

CZU: 582.232: 581.1

CARACTERISTICA METODELOR UTILIZATE PENTRU OBTINEREA ÎN CULTURĂ A ALGELOR CIANOFITE

Sergiu DOBROJAN, Galina DOBROJAN

Universitatea de Stat din Moldova

În acest articol este abordată problema teoretic-aplicativă de selectare și obținere în cultură a algelor cianofite. Astfel, pentru a înțelege aceste metode se dă definiția termenului de metodă pe baza studiului literaturii de specialitate și se propun definiții originale ale termenilor de izolare și metode de cultivare a algelor. Totodată, este prezentată o nouă clasificare a metodelor utilizate pentru obținerea în cultură a algelor. Sunt descrise și exemplificate unele metode aplicate actualmente pentru obținerea în cultură a algelor cianofite.

Cuvinte-cheie: *alge, metode de cultivare, culturi algale.*

CHARACTERISTIC METHODS USED FOR OBTAINING IN CULTURE OF CYANOPHYTES ALGAE

The article addresses the theoretical-Practical problem selection and obtaining culture of cyanophytes algae. Thereby for the understanding of these methods are defined term method the basis of on the literature study and proposes original definitions the terms of isolation and methods of algae cultivation. Also, is presented a new classification the methods used to obtain the algae culture. There are described and exemplified some currently applied methods for obtaining culture of cyanophytes algae.

Keywords: *algae, cultivation methods, algal culture.*

Introducere

Algele cianofite au un rol considerabil în ecosistemele terestre și acvatice; acestea sunt cosmopolite, fiind reprezentate de un număr relativ mare de specii (actualmente sunt descrise și pașaportizate cca 2000 de specii de alge cianofite). Biomasa multor specii de alge cianofite are o valoare nutritivă înaltă, terapeutică, fiindu-i caracteristice proprietăți specifice, cum ar fi cea de fixare biologică a azotului atmosferic în sol și apă, epurarea apelor reziduale, depoluarea solurilor, acumularea substanțelor biologice active în biomasă etc. [1].

Actualmente, biomasa algelor cianofite poate fi colectată din habitatele naturale sau obținută în rezultatul cultivării în condiții deschise ori în laborator. Colectarea biomasei din habitatele naturale nu satisface cererile de biomasă, fiind și destul de periculoasă, deoarece împreună cu algele pot fi colectate și alte organisme străine, care de multe ori pot fi toxice [2].

Pentru siguranță în utilizarea biomasei algale, este necesar ca speciile de alge să fie izolate în cultură. Izolarea algelor este o etapă importantă în activitatea de cultivare și obținere a culturilor unialgale. Izolarea algelor poate fi definită ca *separarea din populațiile algale a unei specii care urmează să crească și să producă o nouă populație (grupare nouă de indivizi care vor aparține aceleiași specii) ce va asigura stabilitatea speciei, conservarea, obținerea biomasei algale etc.*

Totodată, izolarea unei specii algale este un proces îndelungat și necesită utilizarea metodelor specifice, care permit obținerea de culturi pure ușor de identificat și aplicat în practică [3,4].

Caracteristica metodelor

Metodele contemporane de selectare a algelor cianofite în culturi algale permit înlăturarea eficientă a organismelor străine, care în mod normal în natură practic nu se realizează.

Pentru a putea înțelege, distinge și aplica metodele de selectare a algelor, este necesar să definim termenul „metodă”. Astfel, conform definiției prezente în Dicționarul explicativ al limbii române, „*metoda este un mod de a acționa pentru a atinge un anumit scop, manieră, modalitate, procedeu, mijloc*” [5].

O altă definiție importantă este cea propusă de V.Rojanschi și coautorii: „*Metoda este un procedeu teoretic de realizare a unui obiectiv metodologic explicit, în anumite ipoteze specifice. Metoda se compune dintr-o familie de tehnici, prin intermediul cărora se aplică în conformitate cu natura concretă a situației. Descrierea metodei va conține toate elementele referitoare la semnificațiile tehnicilor ce o alcătuiesc, ipotezele, modul propriu de aplicare, scopul urmărit*” [6].

A.Capcelea și V.Capcelea definesc metoda ca o „totalitate de proceduri și operații de percepere practică sau teoretică a realității”. Prin operație se înțelege acțiunile simple, iar prin procedură – un sistem de operații. Deoarece procedurile și operațiile sunt determinate de cunoștințele anterioare, noțiunile de teorie și metodă sunt strâns legate între ele și trec reciproc din una în alta: metoda poate fi concepută ca o concretizare a teoriei, iar teoria poate fi înțeleasă ca o metodă. Metoda se formează ca un rezultat al cunoștințelor anterioare și, în același timp, poate fi considerată ca începutul unei cunoașteri [7].

În ce ne privește, considerăm că *metodele de selectare și obținere în cultură a algelor prezintă un mod științific, teoretic și practic de acțiuni consecutive, bine determinate, care se aplică pentru izolarea algelor în cultură.*

Rezultate obținute

Pentru o caracteristică mai amplă a metodelor de selectare și obținere în cultură a algelor cianofite, propunem repartizarea acestora în două grupe, și anume:

- 1) *metode universale;*
- 2) *metode particulare.*

Considerăm metode universale acele metode care pot fi utilizate la obținerea în cultură a tuturor algelor, iar cele particulare sunt metodele care se aplică nemijlocit pentru selectarea în cultură a unei anumite specii sau gen (specifice în funcție de poziția sistematică a speciei). În literatura de specialitate sunt menționate următoarele metode pentru izolarea algelor, care pot fi incluse în rândul metodelor universale:

1. Metoda de centrifugare și spălare – se realizează prin centrifugarea probelor urmată de spălare, procedeu ce se repetă până la obținerea culturilor algale. Cu ajutorul acestei metode se obțin, de regulă, macroculturi algale.

2. Exploatarea mișcărilor fototaxice – cu ajutorul acestei metode algele flagelate se vor mișca spre o direcție luminată și vor fi preluate cu pipeta.

3. Plăcilor de agar – se prepară agarul de 1,5%, soluția se sterilizează prin autoclavare timp de 15 min la presiunea de 150 bls și la temperatura de 120°C. Mediul lichid se introduce în vase Petri sterile, vasele se închid și se expun timp de 24 de ore pentru solidificare.

4. Micromanipularea – prevede izolarea celulelor algale dintr-o picătură de apă care conține multe specii. Celula de algă se stochează cu ajutorul unei micropipete și se expune într-o picătură de mediu steril, după care se repartizează pe suprafața agarului. Acest proces se repetă până ce celula se „spală” și se obține o cultură fără bacterii. Cu cât mai multe repetări ale operațiunilor, cu atât mai puține bacterii rămân în cultură. Însă, odată cu majorarea numărului de spălări celulele riscă să se deterioreze. Apoi celulele se transferă în mediu nutritiv diluat în vas cu mediu lichid sau în mediu solid. Cultura este plasată la iluminare scăzută și la nivelul coresponzător de temperatură constantă. După 3-4 săptămâni de creștere algele se supun microscopierii. Cu ajutorul acestei metode putem obține o cultură colonială unialgală.

5. Diluția în serii – tuburile în care se produce diluția trebuie etichetate în limitele 10^{-1} - 10^{-10} . Astfel, 1 ml de probă se adaugă în vasul cu prima diluție de 10^{-1} și se agită bine. Din tubul dat se exclude 1 ml și se adaugă în vasul cu diluția de 10^{-2} ; se agită bine. Această procedură se repetă până la varianta cu 10^{-10} . Tuburile sunt incubate în condiții de temperatură și iluminare controlată. După 2-4 săptămâni din culturi se extrage o porțiune mică de aseptice din fiecare tub de diluții. O singură specie se poate găsi în tuburile cu diluție mai mare, de exemplu 10^{-6} - 10^{-10} . Dacă tuburile conțin două sau trei specii diferite, atunci pot fi izolate specii în monocultură utilizând tehnica de manipulare [8,9].

În grupa metodelor universale se mai includ și alte metode care sunt compuse din combinația unor elemente ale metodelor sus-menționate. Dintre acestea menționăm: 1. *Metoda de selectare a culturilor algologice;* 2. *Metoda de inoculare a algelor în interiorul agarului;* 3. *Metoda de obținere a monoculturilor din culturi brute dense.*

1. Metoda de selectare a culturilor algologice a fost elaborată de В.М. Андреева și Л.А. Стрекова, fiind considerată mai simplă pentru obținerea monoculturilor, pentru selectarea celulelor și coloniilor algale de orice dimensiune și accesibilă. Potrivit acestei metode, în vasul Petri se introduce mediul nutritiv agarizat (1,6-1,8% agar), la suprafața mediului solid se introduc 0,2-0,3 ml de apă distilată sterilizată (în funcție de mărimea ceștii Petri) ce se distribuie cu ajutorul spatulei sterile. Trebuie ca în timp de 1,5-2 zile apa să se îmbibe în mediul nutritiv. După administrarea apei în vasele Petri se adaugă o cantitate redusă de suspensie algală, ceașca se închide și se expune la lumină. Peste ceva timp (de regulă, 2-3 săptămâni) la suprafața agarului încep să apară

colonii de alge. Printre ele pot fi găsite (de regulă, la marginile vasului) colonii cu o singură specie. Dacă vom analiza în interval variat diferite colonii, care se deosebesc și după culoare, pe care le inoculăm pe mediu nutritiv proaspăt, atunci putem obține monoculturi aproape la toate speciile de alge prezente în mediul agarizat. După cum se cunoaște, în culturile acumulative cu vârsta se produce îmbătrânirea și modificarea culturilor algale. La apariția noilor forme trebuie repetată procedura de selectare a monoculturilor [10].

2. Metoda de inoculare a algelor în interiorul agarului – unele alge nu pot să se dezvolte la suprafața agarului, ci în interior. Pentru aceasta a fost elaborată, apoi modificată, metoda de selectare a algelor în monocultură din interiorul agarului. Metoda constă în parcurgerea unor etape distincte. Inoculul algelor colectate din câmp se agită cu agarul lichid (încălzit) și se toarnă în vasul Petri. Agarul se răcește la o temperatură puțin mai înaltă decât cea din cultivator. Vasele cu inocul și mediu agarizat se incubează la temperatură stabilită și iluminare continuă în cultivator. După creștere algele pot fi selectate în monocultură cu ajutorul micropipetei. De regulă, se utilizează micropipeta Pasteur sau capilarul de sticlă. Pipeta Pasteur se sterilizează la foc (lampa de spirt) fiind ținută cu ajutorul pensetei. Pipeta trebuie ușor sucită deasupra flăcării pentru a o putea întinde și rupe vârful, obținând parcă o ață subțire. Vârful tubului obținut permite captarea algelor din interiorul agarului. Această metodă se aplică atât pentru selectarea algelor în monocultură, cât și pentru menținerea îndelungată a culturii în laborator [11].

3. Metoda de obținere a monoculturilor din culturi brute dense – această metodă are ca scop obținerea monoculturilor algale la utilizarea atât a mediilor solide, cât și a celor lichide. Ea poate fi utilizată, în special, pentru obținerea culturilor algologice pure de alge edafice sau aerofile. Probele de alge colectate din natură (în cazul când algele formează cruste „înflorirea solului”) se expun în apa distilată sterilizată. O porțiune mică se microscopiază și se determină, în funcție de parametrii morfologici, care alge predomină. După care selectăm specia ce ne interesează. Probele se spală bine (de 4–5 ori cu apă distilată) pentru înlăturarea primară a particulelor solide și a altor alge, dar și a bacteriilor alipite crustei. Apoi algele sunt expuse din nou în apă distilată, fiind supuse procedurii de centrifugare pentru separarea secundară de unele bacterii și nevertebrate. După centrifugare probele se utilizează pentru inoculare. Inocularea în vasul Petri pe mediu agarizat sterilizat (cu concentrația de 1,5%) se va efectua astfel: 1. Coloniile în formă de crustă se vor dispersa cu ajutorul pensetei sterile în bucăți mai mici (cu lungimea de 0,1-0,25 cm și lățimea de 0,05-0,07 cm) și mai mari (cu lungimea de 0,05-0,07 cm și lățimea de 0,02-0,03 cm). 2. Bucățile mai mari se aranjează în formă de cerc la suprafața mediului agarizat la distanța de 1 cm de marginea ceșcuței (distanța dintre bucățile mari de alge fiind de 2 ori mai mare decât lungimea lor) formând prima circumferință, iar bucățile mici se aranjează la fel în formă de cerc la suprafața mediului agarizat (distanța dintre bucățile mici fiind de două ori mai mare decât lungimea lor) formând a doua circumferință. 3. În mijlocul celei de a doua circumferințe se expune o porțiune mică de crustă. Probele inoculate se expun în cultivator la iluminare continuă și la temperatura necesară.

Inocularea probelor pe mediu lichid sterilizat se efectuează în baloane Erlenmayer cu volum de 100 ml, volumul mediului lichid fiind de 50 ml. Se administrează 40 mg de inocul pregătit, probele se agită puțin și se expun la iluminare continuă și la temperatura necesară. După ce se obține o creștere masivă a biomasei, probele se microscopiază, se selectează specia predominantă și se expune din nou pe mediu nutritiv. Etapele se repetă până la obținerea unei culturi monoalgale. Aplicarea metodei permite obținerea monoculturilor algale într-un interval de timp mai scurt decât prin aplicarea celorlalte metode [12].

Din grupa metodelor particulare face parte metoda descrisă de P.Rout Nutan, S.Khandual, A.Gutierrez-Mora și coautorii [13]. Această metodă se utilizează pentru obținerea în cultură a speciilor din genul *Spirulina*. Metoda prevede parcurgerea a cinci etape, după cum urmează: 1. *Centrifugarea* – la viteza de rotație de 800-2000 rpm în mai multe repetări pentru înlăturarea particulelor solide și a substanțelor contaminate; 2. *Tratarea chimică* – pentru eliminarea algelor eucariote și a culturilor mixte de alge, realizată prin adăugarea *Cycloheximidei* în concentrații variate (25-100 mg/l) timp de o săptămână. 3. *Diluția în serii* – efectuându-se diluția de zece ori în zece serii; 4. *Micromanipularea* – filamentele algale se selectează cu ajutorul unei micropipete de sticlă, probele selectate fiind examinate la microscop pentru a asigura înlăturarea celorlalte organisme; 5. *Inocularea pe mediu solid* – s-a realizat inocularea algelor, cu ajutorul unei anse, pe mediul nutritiv solid (cu agar de 1,5%) și expunerea în condiții normale de laborator timp de 3-4 săptămâni. Cu ajutorul acestei tehnici au fost izolate speciile *Spirulina subsalsa* și *Spirulina major*.

Concluzii

Prezenta cercetare vine să completeze domeniul teoretico-aplicativ ce abordează problema privind cultivarea algelor cianofite. În rezultatul cercetărilor realizate se propune o nouă definiție a metodelor de selectare a algelor, precum și o clasificare originală. Astfel, metodele de selectare și obținere în cultură a algelor se clasifică în *metode universale și metode particulare*. Din grupa metodelor universale sunt descrise metodele: *centrifugarea și spălarea, exploatarea mișcărilor fototaxice, plăcilor de agar, micromanipularea, diluția în serii, selectarea culturilor algologice, inocularea algelor în interiorul agarului, obținerea monoculturilor din culturi brute dense*. Din metodele particulare este menționată *metoda combinată* utilizată pentru izolarea speciilor de alge cianofite din genul *Spirulina*.

Referințe:

1. ȘALARU, V., BULIMAGA, V., ȘALARU, V., TROFIM, A., ZOSIM, L., PISOV, M. Rolul unor alge cianofite azotfixatoare în rezolvarea problemei alimentare. În: *Studia Universitatis Moldaviae*, 2013, nr.6(66), p.33-41, ISSN 1814-3237
2. ROUT NUTAN, P., KHANDUAL, S., GUTIERREZ-MORA, A., GALLARDO-VALDÉZ, J., RODRIGUEZ-GARAY, B., IBARRA-MONTOYA, J.L., VEGA-VALERO, G. Isolation, Identification and Germplasm Preservation of Different Native Spirulina Species from Western Mexico. In: *American Journal of Plant Sciences*, 2013, no.4, p.65-71.
3. HAZEL, M., DAVEY and DOUGLAS, KELL, B. Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses. In: *Microbiological review*, vol.60, no.4, p.641-696. ISBN: 0146-0749/96
4. VAN THANG, D., YAN, L., NOWAK, E., SCHENK, P.M. Microalgae Isolation and Selection for prospective biodiesel production. In: *Energies*, 2012, no.5, p.1835-1849. ISSN 1996-1073
5. <http://www.dex.ro/metod%C4%83> [Accesat: 10.11.2016]
6. ROJANSCHI, V., BRAN, F., GRIGORE, F., DIACONU, S. *Evaluarea impactului ecologic și auditul de mediu*. București: ASE, 2004, p.492.
7. CAPCELEA, A., CAPCELEA, V. *Managementul ecologic, fundamentarea teoretică și evoluția paradigmelor*. Chișinău: Știința, 2013, p.197.
8. PERUMAL PACHIAPPAN, B. BALAJI, P., SANTHANAM PERUMAL, S. ANANTH, A. SHENBAGA DEVI, S., DINESH, K., JEYANTHI, S. Isolation and Culture of Microalgae. In: *Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture*, 2000, p.166-182. DOI 10.1007/978-81-322-2271-2_1
9. THOMPSON, P.A. Algal cell culture. In: *Biotechnology*, 2002, vol.1, p.110-111.
10. АНДРЕЕВА, В.М., СТРЕКОВА, Л.А. Коллекция культур водорослей в лаборатории алгологии Ботанического института им. В.Л. Коморова АЕ СССР. В: *Культивирование коллекционных штаммов водорослей*. Ленинград, 1983, с.92-104.
11. ГАЙСИНА, Л.А., ФАЗЛУТДИНОВА, А.И., КАБИРОВ, П.Р. *Современные методы выделения и культивирования водорослей: Учебное пособие*. Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. 152 с.
12. DOBROJAN, S., ȘALARU, V., ȘALARU, V., MELNIC, V., DOBROJAN, G. *Cultivarea algelor*. Chișinău: CEP USM, 2016, p.173.
13. ROUT NUTAN, P., KHANDUAL, S., GUTIERREZ-MORA, A., GALLARDO-VALDÉZ, J., RODRIGUEZ-GARAY, B., IBARRA-MONTOYA, J.L., VEGA-VALERO, G. Isolation, Identification and Germplasm Preservation of Different Native Spirulina Species from Western Mexico. In: *American Journal of Plant Sciences*, 2013, no.4, p.65-71.

Prezentat la 21.10.2016