

(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00676

(22) Data de depozit: 11/11/2021

(41) Data publicării cererii:
30/05/2023 BOPI nr. 5/2023

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE MARINĂ GRIGORE ANTIPA
CONSTANȚA, BD. MAMAIA NR. 300,
CONSTANȚA, CT, RO

(72) Inventatori:
• MARIN OANA ALINA,
ALEEA SOLIDARITĂȚII, NR. 15, BL. IV9,
SC.B, ET.3, AP.17, CONSTANȚA, CT, RO;

• TIMOFTE FLORIN,
ALEEA MĂRȚIȘORULUI, NR.16, BL.FC1,
SC.B, AP.23, CONSTANȚA, CT, RO;
• STOICA ELENA, STR.LUNCA, NR. 51,
GIURGENI, IL, RO;
• COATU VALENTINA,
STR.LUCIAN BLAGA, NR.3, CONSTANȚA,
CT, RO;
• LAZĂR LUMINIȚA, STR.MILANO, NR.12,
CONSTANȚA, CT, RO;
• HARCOTĂ GEORGE EMANUEL,
STR. OMURCEA, NR.2C, VALU LUI
TRAIAN, CT, RO

(54) SISTEM DE INSTALAȚIE ȘI PROCEDU DE OBȚINERE
A ALGEI BRUNE *CYSTOSEIRA BARBATA*

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o instalație și la un procedeu de cultivare a algei brune *Cystoseira barbata*, în scopul folosirii acesteia ca material algal pentru extragerea de compuși utilizabili în diverse domenii ale industriei alimentare, farmaceutice sau medicale. Instalația conform invenției este constituită din 8 acvarii, un sistem de furtunuri pentru circuitul apei între acvarii și sistemul de răcire, un sistem de răcire al apei model Hailea HC 500A, o pompă de recirculare a apei model EHEIM, un sterilizator UV și o pompă de aerare a apei din acvarii care conțin fiecare câte o piatră de difuzie cu dimensiunea de 1...2 mm, care asigură realizarea unui flux de bule de aer. Procedeu conform invenției poate avea loc în absența sau în prezența mediului nutritiv și constă în prelevarea a 3 cm din porțiunea apicală a talului de la 4...5 exemplare mature, depozitarea la întuneric în pungi de plastic fără apă de mare, la rece la temperaturi de max. 4°C, timp de 24 ore, curățarea lor cu o perie foarte fină și clătirea cu apă de mare sterilă, așezarea materialului biologic fertil în acvarii pe plase cu ochiul de 1,5 cm și pe substrat dur artificial format dintr-un amestec de granit și șist, urmată de aerarea acvariiilor, răcirea apei, reglarea oxigenului între 7,98...9,16 mg/L, cu pH - ul cuprins între 7,82...7,96 și salinitatea între 15,85...16,86 PSU, aplicarea periodică a tratamentelor cu GeO₂ prin adaos de 250 mg GeO₂ la 1 L de apă deionizată, din care se utilizează la nevoie 1 mL/1L apă de mare, având ca mediu nutritiv mixtură de apă de mare filtrată, sterilizată la autoclavă la o temperatură de

121°C timp de 40 minute și ulterior răcită, și un amestec de săruri: NaNO₃ (39...46 mg/1L apă de mare), Na₂HPO₄ x 12H₂O(8,5...12,3 mg/1L apă de mare), FeSO₄ x 7 H₂O(260...284 μg/1L apă de mare), MnCl₂ x 4H₂O(18,5...21,4 μm/1L apă de mare), Na₂EDTA x 2 H₂O(2,3...4,58 mg/1L apă de mare) și vitamine: Tiamină, Biotină și B₁₂.

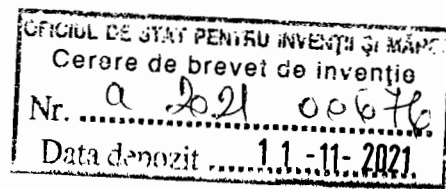
Revendicări: 3
Figuri: 3



Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





SISTEM DE INSTALAȚIE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

A ALGEI BRUNE *Cystoseira barbata*

Prezenta invenție se referă la o instalație și procedeu de obținere a algei brune perene *Cystoseira barbata* în condiții controlate, care poate fi folosită ca material algal pentru necesitățile viitoare de relocare ale speciei în mediul natural cu scopul dezvoltării acesteia și care poate fi utilizată în extracția de compuși cu potențial valorificabil în diverse domenii ale industriei alimentare, farmaceutice, medicale. ș.a., independent de biodisponibilitatea din mediul natural.

Există un interes deosebit la nivel mondial pentru speciile ordinului Fucales, iar particular, la nivel european, pentru speciile de *Cystoseira*, ce aparțin acestui ordin. Această specie de algă se întâlnește în zona litoralului românesc, interesul este cu atât mai mare cu cât, în condițiile actuale de mediu, *C. barbata* este singurul reprezentant al ordinului Fucales. Specia înrudită, *C. crinita*, nu mai constituie în condițiile actuale o prezență la țărmul românesc, ultima raportare a acestei specii datând din anii '80 (Vasilu, 1984).

Cele două specii de *Cystoseira* au înregistrat un declin la țărmul românesc de-a lungul deceniilor, ca o consecință a acțiunii cumulative a factorilor naturali nefavorabili: înghețul mării din iernile extreme 1971/1971, 1984/1985, furtunile puternice și acțiunilor antropice din zona costieră, care au determinat o creștere a turbidității, cu consecințe asupra proceselor fiziologice ale speciilor de *Cystoseira* (Vasilu & Muller, 1973). Interesul comunității științifice pentru speciile de *Cystoseira*, derivă din importanța ecologică și economică a acestora.

C. barbata prezintă o valoare ecologică inestimabilă, fiind considerată o specie cheie pentru mediul marin, capabilă să modeleze structura comunităților bentale asociate și constituind habitat pentru pești și vaste comunități zoobentale. *C. barbata* este inclusă pe actuala Listă Roșie a speciilor marine periclitare, conform Ordinului 488/2020, privind aprobarea Listei speciilor marine periclitare de la litoralul românesc al Mării Negre în vederea protejării și conservării lor, publicat în M.Of.300 din 9 aprilie 2020, fiind considerată a fi Critic Amenințată, conform criteriilor IUCN. La litoralul românesc prezintă o distribuție fragmentată, cu localizare doar către sudul litoralului românesc: zona Saturn, Mangalia, 2 Mai și Vama Veche, fiind deosebit de sensibilă la consecințele activităților antropice din zona costieră. Datorită reducerii drastice a arealului de distribuție, exploatarea resurselor naturale în diverse scopuri, nu este în prezent recomandată. Atenționarea a fost făcută încă din anii '70 (Bavaru, 1977), iar situația ecologică actuală a algei brune *C. barbata*



confirmă și susține cu desăvârșire acest fapt. Declinul speciei a afectat și serviciile ecosistemice oferite, singura posibilitate de a limita acest fenomen fiind în momentul de față operațiunile de relocare ale speciei. Refacerea naturală a populațiilor de *C. barbata* la litoralul românesc este, în condițiile actuale de mediu, un proces extrem de lent, imposibil de atins în unele zone cu activități antropice din ce în ce mai intense în zona costieră. Operațiunile de relocare ar presupune în primă instanță translocarea de indivizi maturi din zone donor cu populații naturale, către alte zone. Cu toate acestea, având în vedere starea de conservare critică a populațiilor de *Cystoseira* și disponibilitatea redusă a materialului biologic, sunt necesare tehnici mai puțin invazive, culturile în mediu controlat fiind un răspuns în acest sens. În prezent, există abordări la nivel european care propun realizarea de culturi macroalgale în laborator, în scopul relocării speciei în zone unde aceasta a dispărut sau se află în declin (Verdura *et al.*, 2018; Falace *et al.*, 2018).

Valoare ecologică a speciei este potențată de importanța sa economică, *C. barbata* fiind o sursă importantă de diverși compuși, dintre cei mai importanți amintim fucoxantina și alginatii. Literatura de specialitate a arătat că *C. barbata* prezintă un conținut ridicat de fucoxantină, cea mai mare concentrație regăsindu-se la nivelul ramificațiilor tinere de 2 – 3 luni. În prezent, există pe piața autohtonă un număr relativ scăzut de preparate care înglobează acest compus, cu rol în controlul greutateii corporale și a metabolismului lipidic și glucidic.

De asemenea, această algă brună prezintă activitate antioxidantă, care se datorează în principal conținutului ridicat în florotanine și compuși fenolici, dar și a altor constituenți, de exemplu: prolină, manitol, acid palmitic, acid oleic, fucosterol, care pot contribui la efectele antioxidante generale asupra organismului. Valorificarea acestei specii este pe deplin justificată de importanța sa nutraceutică și farmaceutică.

Se cunosc invenții în care se descriu procedee de obținere a microalgelor, după cum urmează: în brevetul de invenție **CN1923994 Culture method of *Dunaliella salina***, se prezintă o metodă de cultivare a microalgelor din medii cu salinitate ridicată, care se caracterizează prin următoarele: însămânțarea bacilului în mediul de cultură, obținând viteza de creștere la 4.135×10^5 /zi, cantitatea biologică la 846.88 mg și cantitatea acumulată de beta-caroten la 125,4 mg, pentru accelerarea și dezvoltarea algelor și a industriei betacarotenului. Mediile de cultură ale algelor din zonele hipersaline sunt: apa de mare, mediul Johnson modificat, mediul f/12 sau ASP2. Condițiile convenționale de cultivare sunt: temperatura de cultivare 24-26°C, intensitatea luminii 100-150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, timpul de lumină 10-14h/zi. Metoda constă în cultivarea la temperatura de 25°C,



timpul de lumină fiind de 12 h/zi. Metoda de cultivare constă în agitare, viteza de vibrație fiind de 100-150 rpm, cantitatea de inoculare a bacilului de 10-1000 cfu/ml, supunere a algelor la temperaturi ridicate, salinitate ridicată și/sau stres în timpul perioadei de creștere logaritmică; temperatura stresului la temperatură ridicată este setată la 30-37°C, concentrația de NaCl sub stres ridicat este de la 3-5M, iar intensitatea luminii la stres puternic este de 500-900 μmol (Espacenet - Description). Dezavantajul metodei îl reprezintă faptul că se aplică doar microalgelor din zonele cu o salinitate foarte ridicată.

Invenția **US200503740 Method for culturing organic blue-green algae** se referă la o metodă de cultivare a algelor verzi-albastre, care cuprinde etapele de obținere a speciilor de alge dorite, cu inocularea mediului de cultură. Realizarea culturii este caracterizată prin aceea că mediul de cultură respectiv conține substanțe organice fermentate și aerate cu conținut ridicat de azot și are un pH de 8 sau mai mare și nu conține săruri anorganice, cum ar fi carbonat sau hidrogen carbonat. Invenția ne dezvăluie o metodă pentru cultivarea algelor organice verzi-albastre și prepararea mediului său de cultură, la care nu se adaugă hidrogen carbonat, carbonat sau alt regulator sau tampon de pH în procesul de cultură. În schimb, nivelul de pH al mediului de cultură potrivit pentru creșterea algelor se realizează folosind materie organică fermentată, agitație și aerare. Cultivarea algelor organice verzi-albastre are loc într-un mediu de cultură cu un nivel de $\text{pH} \geq 8,0$ care poate fi atins prin aerare și agitare într-o anumită perioadă de timp fără adăugarea de Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaH_2PO_4 sau altele săruri anorganice ca ajustator de pH sau tampon, astfel încât întregul proces de cultură se desfășoară într-un mediu organic, fără contaminarea aditivilor anorganici. Algele verzi-albastre rezultate oferă consumatorilor o alegere organică, sigură și sănătoasă, care pot fi ingerate direct sau într-o manieră prelucrată ulterior (1499086612688491000-US20050037480A1 (storage.googleapis.com)). Și această metodă are dezavantajul ca nu se aplică speciei macroalgale *C. barbata*.

În brevetul **US20190183161 - IMPROVED METHOD FOR GROWING ALGAE**, se prezintă metode pentru producerea culturilor de alge cu densitate mare, precum și a suplimentelor nutritive din astfel de culturi și utilizarea acestor culturi pentru a produce proteine terapeutice. Se prezintă metodele pentru cultivarea aerobă, heterotrofă a unei culturi de densitate mare pentru specii microalgale de *Chlamydomonas*, cuprinzând: obținerea unui inocul al unei culturi substanțial pure de *Chlamydomonas* sp. la o concentrație de 0,1 până la 15 g/L; menținerea unei culturi de producție de *Chlamydomonas* sp. aerob la un pH cuprins între 6,0 și 9,0 și o temperatură



17

între 15°C și 37°C; inițierea alimentării culturii de producție prin furnizarea de mediu de alimentare a culturii de producție atunci când pH-ul culturii depășește un punct de referință predeterminat și încetarea alimentării atunci când pH-ul scade sub punctul predeterminat (în care punctul de referință predeterminat este între pH 5,5 și pH 8,5); creșterea culturii de producție în condiții aseptice până când se atinge o densitate țintă; recoltarea *Chlamydomonas* sp. din cultură. *Chlamydomonas* sp. este selectat din grupul format din speciile microalgale *Chlamydomonas reinhardtii*, *C. dysomos*, *C. mundane*, *C. debaryana*, *C. moewussi*, *C. culleus*, *C. noctigama*, *C. aulata*, *C. applanata*, *C. maronas*, *C. marvanii*. Biomasa algală cuprinde una sau mai multe specii de *Chlamydomonas*, în care *Chlamydomonas* este la o concentrație de cel puțin 50 g/L greutate celulă uscată și în care biomasa este uscată astfel încât materialul rezultat să conțină mai puțin de 25%, mai puțin de 20%, mai puțin de 15%, mai puțin de 10% sau mai puțin de 5% umiditate (WO2018038960A1 - Improved method for growing algae - Google Patents). Și această metodă are dezavantajul ca nu se aplică speciei macroalgale *C. barbata*.

Brevetul **MX2014000699A** se referă la o metodă de obținere a biomasei microalgale, la un sistem de obținere a acestei biomase și la un mediu de cultivare al algelor. Metoda cuprinde etapa de cultivare a microalgelor într-un mediu de cultură având un pH peste 8, astfel încât acumularea de lipide și/sau carbohidrați este crescută, iar mediul este unul salin. De preferință, pH-ul mediului este în intervalul 8-11, acceptabil 8,5-11, preferabil 9-11 și optim 10-11 (EP2737049A1 - Methods and system for obtaining algal biomass and cultivation medium - Google Patents). Și această metodă are dezavantajul ca nu se aplică speciei macroalgale *C. barbata*.

Invenția **CN106489709 Method for cultivating algae on surface of composite insulating material** prezintă o metodă de creștere a microalgelor pe suprafața unui material izolator compozit, caracterizată prin faptul că prezintă următoarele etape: colectarea și prelucrarea materialului algal donor; purificarea algelor și adăugarea de mediu de cultură; extracția secreției extracelulare din algele care au fost supuse unui tratament de inactivare și inocularea secreției extracelulare pe suprafața materialului izolator compozit; măsurarea densității celulare obținute în urma creșterii pe materialul izolator compozit. Acest material izolant compozit este un cauciuc siliconic vulcanizat RTV sau un material HTV cauciuc siliconic vulcanizat la temperatură înaltă (CN106489709 Method for cultivating algae on surface of composite insulating material (wipo.int)). Dezavantajul acestor metode este acela că sunt folosite în realizarea de culturi microalgale și nu se aplică speciei macroalgale *C. barbata*.



Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în asigurarea creșterii și dezvoltării algei brune *C. barbata* în spații special amenajate, în vederea unor necesități viitoare, evitând în acest sens exploatarea din mediul natural și crearea de dezechilibre ecologice, prin realizarea unui sistem recirculant pentru aplicarea procedurii de obținere a algei brune. Sistemul recirculant pentru creșterea algelor în mediu controlat, este format din următoarele echipamente:

- 8 acvarii cu dimensiunile: 60 cm lungime, 20 cm lățime, 20 cm înălțime;
- Sistem de furtunuri pentru circuitul de apă;
- Dispozitiv de răcire al apei model Hailea HC 500A. Dimensiune: 475×360×490mm. Caracteristici: voltaj: 220 ~ 240V; frecvența: 50Hz; curent de lucru: 2,4A; putere: 1/2 HP; răcire apă: 200 ~ 1200 L/oră; mediu de răcire: R134A; debit: 1200 ~ 3000 L/h;
- Pompă de recirculare apă model EHEIM universal 600lph. Caracteristici: puterea pompei pe oră la 50 Hz de 600,00 L; capul de pompare la aprox. 50 Hz. (Hmax) 1,50 m; putere la 50 Hz de 10,00 watt; tensiune alimentare 230 volți; frecvență 50 Hz;
- Sterilizator UV model Oase Clear Tronic 9 W. Caracteristici: UVC-putere W 9; tensiune nominală 230 V/50 Hz;
- Pompă de aerare model Oase OxyMax 100 Lph cu 1 ieșire. Caracteristici: tensiune nominală 230 V/50 Hz; max. debitul de debit l/h 100; ieșire de presiune, max. bar 0,2.

Sistemul este conceput pentru asigurarea furnizării în paralel a apei răcite către toate acvariile și preluarea în paralel a apei calde din acvarii către răcitor. Acvariile sunt realizate din policarbonat compact, marca Marlon FSX Longlife 8 mm grosime, plăcile fiind debitate de către furnizor conform specificațiilor de dimensiune indicate de INCDM. Lipirea plăcilor s-a realizat cu adeziv pentru policarbonat compact marca Mafix PMMA 4. Fiecare acvariu a fost perforat pe laturile mici (20 x 20 cm) în vederea montării robinetilor pentru sistemul recirculant. Au fost montați robineti de trecere din plastic, fiecare acvariu având montați câte trei robineti (doi pe una dintre laturile mici și unul pe latura opusă). Robinetii au fost montați pe mijlocul laturei mici la 4 cm față de partea de jos a acvariului și 4 cm față de partea de sus, aceștia din urmă servind la alimentarea cu apă rece a acvariilor și eliminarea apei calde din acvariu. Robinetul din partea de jos are rolul de golire a acvariului în caz de nevoie. Acvariile au fost acoperite cu o placă din același material ca acvariile, cu dimensiunea de 60 x 20 cm.

Circularea apei între acvarii și sistemul de răcire s-a realizat prin intermediul unui sistem de furtunuri de grădină, din plastic negru, cu diametrul de 12 mm. Tot circuitul de furtunuri a fost



izolat termic cu un material de culoare albă, pentru a împiedica acumularea de căldură datorată culorii negre a furtunurilor. Sistemul de furtunuri preia apa gravitațional, simultan, de la toate acvariile. Circuitul de furtunuri de la fiecare acvariu se cuplează două câte două până se ajunge la un singur furtun care transportă apa către răcitor. După ce apa trece prin răcitor este preluată de pompa de recirculare și împinsă prin sterilizatorul UV-C și apoi către acvarii. Porțiunea care merge de la sterilizator către acvarii se ramifică treptat, până când dintr-un furtun se ajunge la 8 furtunuri care alimentează fiecare acvariu cu apă răcită. Alimentarea în paralel a acvariilor permite menținerea unei temperaturi constante în acvarii și de asemenea permite izolarea unui singur acvariu (în caz de necesitate), fără a întrerupe furnizarea apei către restul acvariilor. Intervalul de temperatură utilizat la răcirea apei a fost de 18-20°C (optim pentru o creștere naturală a algei *C. barbata*). Răcitorul pornește de la o temperatură a apei la intrare mai mare de 20°C și se oprește la o temperatură mai mică de 18°C. Cu ajutorul pompei de aer s-a realizat alimentarea independentă a tuturor acvariilor cu aer. Din pompa de aer a fost format un circuit de distribuire a aerului către acvarii. În fiecare acvariu aerul a fost dispersat cu ajutorul unei pietre de difuzie cu dimensiunea de 1-2 mm, care asigură realizarea unui flux de bule de aer, fără a perturba dezvoltarea plantulelor. Aerul a fost furnizat permanent. În Figura 1 este prezentat acest sistem recirculant de creștere a algelor.

Procedeul de obținere a algei brune *C. barbata* se poate realiza prin două moduri:

a) cu adădire de mediu nutritiv și b) în absența mediului nutritiv. În ambele cazuri rezultatele au fost favorabile.

Debutul unei culturi macroalgale este condiționat de materialul algal din mediul natural, necesar a fi în plină perioadă reproductivă. Pentru specia de interes *C. barbata*, această perioadă este în strânsă corelație cu factorii de mediu, în special cu temperatura apei, care trebuie să fie în jur de 19 - 20°C. În mod obișnuit, procesul are loc la finalul lunii mai – începutul lunii iunie, dar se poate decala în funcție de condițiile meteo. Astfel, în urma unor expediții periodice pe teren în zona sudică a litoralului românesc, atunci când s-a observat prezența elementelor reproducătoare, s-au prelevat, de la 1 – 1,5 m adâncime, 4 - 5 exemplare mature de *C. barbata*, care au fost supuse unei analize calitative. Metoda utilizată a fost în totalitate una neinvazivă, deoarece s-au prelevat doar părțile apicale, aproximativ 30 de vârfuri (max. 3 cm), care prezentau receptacule bine formate, în care se regăsesc formațiunile sexuale, ca un indicator al faptului că exemplarele se aflau în perioada reproductivă. S-au colectat elementele fertile de la cele 4 – 5 exemplare fixate pe



2 pietre (doar porțiunea apicală, max. 3 cm), acestea fiind ulterior reintroduse în mare, fără a distruge talurile donoare. Talurile prezentau și alte elemente reproducătoare, astfel că procesul biologic a continuat în mediul natural. Prezența receptaculelor la nivelul părții apicale a ramurilor este un factor decisiv în evoluția ulterioară a culturii.

Fragmentele de tal s-au depozitat în pungi de plastic, fără apă de mare, introduse ulterior în lada frigorifică și transportate către laborator, acolo unde au fost suspușe unor condiții de stres ambiental (depozitate la rece, max. 4°C, întuneric, timp de 24 h) cu scopul de a stimula eliberarea elementelor reproductive. A doua zi, vârfurile au fost curățate cu mare atenție cu o perie foarte fină și clătite cu apă de mare sterilă pentru a îndepărta detritusul aderent și eventualele specii epifite, limitând astfel contaminarea acvariilor.

În primul mod, cel în care s-a utilizat adăugarea de nutrienți, s-a folosit un acvariu de 20L, la baza căruia s-a plasat substrat pietros natural prelevat din zona de colectare a algelor. Materialul algal reproductiv s-a așezat pe acest substrat și s-a adăugat apă de mare filtrată și mediu de cultură Von Stosch Enrichment Solution (VSE). În acest stadiu nu s-a introdus aerarea pentru a nu perturba fixarea zigotului pe substrat. VSE este un mediu nutritiv favorabil creșterii algelor în cultură controlată, fiind o mixtură de apă de mare: filtrată, sterilizată la autoclavă la 121°C pentru 40 de minute și ulterior răcită și un amestec de săruri: NaNO_3 (39 - 46 mg/1L apă de mare); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (8,5 - 12,3 mg/1L apă de mare); $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (260 - 284 μg /1L apă de mare); $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (18,5 - 21,4 μg /1L apă de mare); $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ (2,3 - 4,58 mg/1L apă de mare) și vitamine: Tiamină-HCl (0,15 - 0,32 mg/1L apă de mare); Biotină (0,86 - 1,28 μg /1L apă de mare); B_{12} (0,86 - 1,28 μg /1L apă de mare), substanțe cu rol important în dezvoltarea algelor. Substanțele s-au cântărit cu o balanță de mare precizie METTLER TOLEDO.

S-au preparat soluții stoc cu apă deionizată, sterilizate ulterior prin filtru de 0,22 μm și depozitate la frigider pentru o perioadă de până la 3 luni, din care s-a realizat la nevoie mediu proaspăt de cultură. S-a utilizat 0,8 - 1,4 ml VSE la 1L de apă de mare. Doar sărurile s-au sterilizat la autoclavă, vitaminele sterilizându-se prin filtrare cu un filtru de 0,20 μm , Ø 25 mm pentru a evita degradarea acestora. Schimbarea mediului nutritiv s-a realizat săptămânal, pentru a limita deficitul de nutrienți. După ce s-a observat la microscop fixarea zigotului, materialul algal matur a fost înlăturat și s-a introdus aerarea, pentru a evita instalarea condițiilor anoxice și un regim de iluminare artificială (lumina neon - 36 Watt), cu o fotoperioadă de 12:12 (12 ore lumină: 12 ore



întuneric), controlabilă cu ajutorul unei prize programabile digital, pentru a simula condițiile din mediul natural de viață al speciei.

Cel de al doilea mod de creștere a algelor, fără nici un stimulent nutritiv, s-a derulat în aer liber, în condiții de lumină naturală, utilizând sistemul recirculant de creștere a algelor. Acest lucru a fost posibil doar pe durata sezonului cald. Ulterior, o dată cu scăderea temperaturii atmosferice și instalarea sezonului rece, cultura a fost mutată în spațiu închis (laborator), într-un acvariu de 160 L, plasat sub lumină artificială, cu o fotoperioadă de 12:12 (12 ore lumină: 12 ore întuneric), controlabilă cu ajutorul unei prize programabile digital.

În fiecare din cele opt acvarii care formează sistemul recirculant, materialul algal fertil s-a așezat pe plase (cu ochiul de 1,5 cm) și pe substrat dur artificial, în vederea eliberării materialului reproducător și fixării zigotului. Ca substrat de fixare pentru viitoarele plantule, s-au folosit 32 de pietre, un amestec de granit și șist. Exemplarele fertile au fost plasate atât pe plase, cât și direct pe substrat pentru a maximiza fixarea exemplarelor. Fragmentele mature de tal au fost menținute 5 zile, fără aerare și fără nici un alt tip de perturbare, în afară de influența dispozitivului de răcire, pentru a facilita fixarea zigoților pe substrat. După această perioadă, substratul a fost analizat la microscop, unde s-a observat fixarea zigoților, astfel că materialul algal matur a fost îndepărtat, s-a introdus aerarea pentru a evita instalarea anoxiei și s-a realizat un schimb constant de apă (de două ori pe săptămână). Rata de schimb a apei a fost de 2L/acvariu, folosindu-se apă de mare filtrată prin filtru de 0,3 μm și sterilizată cu ajutorul lămpii UV pentru a limita contaminarea acvariilor cu diverse microorganisme. În prealabil s-au făcut analize la apa de mare nefiltrată, filtrată și sterilizată care urma să fie folosită în cultură, pentru a vedea compoziția fitoplanctonică, cantitatea de nutrienți și încărcătura microbiologică. Această analiză complexă este absolut necesară pentru a cunoaște de la debutul culturii eventualei factori perturbatori sau chiar limitativi ai dezvoltării macroalgale. Astfel, în ceea ce privește analiza fitoplanctonică, în apa nefiltrată au fost observate flagelate mici, dar în cea filtrată acestea au fost absente. În apa sterilizată nu au fost prezente cianobacterii (alge verzi-albastre) și nici diatomee. Cu toate acestea, pe parcursul procesului tehnologic s-au observat dezvoltări ale diatomeelor, care însă au fost controlate prin adăugare de GeO_2 . Analiza chimică a apei de mare a arătat că în apa filtrată există o concentrație ridicată de azotați și fosfați (TP - 14,53 μM ; NO_3 - 16,05 μM) care a funcționat ca mediu nutritiv pentru plantulele nou formate, dat fiind faptul că acest proces s-a derulat fără adăugare de nutrienți. Din punct de vedere microbiologic, analiza apei sterilizate prin UV a arătat uneori prezența unor



microorganism pigmentate, respectiv flavobacterii nepatogene, care nu au perturbat procesul evolutiv al stadiilor juvenile de *C. barbata*.

De asemenea, periodic s-a prelevat câte o probă de apă de mare (30 – 40 ml din fiecare acvariu), în vederea monitorizării cu sonda multiparametrică a parametrilor esențiali (oxigen, pH, salinitate, temperatură) pentru a surprinde din timp eventualele perturbări și a le remedia. Astfel, pe durata procesului, oxigenul a variat între 7,98 și 9,16 mg/L, pH-ul între 7,82 și 7,96, iar salinitatea între 15,85 și 16,86 PSU. În fiecare acvariu s-a montat un termometru digital submersibil, pentru a monitoriza permanent temperatura apei. Pentru acest experiment s-a utilizat doar apă de mare filtrată și sterilizată UV (minim 48 de ore), fără nici un alt adaos de nutrienți.

Periodic, s-au aplicat tratamente cu GeO_2 , tratament caracteristic culturilor macroalgale, pentru a înlătura diatomeele. S-a preparat în avans o soluție stoc, prin adaos de 250 mg GeO_2 la 1L de apă deionizată, din care s-a utilizat la nevoie 1ml/1L apă de mare. Nu se folosește în exces GeO_2 , deoarece îngreunează creșterea algelor brune. Însă la început, când exemplarele sunt vulnerabile la o dezvoltare abundentă a diatomeelor, s-a utilizat adiția de GeO_2 la fiecare 6 săptămâni. În momentul când s-a considerat că dezvoltarea diatomeelor este sub control, nu s-a mai aplicat această adiție în apa de mare. Atunci când exemplarele au fost mutate în laborator, s-a menținut rata de reînnoire a apei de două ori pe săptămână, însă nu s-a mai folosit apa de mare sterilizată UV, deoarece exemplarele erau suficient de mature și nu s-a dorit sensibilizarea excesivă a acestora, folosindu-se doar apă de mare filtrată prin filtru de 0,3 μm .

După o săptămână, atât în cazul exemplarelor pentru care s-a folosit VSE, cât și în cazul celor în care s-a utilizat doar apă de mare filtrată și sterilizată, s-au observat stadii incipiente de dezvoltare ale viitoarelor plantule de *C. barbata*. Conform literaturii, se definesc 4 stadii incipiente de dezvoltare pentru *C. barbata* (Falace *et al.*, 2018). Inițial, au fost semnalate primele două stadii de dezvoltare ale speciei. Astfel, s-au observat formațiuni inițial rotunde (stadiul I), care ulterior au căpătat o formă elongată, de culoare maro, de maxim 0,05 mm înălțime (stadiul II). De asemenea, după două săptămâni s-a observat și o dezvoltare masivă de diatomee. Pentru a reduce impactul diatomeelor asupra exemplarelor juvenile s-a aplicat un prim tratament cu GeO_2 . După 3 săptămâni s-a observat și o dezvoltare a algelor verzi filamentoase, o problemă comună în culturile macroalgale în condiții controlate de laborator. Crearea periodică, dar pe termen cât mai scurt, a unor condiții de întuneric total, limitează acest fenomen deoarece împiedică procesele fiziologice ale speciilor oportuniste (sunt specii fotofile și necesită o cantitate mare de lumină pentru înmulțire



și dezvoltare ulterioară). După 40 zile s-a observat apariția stadiului III de dezvoltare, cel în care apar primele ramificații. Aceste ramificații apar la exemplarele mai mari de un 1 cm. Creșterea talurilor este diferită, dimensiunea exemplarelor variind între 0,5 cm și 1,5 cm, dar se poate afirma cu siguranță că după o lună toate exemplarele sunt vizibile din punct de vedere microscopic. După 7 săptămâni, s-au observat ramificații de ordinul 2 la câteva exemplare. După 2 luni, majoritatea exemplarelor prezentau ramificații de ordinul 2. De altfel, după 2 luni s-a remarcat și prezența stadiului IV, cel în care plantulele au parafize (mici perișori ce vor acoperi receptaculele cu viitoarele organe reproducătoare). Exemplarele își continuă dezvoltarea și încep să apară ramificațiile de ordinul 3, chiar de ordinul 4 sau 5. După 9 săptămâni, majoritatea exemplarelor (90 %) au ramificații de ordinul 3. După 2 luni și jumătate, unele exemplare au și 3 cm înălțime și multiple ramificații. Discul bazal de fixare al speciei de substrat este bine definit. La majoritatea exemplarelor sunt prezente parafizele. În săptămâna a 12 a, exemplarele prezintă dimensiuni de aproximativ 4 cm și multiple ramificații secundare. În Figura 2 sunt prezentate primele rezultate ale exemplarelor juvenile, obținute după 3 – 4 luni în cultură controlată. Un aspect deosebit de important care a fost remarcat pe durata culturii de *C. barbata*, a fost prezența unor exemplare în stadiul II incipient de dezvoltare la 3 luni de la debutul experimentului. Acestea sunt considerate a fi cea de a doua generație de exemplare de *C. barbata* cu dezvoltare exclusiv în cultură controlată de laborator. Este un indiciu al faptului că unele exemplare (deja ajunse la 4 cm înălțime) au intrat în perioadă reproductivă, ceea ce a dus la apariția acestor exemplare de mici dimensiuni. Acest rezultat reprezintă cheia asigurării unui materialului biologic continuu în cultură. Cultura a fost monitorizată zilnic, observându-se în continuare apariția periodică de noi exemplare de mici dimensiuni din exemplarele care au intrat în perioada de reproducere pe durata experimentului.

După 12 luni de cultură în mediu controlat, fără adaos de mediu nutritiv, s-au obținut 1220 de noi exemplare de *C. barbata*, cu dimensiuni ce au variat între 5 și 10 cm înălțime. În Figura 3 sunt prezentate rezultatele finale, obținute în urma aplicării acestei tehnici de creștere a algei brune *C. barbata* prin intermediul sistemului recirculant de creștere a algelor. Comparând cele două metode de creștere, cu și fără adăugire de mediu nutritiv VSE, se poate spune că, în cazul adăugării ritmul de creștere al speciei a fost mai ridicat, algele dezvoltându-se mai rapid, comparativ cu procedeul în care nu s-a utilizat mediu nutritiv. Cu toate acestea, chiar și fără un mediu nutritiv adițional, exemplarele de *C. barbata* au avut o dezvoltare favorabilă, cu discuri bazale bine ancorate de substrat și numeroase ramificații secundare, cu o evoluție progresivă.



Cele două procedee/metode de creștere au rezultate favorabile și furnizează soluții pentru două necesități actuale: valorificare, caz în care se recomandă a se folosi mediu nutritiv pentru a obține o biomasă algală cât mai mare, respectiv relocare a exemplarelor din cultură în zone de interes, caz în care este de preferat a nu se utiliza adaos de nutrienți pentru a se evita sensibilizarea excesivă a exemplarelor și a permite o creștere în condiții cât mai apropiate de mediul în care se dorește a fi relocate.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Sistemul recirculant se realizează ușor;
- Metoda poate fi aplicată atât în laboratoarele de cercetare, precum și în aplicații la scară industrială, fără a necesita condiții sterile de lucru în proporție de 100%;
- Metoda este neinvazivă, astfel că nu aduce prejudicii materialului algal din mediul natural. Metoda are la bază stricta manipulare a elementelor reproducătoare, excluzând periclitatea exemplarelor mature din mediul marin;
- Asigură un flux continuu de material algal de *C. barbata*, independent de condițiile de mediu, în scopul valorificării ulterioare (relocare și/sau exploatare);
- procedeul de obținere este prietenos cu mediul;
- nu se folosesc materiale sau substanțe toxice;
- este un procedeu curat, ușor de aplicat și economic;
- nu rezultă deșeuri toxice;
- se asigură obținerea de material algal fără impurități sau alte depuneri;
- se asigură continuitatea speciei, dezvoltarea algei brune *C. barbata* în cultură controlată contribuind la menținerea acestei macroalge considerată specie periclitată (Critic Amenințată, conform Listei Roșii și criteriilor IUCN);
- Furnizează o soluție unică, într-o abordare holistică, pentru două necesități de maximă actualitate: asigurarea de material pentru relocarea speciei în zone unde populația va fi afectată de activitățile intense din zona costieră și furnizarea de material pentru extracția de compuși cu aplicabilitate în diverse domenii, fără a periclita resursa limitată din mediul natural.

Prezentăm exemplul de obținere a algei brune *Cystoseira barbata*:

Procedeul de obținere a algei în condiții de laborator, se poate realiza prin două moduri:

a) cu adăugare de mediu nutritiv și b) în absența mediului nutritiv



În cazul ambelor metode, s-a utilizat material biologic algal de *C. barbata* aflat obligatoriu în plină perioadă reproductivă. Declanșarea procesului reproductiv este în strânsă corelație cu factorii de mediu, în special cu temperatura apei, care trebuie să fie în jur de 19 - 20°C. În mod obișnuit, procesul are loc la finalul lunii mai – începutul lunii iunie, dar se poate decala în funcție de condițiile meteo. S-a prelevat doar porțiunea apicală, max. 3 cm, de la 4 – 5 exemplare mature; metodă neinvazivă. Fragmentele de tal s-au depozitat în pungi de plastic, fără apă de mare, introduse în lada frigorifică și transportate către laborator, acolo unde au fost suspuse unor condiții de stres ambiental (depozitate la rece, max. 4°C, întuneric, timp de 24 h) cu scopul de a stimula eliberarea elementelor reproductive. A doua zi, vârfurile au fost curățate ușor cu o perie foarte fină și clătite cu apă de mare sterilă, pentru a îndepărta detritusul și speciile epifite și a limita contaminarea acvariilor.

a) cu adădire de mediu nutritiv

S-a folosit un acvariu de 20L, la baza căruia s-a plasat substrat pietros natural prelevat din zona de colectare a materialului algal donor. Materialul algal reproductiv s-a așezat pe substrat și s-a adăugat apă de mare filtrată și mediu de cultură Von Stosch Enrichment Solution (VSE), respectiv 0,8 - 1,4 ml VSE la 1L de apă de mare; fără aerare în stadiul inițial, pentru a evita perturbările și a permite fixarea zigotului pe substrat. După ce s-a observat, în urma analizei microscopice, fixarea zigotilor, materialul algal matur a fost înlăturat, s-a introdus aerarea, pentru a evita instalarea condițiilor anoxice și un regim de iluminare artificială (lumina neon - 36 Watt), cu o fotoperioadă de 12:12 (12 ore lumină: 12 ore întuneric), controlabilă cu ajutorul unei prize programabile digital, pentru a simula condițiile din mediul natural de viață al speciei. S-a realizat un schimb de apă și adădire de mediu nutritiv o dată pe săptămână.

b) în absența mediului nutritiv

Pe durata sezonului cald, procesul tehnologic s-a derulat în condiții de lumină naturală, utilizând sistemul recirculant de creștere a algelor, format din opt acvarii realizate din policarbonat compact, marca Marlon FSX Longlife 8 mm grosime, un sistem de furtunuri pentru circuitul de apă, un dispozitiv de răcire al apei model Hailea HC 500A, o pompă de recirculare apă model EHEIM universal 600lph, un sterilizator UV model Oase Clear Tronic 9 W și o pompă de aerare model Oase OxyMax 100 Lph cu 1 ieșire. Sistemul este conceput pentru asigurarea furnizării în paralel a apei răcite către toate acvariile și preluarea în paralel a apei calde din acvarii către racitor. Materialul biologic fertil s-a așezat pe plase (cu ochiul de 1,5 cm) și pe substrat dur artificial, în



vederea eliberării materialului reproducător și fixării zigotului. S-au folosit 32 de pietre, un amestec de granit și șist, pentru a servi drept substrat de fixare pentru viitoarele plante. Fragmentele reproductive au fost menținute 5 zile, fără aerare și fără nici un alt tip de perturbare, în afară de influența dispozitivului de răcire al apei. După 5 zile, materialul algal matur a fost îndepărtat, pentru a evita instalarea condițiilor de anoxie, s-a introdus aerarea și s-a realizat un schimb de apă de două ori pe săptămână. Rata de schimb a apei a fost de 2L/acvariu, folosindu-se apă de mare filtrată prin filtru de 0,3 μm și sterilizată cu ajutorul lămpii UV (minim 48 de ore), pentru a limita contaminarea acvariilor cu microorganisme.

În prealabil s-au făcut analize la apa de mare nefiltrată, filtrată și sterilizată care urma să fie folosită în cultură, pentru a vedea compoziția fitoplanctonică, cantitatea de nutrienți și încărcătura microbiologică. Această analiză complexă este absolut necesară pentru a cunoaște de la debutul culturii eventualii factori perturbatori sau chiar limitativi ai dezvoltării macroalgale. Astfel, în ceea ce privește analiza fitoplanctonică, în apa nefiltrată au fost observate flagelate mici, dar în cea filtrată acestea au fost absente. În apa sterilizată nu au fost prezente cianobacterii (alge verzi-albastre) și nici diatomee. Cu toate acestea, pe parcursul procesului tehnologic s-au observat dezvoltări ale diatomeelor, care însă au fost controlate prin adădire de GeO_2 . Analiza chimică a apei de mare a arătat că în apa filtrată există o concentrație ridicată de azotați și fosfați (TP - 14,53 μM ; NO_3 - 16,05 μM) care a funcționat ca mediu nutritiv pentru plantulele nou formate, dat fiind faptul că acest proces s-a derulat fără adădire de nutrienți. Din punct de vedere microbiologic, analiza apei sterilizate prin UV a arătat uneori prezența unor microorganisme pigmentate, respectiv flavobacterii nepatogene, care nu au perturbat procesul evolutiv al stadiilor juvenile de *C. barbata*.

De asemenea, periodic s-a prelevat câte o probă de apă de mare (30 – 40 ml din fiecare acvariu), în vederea monitorizării cu sonda multiparametrică a parametrilor esențiali (oxigen, pH, salinitate, temperatură) pentru a surprinde din timp eventualele perturbări și a le remedia. Astfel, pe durata procesului, oxigenul a variat între 7,98 și 9,16 mg/L, pH-ul între 7,82 și 7,96, iar salinitatea între 15,85 și 16,86 PSU. În fiecare acvariu s-a montat un termometru digital submersibil, pentru a monitoriza permanent temperatura apei.

S-au aplicat periodic tratamente cu GeO_2 , prin adăos de 250 mg GeO_2 la 1L de apă deionizată, din care s-a utilizat la nevoie 1ml/1L apă de mare, în vederea eliminării diatomeelor; adădire de GeO_2 la fiecare 6 săptămâni până la înlăturarea completă a diatomeelor. O dată cu instalarea sezonului rece, cultura a fost mutată în spațiu închis (laborator), într-un acvariu de 160L,



plasat sub lumina artificială, cu o fotoperioadă de 12:12 (12 ore lumină: 12 ore întuneric), controlabilă cu ajutorul unei prize programabile digital; s-a menținut rata de reînnoire a apei de două ori pe săptămână; s-a folosit doar apă de mare filtrată prin filtru de 0,3 μm ; nu s-a mai folosit apa de mare sterilizată UV, deoarece exemplarele erau suficient de mature și nu s-a dorit sensibilizarea excesivă a acestora.



Bibliografie:

Bavaru A., 1977. Contribuții la studiul asociațiilor algale din faciesul de piatră de pe litoralul românesc al Mării Negre. Teză de doctorat. București, 195 pag.

Falace A, Kaleb S, De la Fuente G, Asnaghi V, Chiantore M, 2018. *Ex situ* cultivation protocol for *Cystoseira amentacea* var. *stricta* (Fucales, Phaeophyceae) from a restoration perspective. PLoS ONE 13(2): e0193011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193011>.

Vasilu F., Muller G.I., 1973 - Consequence of ice drift during the winter 1972/1973 on the *Cystoseira* populations along the Romanian shore of the Black Sea. Cercetări Marine IRCM Constanța, 5-6: 223-238.

Vasilu F., 1984 - Producția algelor macrofite de la litoralul românesc al Mării Negre. Teză de doctorat, București MEI, Inst. de Șt. Biologice, 201 pag.

Verdura J, Sales M, Ballesteros E, Cefali Me and Cebrian E, 2018. Restoration of a Canopy-Forming Alga Based on Recruitment Enhancement: Methods and Long-Term Success Assessment. Front. Plant Sci. 9:1832. doi: 10.3389/fpls.2018.01832.

Yong Qiang Yu, Quan Sheng Zhang, Yong Zheng Tang, Shu Bao Zhang, Zhi Cheng Lu, Shao Hua Chu, Xue Xi Tang, 2012 - Establishment of intertidal seaweed beds of *Sargassum thunbergii* through habitat creation and germling seeding. Ecological Engineering 44 (2012) 10– 17.

Ordinul nr. 488/2020 privind aprobarea Listei speciilor marine periclitate de la litoralul românesc al Mării Negre în vederea protejării și conservării lor, publicat în M.Of.300 din 9 aprilie 2020.

Espacenet - Description

1499086612688491000-US20050037480A1 (storage.googleapis.com)

EP2737049A1 - Methods and system for obtaining algal biomass and cultivation medium - Google

Patents.

CN106489709 Method for cultivating algae on surface of composite insulating material (wipo.int)



SISTEM DE INSTALAȚIE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE**A ALGEI BRUNE *Cystoseira barbata***

Revendicări

1. Sistem de instalație pentru obținerea algei brune *C. barbata*, conceput pentru asigurarea furnizării în paralel a apei răcite către toate acvariile și preluarea în paralel a apei calde din acvarii către racitor, caracterizat prin aceea că este constituit din:

- 8 acvarii cu dimensiunile: 60 cm lungime, 20 cm lățime, 20 cm înălțime din policarbonat dotate cu câte 3 robinete de golire dispuse două pe latura mică și unul pe latura opusă;
- Sistem de furtunuri pentru circuitul de apă, care permite circularea apei între acvarii și sistemul de răcire, prin intermediul unui sistem de furtunuri de grădină din plastic negru cu diametrul de 12 mm; întreg circuitul de furtunuri a fost izolat termic cu un material de culoare albă;
- dispozitiv de răcire al apei model Hailea HC 500A dimensiune: 475×360×490mm. având caracteristicile: voltaj: 220 ~ 240V; frecvența: 50Hz; curent de lucru: 2,4A; putere: 1/2 HP; răcire apă: 200 ~ 1200 L/oră; mediu de răcire: R134A; debit: 1200 ~ 3000 L/h;
- pompă de recirculare apă model EHEIM universal 600lph, cu următoarele caracteristici: puterea pompei pe oră la 50 Hz de 600,00 L; capul de pompare la aprox. 50 Hz. (Hmax) 1,50 m; putere la 50 Hz de 10,00 watt; tensiune alimentare 230 volți; frecvență 50 Hz;
- sterilizator UV model Oase Clear Tronic 9 W. Caracteristici: UVC-putere W 9; tensiune nominală 230 V/50 Hz;
- pompă de aerare model Oase OxyMax 100 Lph 1 ieșire, cu următoarele caracteristici: tensiune nominală 230 V/50 Hz; max. debitul de debit l/h 100; ieșire de presiune, max. bar 0,2, dotată cu un circuit de distribuire a aerului către acvarii; în fiecare acvariu, aerul a fost dispersat cu ajutorul unei pietre de difuzie cu dimensiunea de 1-2 mm, care asigură realizarea unui flux de bule de aer.

2. Procedeu de obținere a algei brune *C. barbata* în absența mediului nutritiv, folosind sistemul de instalație pentru obținerea algei brune conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că se



prelevează porțiunea apicală, max. 3 cm, de la 4 – 5 exemplare mature; fragmentele de tal se depozitează în pungi de plastic, la rece, la o temperatură de max. 4°C, la întuneric, timp de 24 h; ulterior curățarea lor cu o perie foarte fină, clătire cu apă de mare sterilă; materialul biologic fertil s-a așezat în acvarii pe plase (cu ochiul de 1,5 cm) și pe substrat dur artificial format dintr-un amestec de granit și șist; umplere acavrii cu apă de mare filtrată prin filtru de 0,3 μm și sterilizată cu ajutorul lămpii UV; menținere 5 zile fără aerare și fără nici un alt tip de perturbare, în afară de influența dispozitivului de răcire al apei; după 5 zile, materialul algal matur a fost îndepărtat; pentru a evita instalarea condițiilor de anoxie, s-a introdus aerarea și s-a realizat un schimb de apă de două ori pe săptămână, apa fiind înlocuită cu o rata de schimb de 2L/acvariu; monitorizare parametri esențiali oxigen, pH, salinitate, temperatură cu sonda multiparametrică, pentru a regla oxigenul între 7,98 și 9,16 mg/L, pH-ul între 7,82 și 7,96, iar salinitatea între 15,85 și 16,86 PSU, periodic se aplică tratamente cu GeO₂, prin adaos de 250 mg GeO₂ la 1L de apă deionizată, din care se utilizează la nevoie 1mL/1L apă de mare; cultura este monitorizată zilnic, după 12 luni se obțin noi exemplare de *C. barbata*, cu dimensiuni între 5 și 10 cm înălțime.

3. Procedeu de obținere a algei brune *C. barbata* în prezența mediului nutritiv conform revendicării 2, caracterizat prin aceea că inițial nu s-a introdus aerarea pentru a nu perturba fixarea zigotului pe substrat; mediul nutritiv folosit este o mixtură de apă de mare: filtrată, sterilizată la autoclavă la 121°C pentru 40 de minute și ulterior răcită și un amestec de săruri: NaNO₃ (39 - 46 mg/1L apă de mare); Na₂HP0₄ x 12H₂O (8,5 - 12,3 mg/1L apă de mare); FeSO₄ x 7H₂O (260 - 284 μg/1L apă de mare); MnCl₂ x 4H₂O (18,5 - 21,4 μg/1L apă de mare); Na₂EDTA x 2H₂O (2,3 - 4,58 mg/1L apă de mare) și vitamine: Tiamină-HCl (0,15 - 0,32 mg/1L apă de mare); Biotină (0,86 - 1,28 μg/1L apă de mare); B₁₂ (0,86 - 1,28 μg/1L apă de mare), substanțe cu rol important în dezvoltarea algelor; adăuie 0,8 - 1,4 ml mediu nutritiv la 1L de apă de mare filtrată.





Fig. 1. Sistem recirculant de creștere a algelor

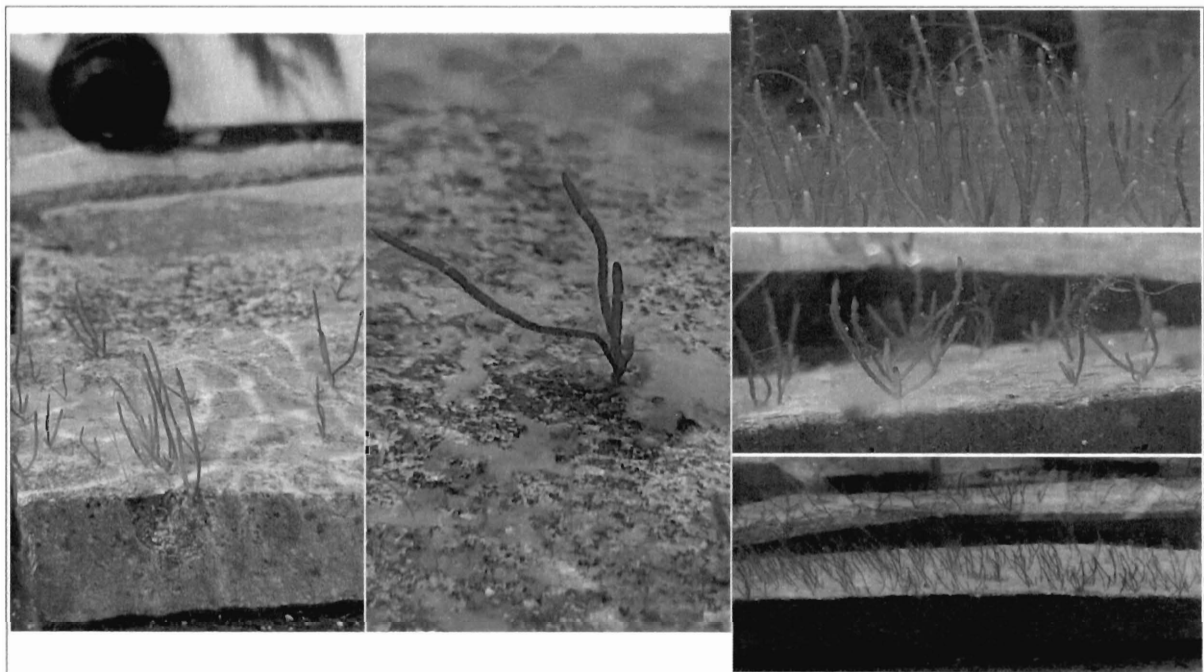


Fig. 2. *C. barbata* – aspecte ale exemplarelor după 3 - 4 luni în cultură controlată

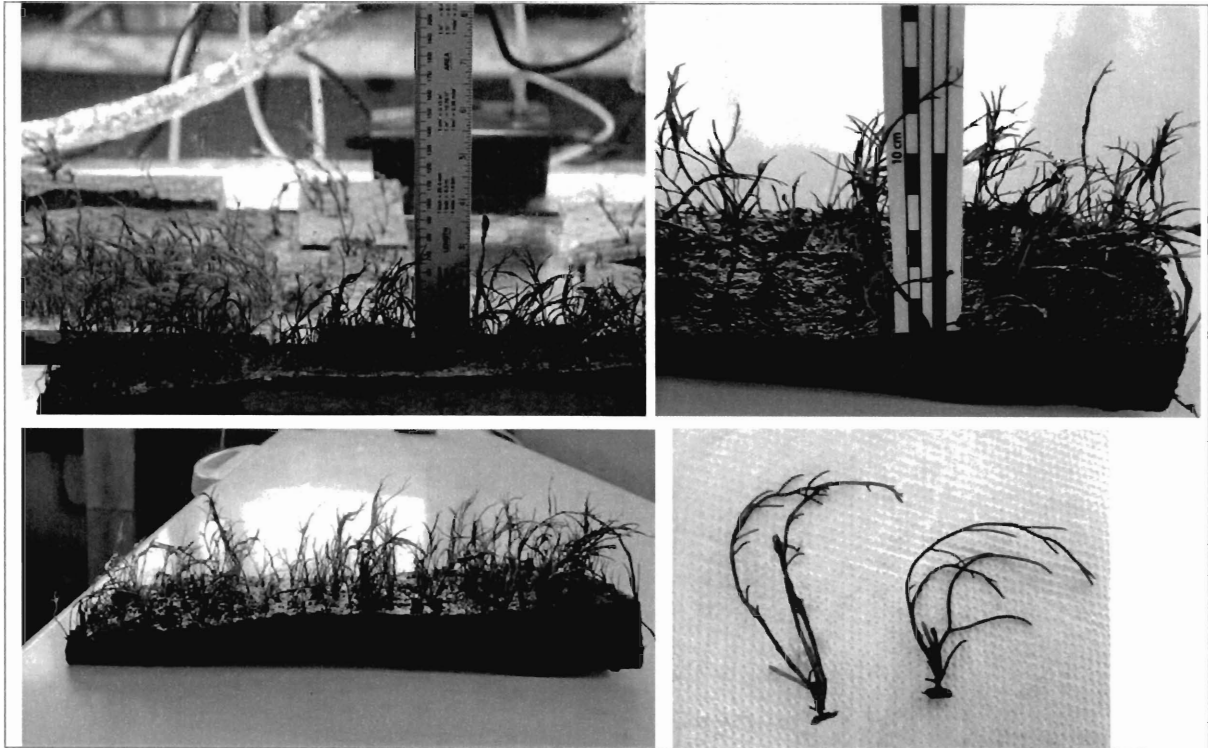


Fig. 3. Aspecte finale ale exemplarelor de *C. barbata* obținute în cultură (după 12 luni)