acizi drept precursori în calea de sinteză a diolefinelor.

Tendința crescătoare a conținutului absolut și relativ al diolefinelor nu s-a corelat în mod clar cu o anumită tendință a acizilor grași majoritari în extractele lipidice, între tulpinile aceleiași rase. Acest fapt sugerează un grad ridicat de variabilitate în interiorul fiecărei rase, iar aceste corelații nu se pot efectua decât individual, pentru fiecare tulpină în parte.

Lipsa unei relații similare între datele obținute din extractele lipidice ale aceleiași tulpini s-a observat în cazul tulpinilor ambelor rase chimice. Totuși, la 11 tulpini din cele 19 analizate, s-a înregistrat o scădere a conținutului acizilor oleic și palmitic, o dată cu creșterea

conținutului absolut al hidrocarburilor (fig. 14). Cel mai probabil, sinteza acestora este coroborată cu consumul acizilor grași precursori.

Compoziția relativă a acizilor grași a variat la cele 5 tulpini cultivate în prezența și absența CO₂, cu excepția acidului stearic, indiferent de rasa chimică. Acesta a scăzut în extractele tuturor suspensiilor barbotate cu CO₂ (fig. 15, 16).

Creșterea conținutului de hidrocarburi a fost corelată cu scăderea valorilor procentuale ale acizilor oleic și palmitic. Conținutul relativ al celor patru acizi grași majoritari în extractele lipidice a crescut în biomasa culturilor barbotate cu amestec aer-CO₂, indiferent de rasa chimică sau conținutul de diolefine sintetizate.

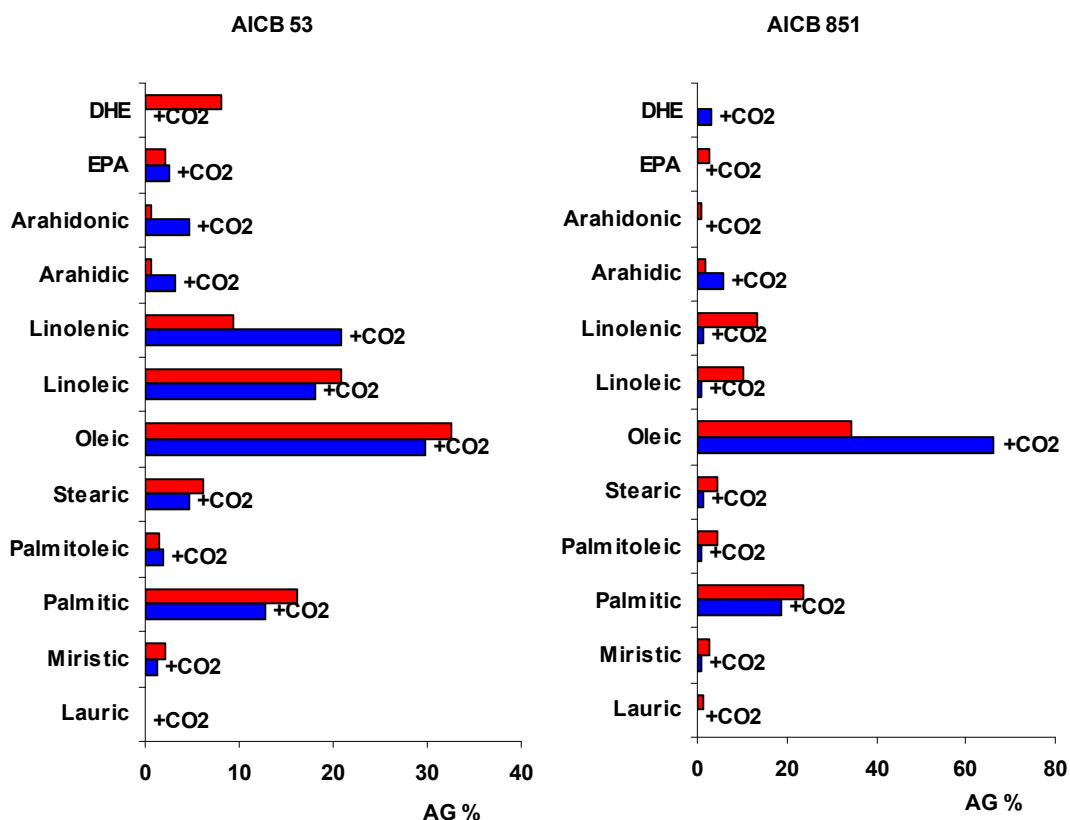


Fig. 15. Reprezentarea grafică comparativă a conținutului relativ de acizi grași, la tulpinile AICB (rasa A), cultivate în prezența/absența CO₂.

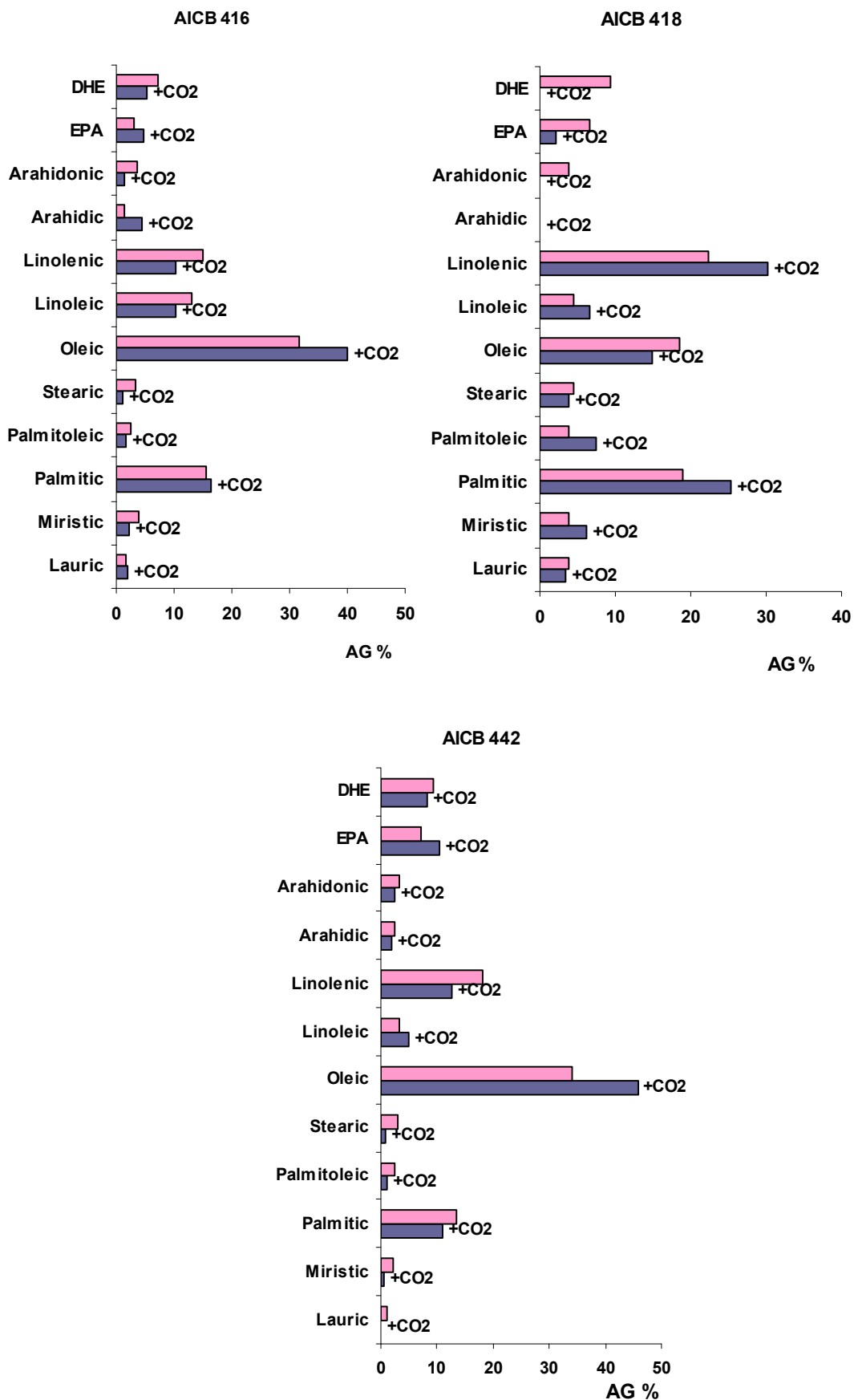


Fig. 16. Reprezentarea grafică comparativă a conținutului relativ de acizi grași, la tulpinile AICB (rasa B), cultivate în prezența/absența CO₂.

4.5 Identificarea și cuantificarea pigmentilor carotenoidici la tulpinile AICB

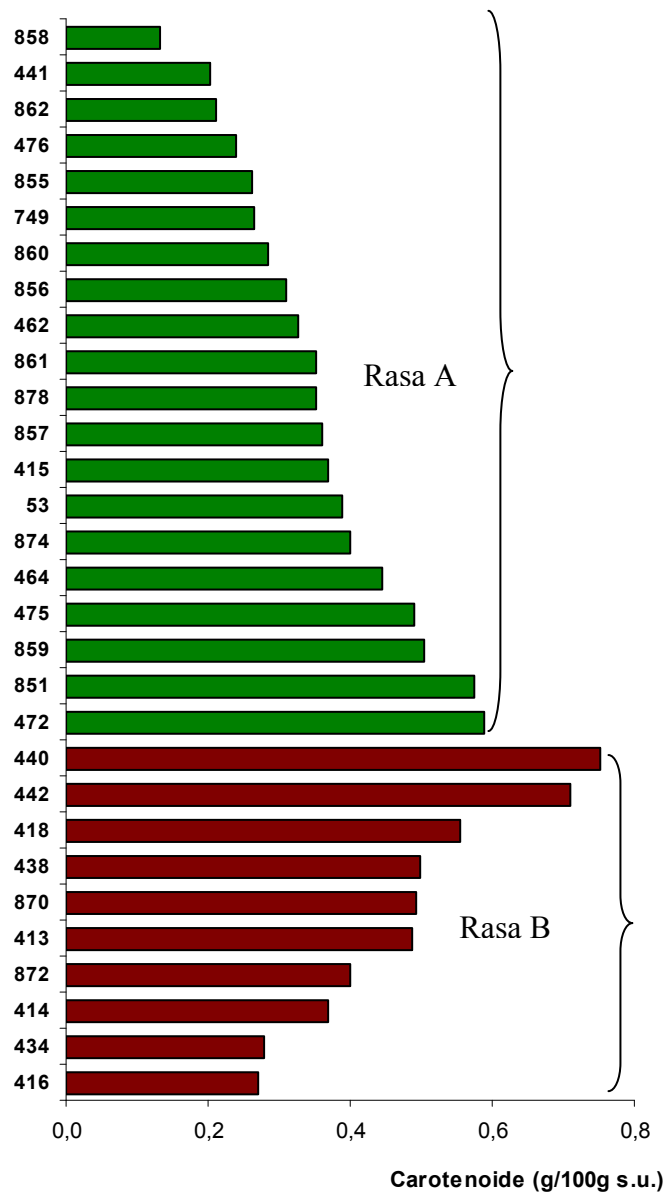


Fig. 17. Reprezentarea grafică a valorilor procentuale (g/100g biomasă uscată) obținute pentru fracțiunile carotenoidelor extrase din biomasă tulpinilor AICB aparținând raselor chimice A și B.

Algele *B. braunii* AICB au produs cantități variate de pigmenți carotenoidici în funcție de tulpină și rasa chimică (fig. 17). În general, biomasă tulpinilor AICB, din rasa B au sintetizat un procentual mai ridicat de carotenoide (0,48 g/100g biomasă uscată), față de tulpinile rasei A (0,35%). Acest fapt poate fi explicat pe baza structurii chimice de tip terpenic, comună atât carotenoidelor cât și botricocenelor, căile lor metabolice fiind interconectate (fig. 18).

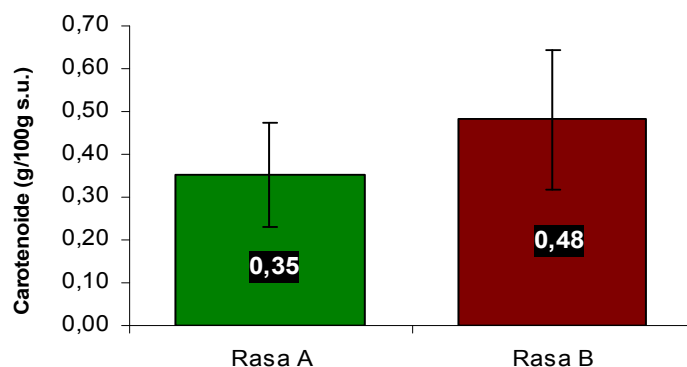


Fig. 18. Reprezentarea grafică a valorilor procentuale medii ale fracțiunilor carotenoidice ale tulpinilor AICB aparținând raselor chimice A și B ($P=0,022$).

Din punct de vedere calitativ, s-au evidențiat 13 tipuri de pigmenți carotenoidici, în extractele lipidice prelevate de la 17 tulpini AICB. Dintre aceștia, luteina a fost cel mai bine reprezentată cantitativ, iar ca frecvență, violaxantina, anteraxantina, α -carotenul, β -carotenul și luteina au fost prezente în cantități variabile în majoritatea extractelor (fig. 19).

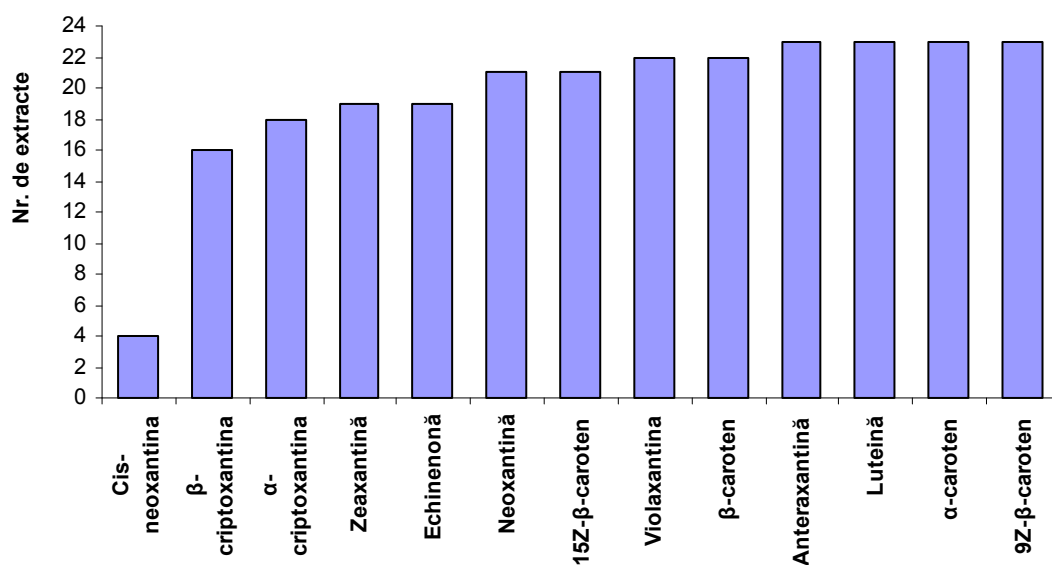


Fig. 19. Reprezentarea gradului de prezență al diferitelor tipuri de pigmenți carotenoidici în cele 23 de extracte provenite de la 17 tulpini AICB, aparținând raselor chimice A și B.

Rezultatele cantitative ale carotenoidelor obținute la tulpinile cultivate în prezența 0,02% l/min CO_2 au reliefat un aspect surprinzător. Indiferent de creșterea/scăderea concentrației de hidrocarburi produse (atât botriococcene, cât și alcadiene și alcatriene), la tulpinile cultivate în condiții de aer liftat, concentrația procentuală a carotenoidelor a scăzut, față de aceleași tulpini, cultivate în absența CO_2 (fig. 20).

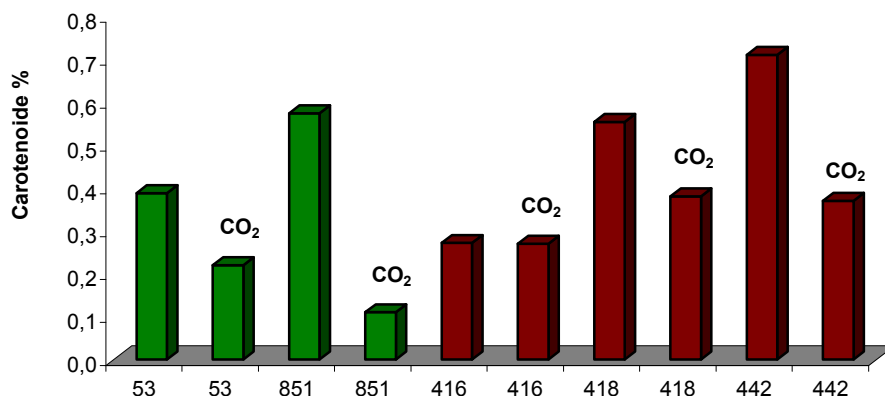


Fig. 20. Reprezentarea grafică a conținutului pigmenților carotenoidici la tulpinile AICB cultivate în prezența și absența CO₂, 0,02 l/min. Pentru diferențiere, tulpinile celor două rase chimice au fost reprezentate prin culori diferite: verde pentru rasa A și roșu pentru rasa B. Procentele sunt grame raportate la 100 grame biomasa uscată.

Tendința de creștere observată în cazul carotenoidelor s-a păstrat și pentru hidrocarburile de tip triterpenic (hexadiene) (fig. 21). În același timp, conținutul de hidrocarburi cu catenă lungă și număr impar de atomi de carbon, majoritare în cazul rasei A, au manifestat o tendință descrescătoare (fig. 22).

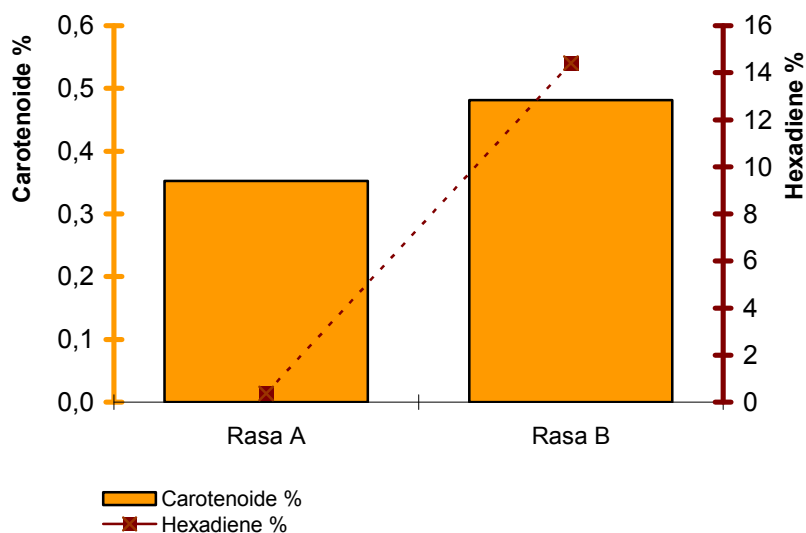


Fig. 21. Reprezentarea grafică a tendințelor de creștere pe baza valorilor procentuale medii ale fracțiunilor carotenoidice și hexadienelor identificate în extractele lipidice ale tulpinilor AICB aparținând raselor chimice A și B. Procentele sunt grame raportate la 100 grame biomasa uscată .

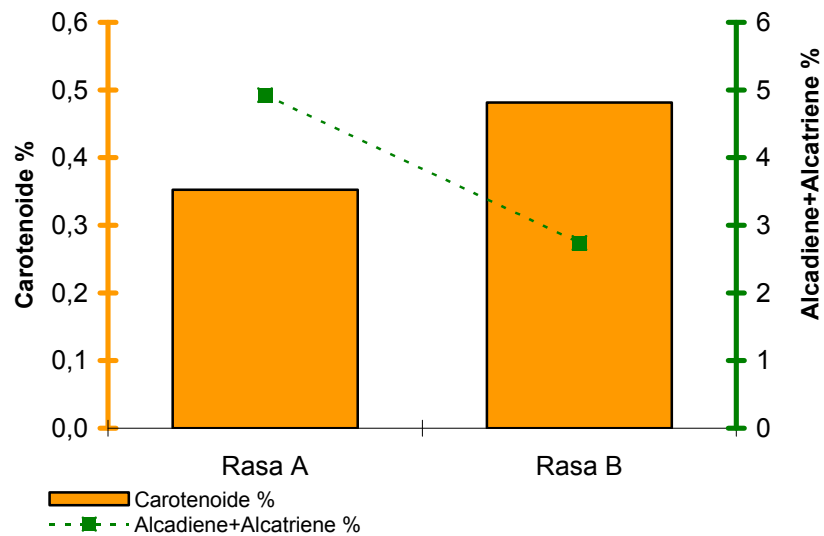


Fig. 22. Reprezentarea grafică a tendințelor de creștere pe baza valorilor procentuale medii ale fracțiunilor carotenoidice și alcadienelor, respectiv alcatrienelor, identificate în extractele lipidice ale tulpinilor AICB aparținând raselor chimice A și B. Procentele sunt grame raportate la 100 grame biomasa uscată .

4.6. Poziția filogenetică a tulpinilor AICB pe baza genelor pentru ARNr 18S

17 tulpini aparținând colecției AICB din rasele chimice A și B au fost investigate din punct de vedere al lungimii și secvenței genei pentru ARNr 18S. Dintre acestea 5 au aparținut rasei B și 12 rasei A.

Pe baza lungimii fragmentelor migrate electroforetic, tulpinile s-au departajat în două categorii. Astfel, toate tulpinile rasei B și 4 dintre tulpinile rasei A au deținut un fragment de aproximativ 2000 pb, în timp ce 8 tulpini ale rasei B au prezentat un fragment de aproximativ 2500 pb (fig. 23).

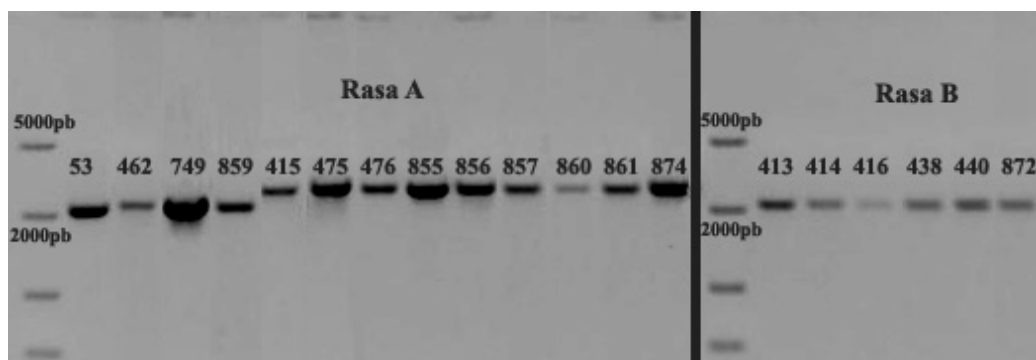


Fig. 23. Electroforegrama ampliconilor ADNr 18S, obținuți prin PCR, cu perechea de amorse CV1, ITS2B.

Alinierea multiplă a secvențelor obținute în urma secvențării, alături de alte secvențe adnotate, descărcate din bazele de date publice de nucleotide au reliefat prezența suplimentară a unei regiuni intronice la cele 12 tulpini AICB. Această regiune a însumat 457-461 pb (fig. 24). Prezența sporadică a acestei regiuni a fost semnalată și la alte alge verzi, unde a fost clasificată în categoria intronilor IC1.

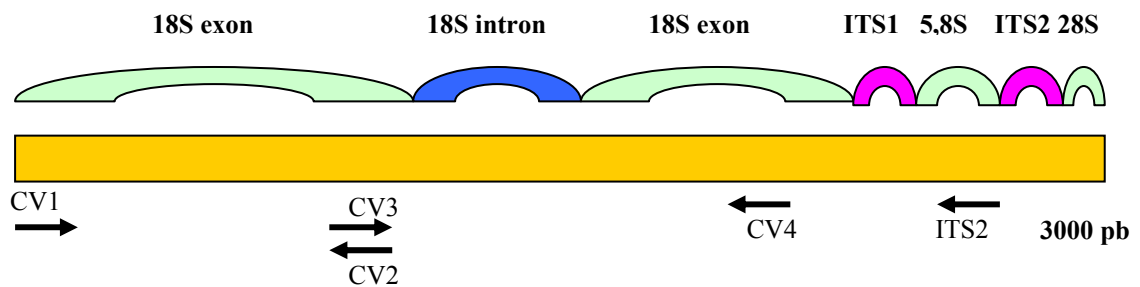


Fig. 24. Reprezentarea schematică a poziției celor 5 amorse în fragmentul genic secvențat la tulpinile AICB, precum și succesiunea genelor, exonilor și intronilor.

Indiferent de prezența/absența regiunii intronice, tulpinile aparținând rasei A se grupează distinct față de cele din rasa B (indiferent de la ce colecție de alge provin), departajare asigurată de o valoare Bootstrap semnificativă (fig. 25, 26). Acest fapt se regăsește în toți arborii generați, independent de algoritmul utilizat. Pe baza acestui considerent putem afirma faptul că separarea tulpinilor în rasele chimice A și B este susținută și la nivel molecular, pe baza marker-ului ADNr 18S.

În interiorul filogramelor obținute, tulpinile rasei A se grupează distinct, în funcție de prezența sau absența intronului, cu excepția tulpinii AICB 860. Totuși, diferențele dintre secvențele ADNr 18S constatate la tulpinile AICB ale rasei A nu se limitează numai la prezența sau absența acestei regiunii. Îndepărtarea ei din aliniere a generat arbori aproape identici. Analize ulterioare, probabil o resecvențare, în cazul tulpinii AICB 860 vor certifica presupunerea că cele două grupuri de secvențe identificate pentru rasa A corespund unor specii distincte sau cel puțin subspecii.

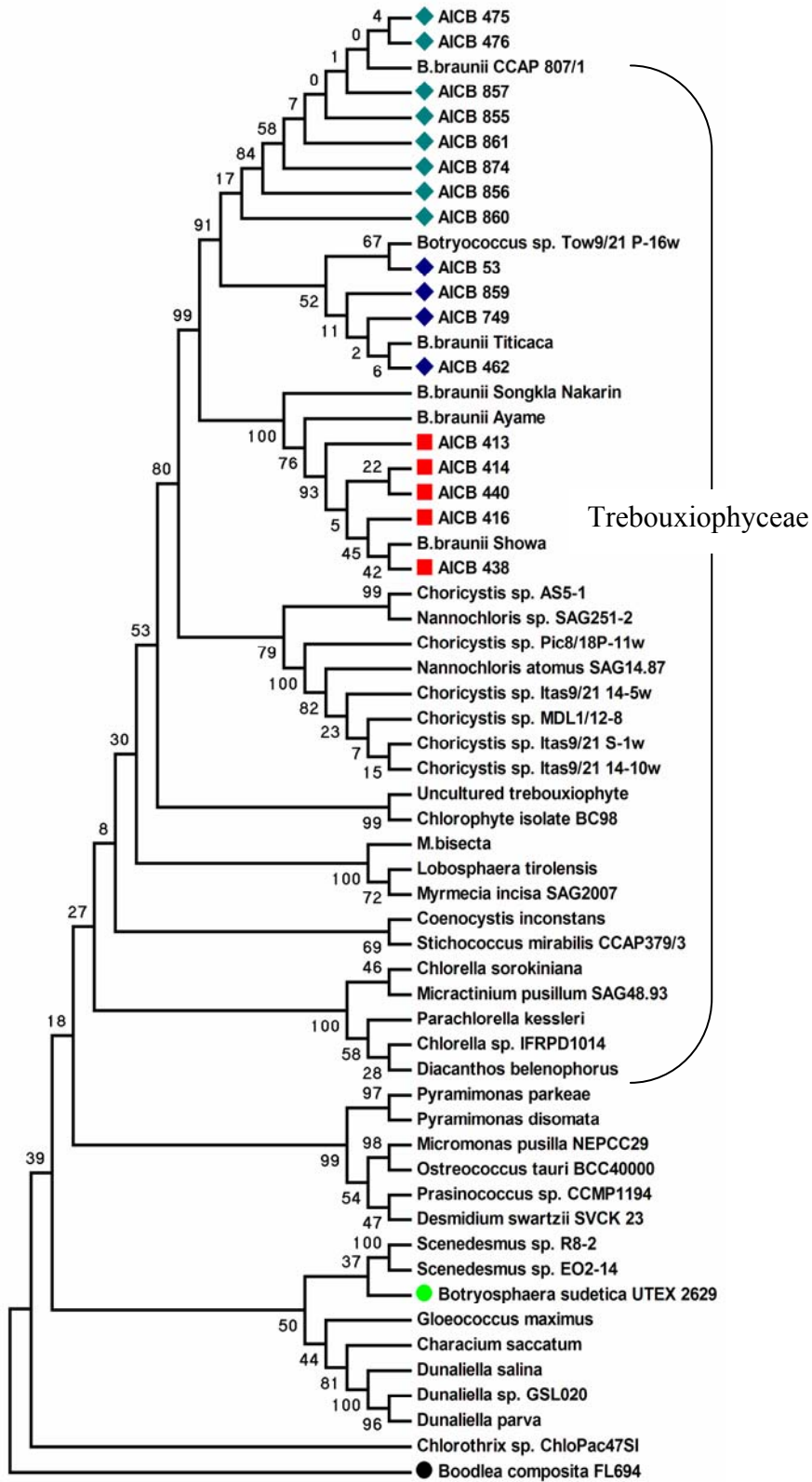


Fig. 25. Arborele filogenetic, construit pe baza secvențelor ADNr 18S provenite de la tulpinile AICB și din baza de date GenBank (NCBI), construit prin algoritmul Parcimonei Maxime (PM). Pe ramuri sunt notate valorile testului de semnificație Bootstrap, la 100 de replicare.

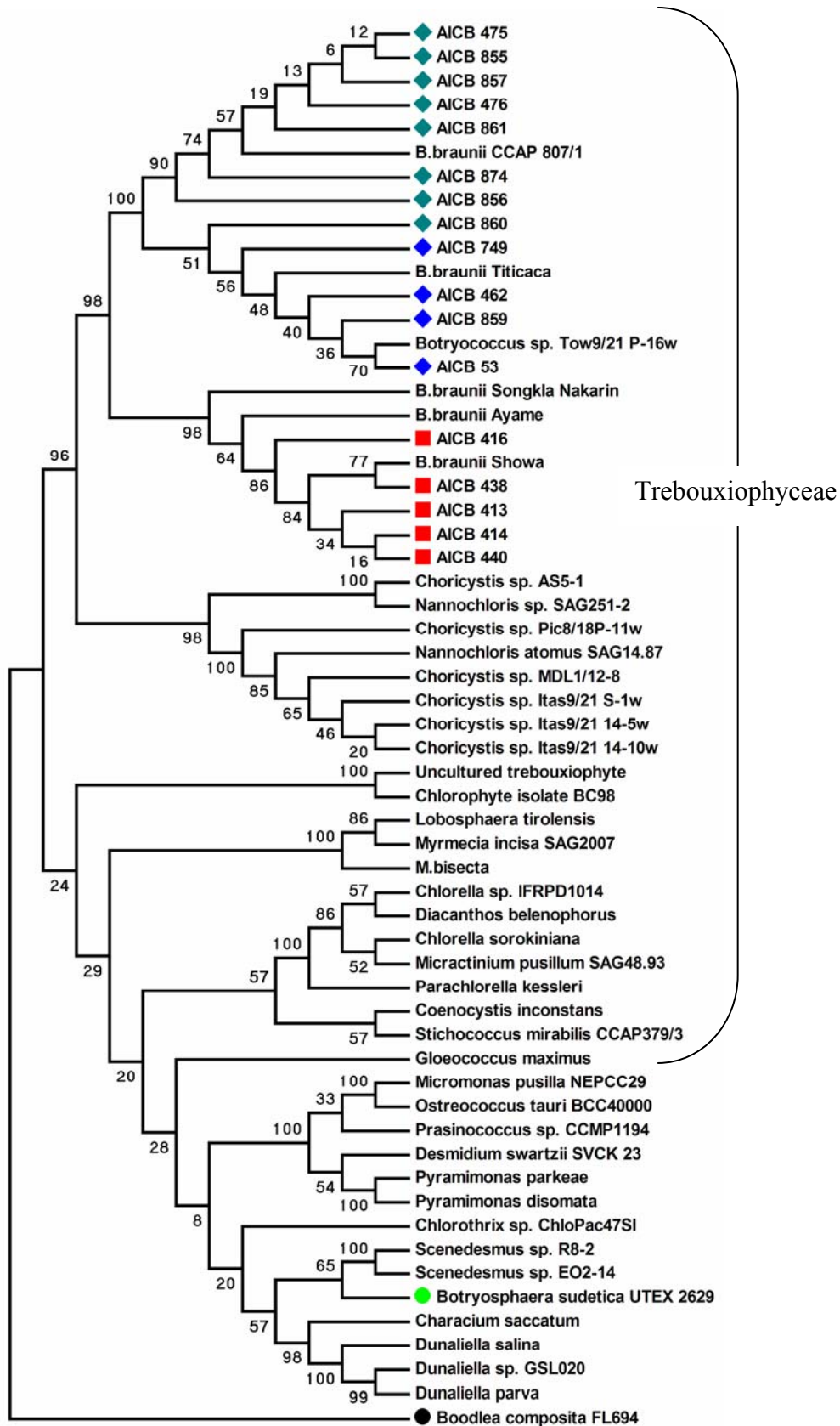


Fig. 26. Arborele filogenetic, construit pe baza secvențelor ADNr 18S provenite de la tulpinile AICB și din baza de date GenBank (NCBI), construit prin algoritmul Evoluției Minime (EM). Pe ramuri sunt notate valorile testului de semnificație Bootstrap, la 100 de replicare.

5. Concluzii finale

- ✓ Investigarea trăsăturilor morfologice la 30 de tulpini AICB a avut drept rezultat identificarea unor caractere (aspectul și consistența coloniilor, prezența/absența celulelor singulare în suspensiile celulare, gradul de dezvoltare al matricii extracelulare etc.) care oferă un suport morfologic departajării tulpinilor *B. braunii* în cele două rase chimice.
- ✓ Analizele biochimice legate de identificarea și cuantificarea hidrocarburilor, acizilor grași și carotenoidelor au evidențiat deosebiri majore pe baza cărora tulpinilor rasei A, pot fi ușor deosebite de tulpinile rasei B, înalt producătoare de hidrocarburi. La ultimele s-a observat un conținut mai mare al carotenoidelor (responsabile de culoarea brun-portocalie), hidrocarburilor și dintre acestea prezența majoritară a botriococenelor. Capacitatea tulpinilor din rasa B de a sintetiza alcadiene și alcatriene susține implicarea acestor categorii de compuși chimici în sinteza algenanului. Prezența majoritară a acizilor grași oleic și palmitic, îndeosebi în extractele provenite de la tulpinile rasei A îi fac precursorii cei mai probabili ai alcadienelor și alcatrienelor.
- ✓ Experimentele de creștere coroborate cu conținutul de hidrocarburi și acizi grași au evidențiat gradul ridicat de variabilitate al tulpinilor *B. braunii*, independent de rasa chimică. Administrarea CO₂, a determinat creșterea ratei de diviziune celulară și reducerea timpului de dublare la majoritatea tulpinilor AICB.
- ✓ În arborii filogenetici generați pe baza secvențelor ADNr 18S, tulpinile *B. braunii* au format un singur cluster în clasa Trebouxiophyceae. Departajarea tulpinilor în două grupuri distincte dovedește în premieră existența a cel puțin două specii distincte de *B. braunii*, oferind astfel un suport genetic clasificării tulpinilor în rase chimice (A și B). Prezența unei secvențe intronice în gena ADNr 18S la un număr considerabil de tulpini din rasa A care ar putea fi eventual susținută și prin markeri moleculari adiționali ar putea fundamenta și o a treia specie de *B. braunii*.
- ✓ Dintre tulpinile investigate, tulpinile AICB 416 și 418, rasa B ar putea reprezenta o premisă pentru viitoare studii în sensul dezvoltării unor biotehnologii de obținere a hidrocarburilor.

6. Bibliografie selectivă

Arnon, D. I., (1949). Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenyloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.*, 24:1-15.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (1995). Carotenoids. Volume 1A: Isolation and Analysis. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.

Goodwin, T.W. (1976). Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Vol.2. Second Ed. Acad. Press, London, New-York, San Francisco.

Hart, D. J., Scott K. J., (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK, *Food Chem.*, 54: 101-111.

Komárek, J., Marvan, P., (1992). Morphological differences in natural populations of *Botryococcus* (Chlorophyceae), *Arch. Protistenkd.*, 141: 65-100.

Komárková, J., (1991). Life cycle of *Botryococcus protuberans* W. et G. S. WEST in natural conditions, *Arch. Protistenkd.*, 139: 59-68.

Metzger, P., Casadevall, E., Coute, A., (1988). Botryococcene distribution in strains of the green alga *Botryococcus braunii*, *Phytochem.*, 27: 1383-1388.

Moldowan, J. M., Seifert, W. K., (1980). First discovery of botryococenes in petroleum, *J. S. C. Chem. Comm.*: 912-914.

Plain, N., Largeau, C., Derenne, S., Couté, A., (1993). Variabilité morphologique de *Botryococcus braunii* (Chroococcales, Chlorophyta): corrélations avec les conditions de croissance et la teneur en lipides, *J. Phycol.*, 32, 259-265.

Senousy, H. H., Beakes, G. W., Hack, E., (2004). Phylogenetic placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxiphyceae) and *Botryococcus sudeticus* (Chlorophyceae), *J. Phycol.*, 40: 412-423.

Sorokin, C., (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density, In Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements, Stein, J., R., Ed. Cambridge University, Press, 321-343.

Zalessky, M. D., (1926). Sur les nouvelles algues découvertes dans le sapropélogène du lac Beloë (hauteurs de Valdai) et sur une algue sapropélogène *B. braunii* Kützing, *Revue générale de botanique*, 38: 31-42.

Cuvinte cheie:

Botryococcus braunii, hidrocarburi, morfologie, filogenie