

UTILIZAREA MEDIULUI DE CULTURĂ DREW LA CULTIVAREA ALGEI AZOTFIXATOARE *ANABAENOPSIS* SP.

Sergiu DOBROJAN, Irina STRATULAT, Galina DOBROJAN, Tudor POPESCU, Corina NEGARA

Catedra Ecologie, Botanică și Silvicultură

The cultivation of algae *Anabaenopsis* sp. on Drew medium is efficient for maintaining in laboratory condition, can obtain a maximal biomass of $1,04 \pm 0,05$ g/l in 11-12 days. Growth phases for algae *Anabaenopsis* sp cultured on Drew medium is: one day for lag phase, one day – log phase, 7 days – exponential phase and one day stationary. The higher specific growth speed is in log phase, and for exponential is $0.010 \pm 0,004$ days⁻¹.

Introducere

La moment, se cunosc mai multe medii de cultură utilizate la cultivarea algelor. Mediile de cultivare se selectează în funcție de specificul cultivării și scopul experimentului. Pentru cultivarea algelor în scopul obținerii biomasei se utilizează mediile lichide, care permit studierea caracteristicilor fiziologice, morfologice, citologice, biochimice etc. [1]. Un rol deosebit atât în natură, cât și în viața omului au algele cianofite, care, de fapt, sunt cultivate mai frecvent în scopuri industriale și științifice. Unii reprezentanți ai încrengăturii Cyanophyta au capacitatea de a fixa azotul în sol, fapt care sporește mult interesul pentru cultivarea lor. Pentru obținerea biomasei de alge cianofite azotfixatoare se utilizează mai multe medii de cultură, cum ar fi de exemplu: Bristol; Gusev, Telitenco, Fedorov nr.1-2; Fogga; Beneche; Drew etc., care însă diferă în funcție de specia algală [2]. Din mediile sus-menționate, cel mai ieftin și ușor de preparat este mediul Drew, deoarece este compus din patru săruri care nu depășesc cantitatea de 0,2 g/l, dar care nu asigură însă obținerea biomasei algale în cantități mari. Mediul Drew este utilizat atât pentru cultivarea algelor în scopul obținerii biomasei, cât și la studierea calitativă și cantitativă a algoflorei unor soluri [3,4]. Rezultatele unor cercetări atestă că mediul de cultură Drew poate fi utilizat la cultivarea algei *Anabaenopsis* sp., însă caracteristicile fiziologice care indică creșterea biomasei lipsesc [5]. Un interes major față de cultivarea algei *Anabaenopsis* sp. se exprimă prin conținutul chimic valoros. Unele cercetări arată că tulpina algei *Anabaenopsis* sp. (Albufera), cultivate pe mediul de cultură Arnon cu adaos de 30 mM NaCl, prezintă o sursă importantă de ficobiliproteine: proteine – $52,2 \pm 2,5\%$; c-ficoeritrină – $0,8 \pm 0,1\%$; c-ficocianină – $13,0 \pm 0,9\%$; aloficocianină – $6,3 \pm 0,2\%$ [6], ceea ce sporește interesul cultivării, îndeosebi în scop farmaceutic. Alte investigații accentuează că alga *Anabaenopsis* sp. (Albufera), cultivată pe mediul de cultură Arnon cu adaos de 30 mM NaCl și de 10 mM NaHCO₃, conține cantități semnificative de pigmenți (clorofila a – 1,4%; caroten – 0,4%, c-ficoeritrină – 1,6%, c-ficocianină – 12,2% și aloficocianină – 5,4%) care reprezintă sursă de coloranți naturali, antioxidanți, vitamine etc. [7]. Cercetările menționate scot în evidență rezultatele obținute la cultivarea unei tulpini a algei *Anabaenopsis* sp. pe mediul de cultură Arnon, care însă este cu mult mai costisitor decât mediul Drew. De aceea, în prezenta lucrare ne-am propus drept scop să studiem procesul de creștere a algei *Anabaenopsis* sp. cultivate pe mediul de cultură Drew.

Material și metode

În experimente a fost antrenată tulpina algei *Anabaenopsis* sp. care se depozitează, în cultură pură, în colecția LCS „Algologie”. Alga *Anabaenopsis* sp. a fost cultivată, după metoda de cultivare periodică [8], pe mediul de cultură Drew, preparat pe baza apei distilate, cu următoarea componență (g/l): K₂HPO₄ – 0,2; MgSO₄×7H₂O – 0,2; CaCl₂ – urme; FeCl₃ – urme [9]. Mediul de cultură obținut a fost sterilizat prin metoda fizică. Cultivarea s-a efectuat în baloane Erlenmeyer cu volum de 250 ml. În calitate de inocul s-a utilizat alga *Anabaenopsis* sp. cultivată pe mediul lichid care se afla în faza exponențială de creștere, obținut conform metodologiei prezentate în [10]; densitatea culturii inoculate era de 0,4 g/l. Experiențele au demarat în condiții de laborator la temperatura de 28-30°C și la intensitatea luminii de 4000 lucși. Creșterea biomasei a fost determinată după formula: $(A_n - A_0)/n$, unde A_n – cantitatea de biomasă obținută peste n zile, A_0 – cantitatea inițială de biomasă, n – perioada analizată (zile). Productivitatea algală a fost stabilită conform procedeelelor propuse în [11]. Indicele pH-ului a fost stabilit cu ajutorul aparatului multifuncțional „Consort C944”. Calculul statistic al rezultatelor a fost efectuat utilizând programa STATISTICA-6, cu determinarea mediei aritmetice (M) și a erorii standarde (m). Experimentele au fost efectuate în 6 repetări.

Rezultate și discuții

După cum am menționat, mediul de cultură Drew are un avantaj economic în aplicare. Însă, pe lângă aceasta, considerăm că este incomplet, deoarece lipsesc multe microelemente, sursa de CO₂, Na etc., care contribuie la creșterea biomasei algale și la acumularea substanțelor biologic active în celule. Cantitatea biomasei algei *Anabaenopsis* sp. obținute la cultivarea pe mediul de cultură Drew este prezentată în Figura 1.

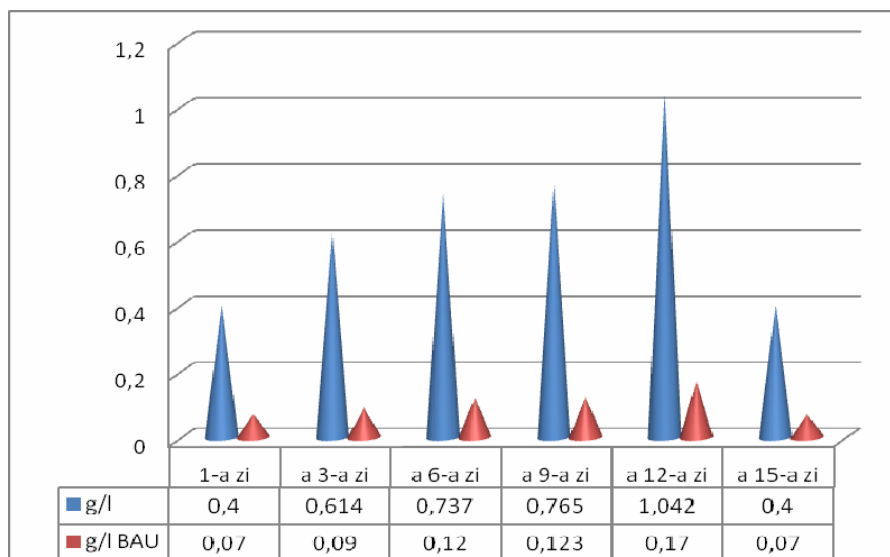


Fig.1. Productivitatea algei *Anabaenopsis* sp. cultivate pe mediul de cultură Drew.

Datele prezentate în Figura 1 atestă că biomasa algei crește până la a 12-a zi, atingând $1,042 \pm 0,05$ g/l, după care descrește până la valoarea inițială ($0,4 \pm 0,02$ g/l). Însă, această cantitate de biomasă obținută nu este suficientă și nu permite a utiliza acest mediu la cultivarea industrială a algei, dar el poate fi utilizat în formă solidă pentru menținerea algei *Anabaenopsis* sp. în colecția laboratorului.

Tabelul 1**Creșterea biomasei algei *Anabaenopsis* sp. în funcție de pH-ul și temperatura mediului de cultură**

Perioada analizată, zile	Indicii examinați		
	temperatura mediului de cultură, °C M±m	pH-ul mediului de cultură M±m	creșterea biomasei, g/l/zi M±m
1	18,00±0,11	7,167±0,018	0
3	31,30±0,32	7,39±0,052	0,071±0,003
6	32,75±0,47	7,44±0,027	0,056±0,002
9	30,70±0,30	8,04±0,01	0,040±0,002
12	29,36±0,48	7,74±0,062	0,053±0,002
15	26,67±0,23	7,76±0,089	0

Datele prezentate în Tabelul 1 denotă că temperatura mediului de cultură este în creștere: inițial, temperatura era de $18,00 \pm 0,11$ °C, la a 6-a zi, de exemplu, atingea $32,75 \pm 0,47$ °C, iar la finele experimentelor se situa între $26,67 \pm 0,23$ °C, temperatură favorabilă pentru creșterea algei *Anabaenopsis* sp. pH-ul mediului de cultură crește până la a 9-a zi ($8,04 \pm 0,01$), după care se observă o descreștere lentă. Biomasa a crescut cel mai mult de la prima la a 3-a zi, fiind egală cu $0,071 \pm 0,003$, urmată de o creștere puțin mai redusă în intervalul 3-6 zile ($0,056 \pm 0,002$), iar după a 6-a zi se observă o descreștere, astfel că la a 15-a zi se reduce până la 0 (Tab.1). Analiza raportului pH:biomasă denotă că până la a 6-a zi odată cu creșterea biomasei se mărește și pH-ul. La a 9-a zi pH-ul crește, însă valorile creșterii biomasei se reduc, după care se observă oscilări ale pH-ului, iar indicele de creștere se reduce.

Importantă în demararea cultivării periodice este și determinarea fazelor de creștere, care ar indica, conform uneia dintre metodologii, timpul și cantitatea de biomasă obținută la cultivarea continuă a algei (unde se va realiza în flux continuu al fazelor liniare și de încetinire) (Fig.2).

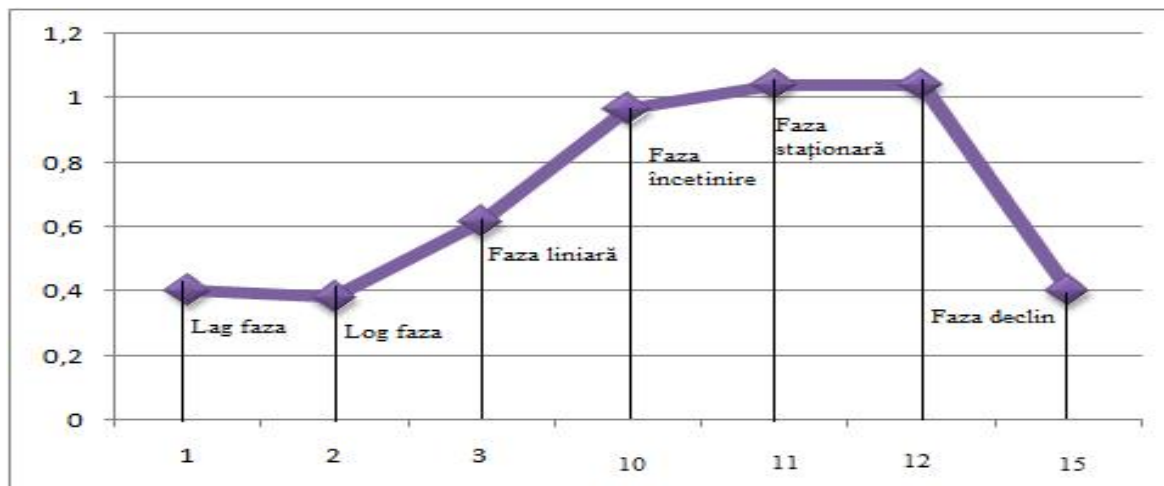


Fig.2. Fazele de creștere a algei *Anabaenopsis* sp. la cultivarea periodică pe mediul de cultură Drew.

Determinarea fazelor de creștere este destul de complicată, uneori este necesară stabilirea cantității de biomasă într-un interval de 2-24 ore sau de 24-168 ore, în funcție de faza de creștere, condițiile de temperatură, iluminare, agitare, conținutul mediului de cultură etc. La cultivarea algei *Anabaenopsis* sp. pe acest mediu durata fazelor a fost: lag – 1 zi, log – 1 zi, liniară – 7 zile, staționară – 1 zi, declin – 3 zile, datele fiind incluse în Figura 2.

Cea mai esențială caracteristică a creșterii microalgelor este viteza de creștere, care determină procesele de fotobiosinteză și depinde de viteza de sinteză a biomasei [10]. Viteza specifică de creștere diferă însă de la o fază la alta, fapt remarcat și de alți cercetători.

Tabelul 2

Caracteristica cinetică a creșterii algei *Anabaenopsis* sp. cultivate pe mediul de cultură Drew

Fazele de creștere	Cantitatea de biomasă, g/l	Productivitatea maximă, g/l ⁻¹	Viteza specifică de creștere, zile ⁻¹
Lag	0,38±0,01	-	-
Log	0,614±0,02	-	0,479±0,015
Liniară	0,965±0,03	0,050±0,002	0,010±0,004
Încetinire	1,04±0,05	0,038±0,0016	0,018±0,00085
Staționară	1,04±0,051	0	0
Declin	0,40±0,015	-0,213±0,012	-0,318±0,001

Conform metodologiei utilizate, pentru faza lag nu se indică modalitatea de determinare a vitezei specifice și a productivității maxime; aceasta se stabilește începând cu faza log. Valorile vitezei de creștere sunt cele mai înalte în cazul log fazei (0,479±0,015 zile⁻¹), deoarece se determină după un alt mod; pentru faza liniară are valori de 0,010±0,004 zile⁻¹, care sunt relativ mici, iar pentru cea de încetinire se atestă 0,018±0,00085 zile⁻¹. Același lucru este specific și pentru productivitatea maximă. În cazul fazei staționare viteza de creștere și productivitatea maximă este 0, iar în cazul fazei de declin cantitatea de biomasă se reduce substanțial, productivitatea maximă și viteza descresc (Tab.2). În urma rezultatelor obținute putem constata că există un raport direct dependent între viteza specifică de creștere și pH.

Concluzii

Alga *Anabaenopsis* sp. poate fi cultivată pe mediul Drew, însă aceasta permite obținerea a maximum 1,04±0,05 g/l în decursul a 11-12 zile, ceea ce este puțin pentru inițierea cultivării industriale, iar pentru

menținerea culturii în stare pură (pe mediul solid) este suficient. Timp de 15 zile alga cultivată pe mediul Drew parcurge toate fazele de creștere (începând de la log și terminând cu declin). pH-ul mediului este în raport direct proporțional cu viteza specifică de creștere și invers proporțional cu creșterea biomasei. Cele mai mari valori ale vitezei specifice a fazei liniare atingeau $0,010 \pm 0,004 \text{ zile}^{-1}$, ceea ce indică la faptul că creșterea algei este redusă și, respectiv, cantitatea de biomasă este mică.

Referințe:

1. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов. - Москва: Мир, 1978.
2. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: Учебное пособие. - Уфа: Изд-во БГПУ, 2008.
3. Виноградова О.Н., Михайлюк Т.И. Альгофлора пещер и гротов национального природного парка «Подольские товтры» (Украина). – În: Материалы Второй Всероссийской научно-практической конференции «Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге», 2009, с.170-173.
4. Горчакова А.Ю. Водоросли почв остепненного склона «Николаевский», г. Саранск, Республика Мордовия. - În: Биология будущего: традиции и инновации, 2010, с.46-48.
5. Trofim A., Șalaru V., Dobrojan S. Rolul algelor *Cylindrospermum licheniforme f. alatosporum* (KONDRAT) și *Anabaenopsis sp.* în procesul de epurare a apelor reziduale de la complexele zootehnice. – În: Materialele Conferinței științifice naționale cu participare internațională „Probleme actuale ale microbiologiei și biotehnologiei”, 2009, p.178-179.
6. Moreno J., Rodriguez H., Vargas M., Rivas J., Guerrero M. Nitrogen-fixing cyanobacteria as source of phycobiliprotein pigments. Composition and growth performance of ten filamentous heterocystous strains // Journal of Applied Phycology, 1995, no.7, p.17 -23.
7. Rodriguez H., Rivas J., Guerrero M., Losada M. Nitrogen-fixing Cyanobacterium with a high phycoerythrin content. - In: Applied and Environmental Microbiology, 1989, p.758-760.
8. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура // Экология моря, 2005, вып.67, с.89-97.
9. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: Учебное пособие. - Уфа: Изд-во БГПУ, 2008.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов. - Москва: Мир, 1978.
11. Сиренко А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф., Кузменко М.И., Козицкая В.Н., Величко И.М., Мыслович В.О., Гавриленко М.Я., Арендарчук В.В., Кирпенко Ю.А. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. - Киев: Наукова думка, 1975.

Notă: Lucrarea a fost elaborată în cadrul Proiectului 12.819.18.11A finanțat de către CSSDT al AȘM.

Prezentat la 24.06.2012