KVANTITATIVNE OSOBINE DINAMIKE RASTA ALGI Scenedesmus sp.

Dragojević, Sonja

Master's thesis / Diplomski rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:242009

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Sonja Dragojević

KVANTITATIVNE OSOBINE DINAMIKE RASTA ALGI *Scenedesmus sp.*

Diplomski rad

Osijek, 2012.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. MATEMATIČKA I RAČUNALNA BIOLOGIJA 2

1.2. CILJEVI MATEMATIČKE BIOLOGIJE 3

1.3. MATEMATIČKI MODELI 4

1.4. MALTHUSOV MODEL RASTA POPULACIJE 5

1.5. PRIMJENE EKSPONENCIJALNOG MODELA 8

1.6. KAPACITET OKOLIŠA 9

1.7. VERHULSTOV MODEL RASTA POPULACIJE 9

1.7.1. TUMAČENJE PARAMETARA LOGISTIČKOG MODELA 12

1.7.1.1. PARAMETAR r_0 12

1.7.1.2. PARAMETAR K 13

1.8. VAŽNOST PRIMJENJENOG MODELIRANJA ALGALNIH KULTURA 13

1.8.1. MODELNI ORGANIZMI 13

1.8.2. ALGALNE KULTURE 13

1.8.3. MODELI ALGALNIH KULTURA 14

2. CILJ RADA 16

3. MATERIJALI I METODE 17

3.1. KEMIKALIJE 17

3.2. PRIBOR I INSTRUMENTI 18

3.3. MODELNI ORGANIZMI 18

3.4. MONOKULTURA ALGA 19

3.4.1. TAKSONOMIJA ALGE *Scenedesmus sp* 19

3.4.2. BIOLOGIJA ALGI *Scenedesmus sp*. (MEYER, 1829) 20

3.4.3. UZGOJ MIKROALGALNE KULTURE 21

3.4.4. PRIPREMA MEDIJA MIKROALGALNE KULTURE 21

3.5. FOTOBIOREAKTOR 23

3.6. RAČUNALNI PROGRAM R 24

3.7. IZRAČUN STOPE RASTA POPULACIJE 24

3.8. PRILAGOĐAVANJE PODATAKA ČETIRI – PARAMETARSKOJ LOGISTIČKOJ FUNKCIJI 26

3.9. PROCJENA KAPACITETA OKOLIŠA 27

3.10. DIZAJN EKSPERIMENTA 27

4. REZULTATI 29

4.1. IZRADA MODELA RASTA POPULACIJE 29

4.2. MODEL RASTA ALGALNIH KULTURA PRI VALNOJ DULJINI 450 nm 29

4.3. MODEL RASTA ALGALNIH KULTURA PRI VALNOJ DULJINI 689 nm 31

4.4. MODEL RASTA ALGALNIH KULTURA PRI VALNOJ DULJINI 750 nm 32

4.5. IZRAČUN BIOMASE I PROCJENA KAPACITETA OKOLIŠA PRI 450 nm 34

4.6. IZRAČUN BIOMASE I PROCJENA KAPACITETA OKOLIŠA PRI 689 nm 35
4.7. IZRAČUN BIOMASE I PROCJENA KAPACITETA OKOLIŠA PRI 750 nm 36
4.8. MODEL RASTA POPULACIJE ALGI *Scenedesmus sp.* PRI MALIM EKSPERIMENTALNIM VOLUMENIMA 5 mL I 10 mL 37
4.9. MODEL RASTA POPULACIJE ALGI *Scenedesmus sp.* PRI VELIKIM EKSPERIMENTALNIM VOLUMENIMA 50 mL I 100 mL 38
5. RASPRAVA 40
6. ZAKLJUČCI 44
7. LITERATURA 45

1. UVOD

1. UVOD

Alge su vrlo raznolika skupina pretežno vodenih fotosintetskih organizama koji čine gotovo 50% fotosinteze koja se odvija na Zemlji. Također, imaju važnu ulogu u kružnom ciklusu ugljika pomažući ukloniti višak ugljičnog dioksida iz okoliša (Moroney, 2009).

Mikroalge smatraju se jedinim adekvatnim alternativnim izvorom biogoriva. Kao najperspektivniji obnovljivi izvor energije imaju potencijal u potpunosti zamijeniti dizelsko gorivo (Richardson, 2012). Velika potrošnja fosilnih goriva u kombinaciji s projekcijama potencijalnog manjka fosilnih goriva prema sredini 21. stoljeća, čine ih imperativom za razvoj alternativnih izvora energije koji su čisti, obnovljivi i ekološki najprihvatljiviji. Tome pridonose činjenice o globalnom zatopljenju i zagađenju okoliša (Melis i Happe, 2001).

Proizvodnja mikroalgi, osim za biogoriva može poslužiti i u druge svrhe. Neke od mogućnosti koje se trenutno razmatraju jesu:

1. Uklanjanje ugljičnog dioksida iz industrijskih ispušnih plinova algalnom biofiksacijom (Wang i sur. 2008), redukcija emisije stakleničkih plinova u pogonima za proizvodnju biogoriva (Directive 2003).
2. Obrada otpadnih voda uklanjanjem amonijaka, nitrata i fosfata koji pridonose rastu algi kao nutrijenti (Wang i sur. 2008).
3. Nakon ekstrakcije ulja preostala algalna biomasa može se preraditi u etanol, metan, stočnu hranu, koja se zatim koristi kao organsko gnojivo zbog njezina visokog N: P omjera (Wang i sur. 2008)
4. Uzimajući u obzir mogućnost uzgoja algalnih kultura u suboptimalnim uvjetima i njihove smanjene potrebe za hranjivim tvarima, mogu se uzgajati u područjima neprikladnim za poljoprivredne svrhe. Također, ne zauzimaju obradive površine, otpadne vode mogu se koristiti kao hranjivi medij, ne zahtijevajući korištenje pitke vode (Mata i sur. 2010).
5. Ovisno o mikroalgalnoj vrsti mogu se ekstrahirati mnogi spojevi, koji imaju korisne primjene u različitim industrijskim sektorima, uključujući i široki spektar kemikalija i ostalih produkata, kao što su masti, polinezasićene masne kiseline, ulja, prirodna bojila, šećeri, pigmenti, antioksidansi, visoko vrijedni bioaktivni spojevi, i druge kemikalije i biomase (Li i sur. 2008a; Li i sur. 2008b; Raja i sur. 2008).
6. Zbog različitih visokovrijednih bioloških derivata koje je moguće dobiti iz mikroalgalnih kultura moguće su mnoge komercijalne primjene. Mikroalge potencijalno mogu unijeti velike promjene u mnogobrojna biotehnološka područja uključujući proizvodnju

biogoriva, farmaceutsku industriju, akvakulture, te prevenciju onečišćenja (Rosenberg i sur. 2008; Wang i sur. 2008).

7. Mikroalge se vrlo često koriste kao čiste kulture u različitim znanstvenim istraživanjima (testovi toksičnosti, genetički inženjering, populacijska ekologija) (Rjafur i sur., 2012; Littler i sur., 2006; Diercks-Horn i sur., 2011).

S obzirom na različite primjene mikroalgalnih kultura i široku iskoristivost, vrlo je važno razumjeti i predvidjeti dinamiku rasta ovih modelnih organizama u kontroliranim uvjetima, što je moguće uz pomoć matematičkih modela.

1.1. MATEMATIČKA I RAČUNALNA BIOLOGIJA

Iako je matematika već dugo isprepletena s biološkim znanostima, eksplozivna sinergija biologije i matematike javlja se tek u novije doba (Cohen, 2004).

U posljednjih nekoliko desetljeća, matematika je postala raširena u biologiji, pojavljujući se u različitim varijantama: kao statistika u eksperimentalnom dizajnu, u bioinformatici, izradi modela u evoluciji, ekologiji i epidemiologiji itd. (May, 2004).

U biologiji je došlo do iznimno velikih promjena zbog prodora novih izvora podataka, pristupa super računalima, oslanjanja na kvantitativne istraživačke metode, te se sve više javlja potreba za izradom kvantitativnih i predikcijskih modela bioloških pojava. Istovremeno raste utjecaj matematičkih alata i matematičkog razmatranja u biologiji, pa se može očekivati dodatan utjecaj i preobrazba znanstvenog rada u biologiji tijekom sljedećih desetljeća. Ova preobrazba imat će snažne posljedice na sva područja temeljne i primijenjene biologije (Committee on Mathematical Sciences Research for DOE s Computational Biology, 2005). Stoga je značaj matematike u biologiji prvenstveno vidljiv u primjeni statistike te kvantificiranju bioloških pojava, a izrada matematičkih modela omogućuje nam predviđanja bioloških pojava (Hoppensteadt, 1995).

Veza između biologije i matematike temelji se na uzajamnim doprinosima: biologija generira složene zadatke, a matematika može predvidjeti načine razumijevanja istih (Edward i sur., 2010). Grane biologije koje koriste primijenjenu matematičku biologiju (Hoppensteadt, 1995) su:

- stanična organizacija,
- ekologija i ekosustavi,
- evolucija i bioraznolikost,
- organizacija genoma i ekspresija,

- rast i razvoj organizama i stanica,
- imunološki sustav, patogeni i obrana,
- integrativni pristupi funkcijama organizma i bolesti,
- molekularna struktura i funkcija,
- neurobiologija i ponašanje životinja,
- nove tehnologije i industrijske biotehnologije,
- biologija biljaka i poljoprivreda.

1.2. CILJEVI MATEMATIČKE BIOLOGIJE

Ciljevi matematičke biologije su matematički prikaz, obrada i modeliranje bioloških procesa. Pritom se koriste različite matematičke metode i alati koji imaju teorijsku i praktičnu primjenu u biološkim, biomedicinskim i biotehnološkim istraživanjima.

Biologija je kao znanost brzo razvijajuća, dinamična i podložna izmjenama, dok matematika predstavlja rigidnu, strogu i preciznu znanost čiji se zakoni ne mijenjaju više stotina godina.

Interakcije matematike i biologije mogu se podijeliti u tri kategorije:

1. Primjena već postojećih matematičkih metoda u biološkim problemima. Korištenje rutinskih matematičkih metoda utječe na matematiku samo kada biološki problemi zahtijevaju preciznije metode. Takva pitanja vode daljnjem razvoju matematičkih metoda.
2. U slučaju kada su postojeće matematičke metode neadekvatne, neophodan je razvoj novih matematičkih metoda unutar konvencionalnih okvira.
3. Trećoj kategoriji pripadaju temeljna pitanja iz biologije koja zahtijevaju potpuno nove načine kvantitativnog i analitičkog razmišljanja.

Uzimajući u obzir kompleksnost bioloških problema koji traže primjenu novih matematičkih metoda, neophodno je stvaranje posve novih područja matematike prije mogućeg uspješnog rješavanja temeljnih, a jednako tako i kompleksnih bioloških problema. Stoga će razvoj novih tehnologija te brza akumulacija bioloških informacija i podataka zatražiti primjenu klasične matematike, kao i stvaranje nove matematike (Tablica 1.) (Kar i Chakrabotryb, 2010)

Tablica 1. Matematika nastala iz bioloških problema (Cohen, 2004)

Subjekt	Referenca
Starosna struktura stabilnih populacija	Euler, 1760
Logistička jednadžba za ograničeni rast populacije	Verhulst, 1838
Proces grananja, izumiranje obiteljskih imena	Galton, 1889
Korelacija	Pearson, 1903
Markovljevi lanci, statistika jezika	Markov, 1906
Hardy–Weinbergova ravnoteža u populacijskoj genetici	Hardy, 1908; Weinberg, 1908
Analiza varijance,dizajn agrikulturalnih eksperimenata	Fisher, 1950
Dinamika interaktivnih vrsta	Lotka, 1925; Volterra, 1931
Natalitet i mortalitet	Yule, 1925; Kendall, 1948
Valna genetika	Fisher, 1937; Kolmogorov i sur., 1937
Teorija igara	von Neumann i Morgenstern, 1953
Distribucija za procjenu stope mutacije bakterija	Luria i Delbrueck, 1943
Morfogeneza	Turing, 1952
Difuzijska jednadžba za učestalost gena	Kimura, 1994
Cirkularni intervalni grafovi, fina struktura gena	Benzer, 1959
Granične funkcije nasumičnih grafova	Erdös i Rényi, 1960
Formula za uzorkovanje učestalosti halotipova	Ewens, 1972
Koalescentna genealogija populacija	Kingman, 1982

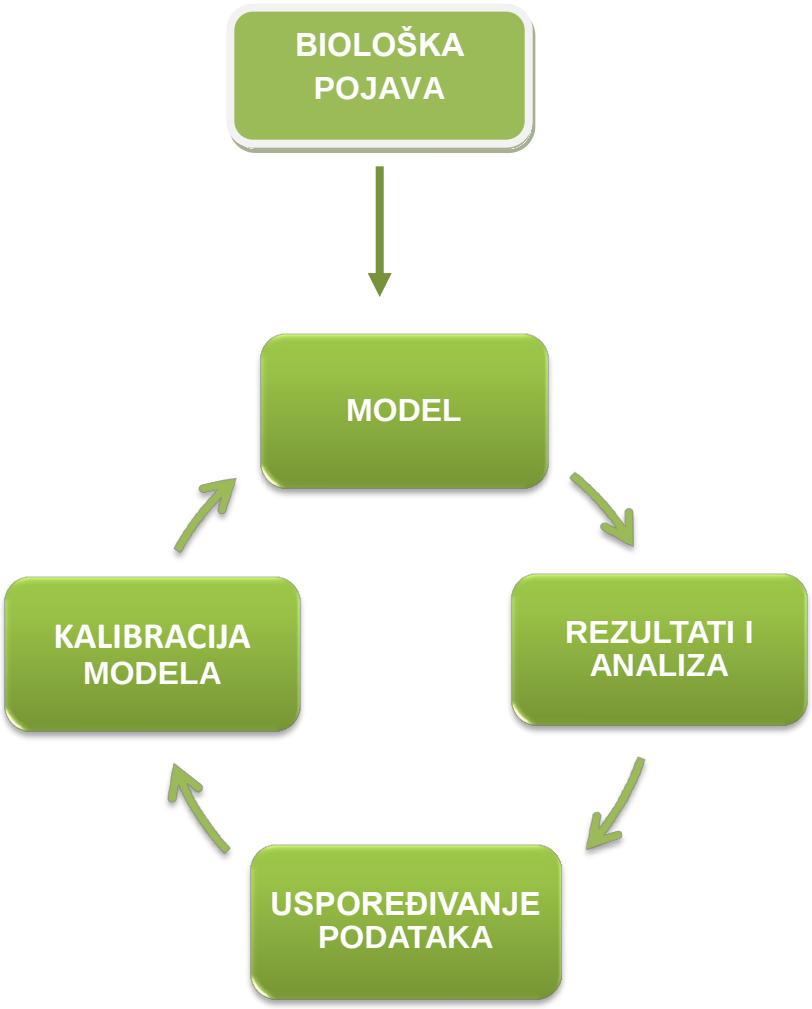
1.3. MATEMATIČKI MODELI

Matematički model analitički je izraz koji kvantificira i objašnjava određenu biološku pojavu ili promatrani biološki sustav (Thieme, 2003). Proces razvoja matematičkih modela Thieme je nazvao matematičko modeliranje (Slika 1).

Sustavi matematičkih modela mogu smanjiti potrebu za eksperimentiranjem na živim organizmima ili biološkim sustavima kada takva eksperimentiranja predstavljaju etičke, financijske ili logističke poteškoće. Matematička i računalna istraživanja su relativno jeftina, a veliki doprinosi su ostvarivi uz relativno mala ulaganja (Steer, 2010).

Prema podatcima kojima raspolažemo i željenom primjenom modela, matematičke modele možemo klasificirati u nekoliko kategorija (Bender, 2000):

a) Linearni i nelinearni
b) Deterministički i probabilistički (stohastički)
c) Statički i dinamični
d) Diskretni i kontinuirani

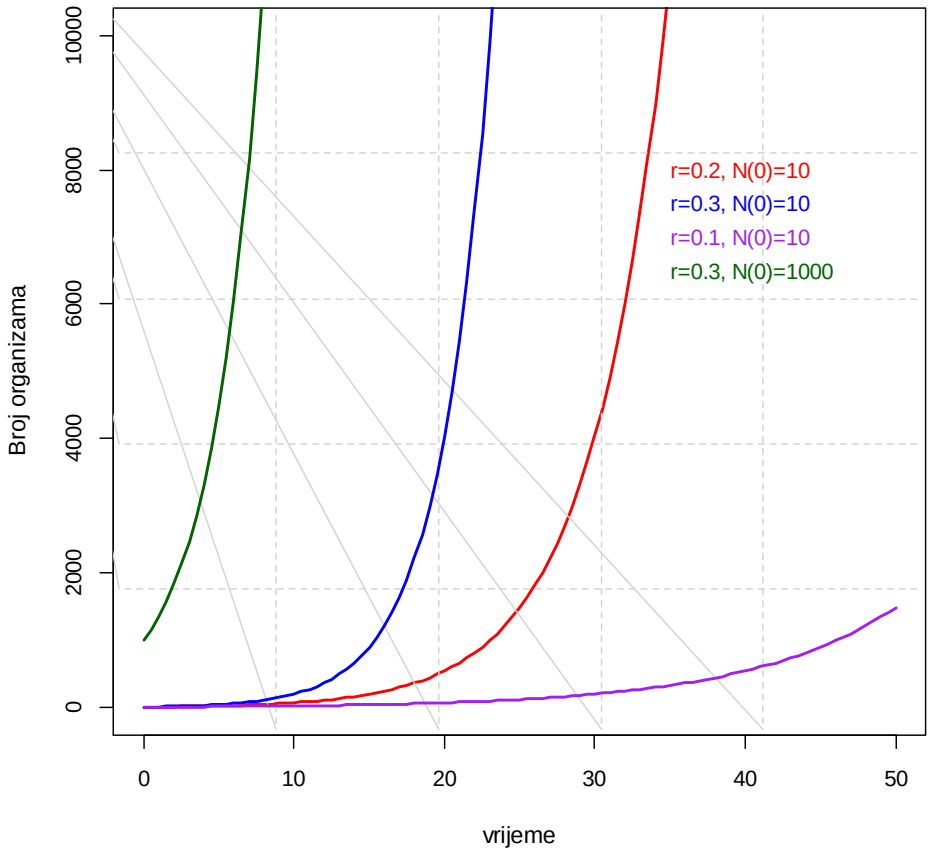


Slika 1. Shema izrade bioloških modela.

1.4. MALTHUSOV MODEL RASTA POPULACIJE

Malthusov model rasta populacije naziva se još i eksponencijalni model rasta populacije. Naziv je dobio po Thomasu Robertu Malthusu (1766-1834) koji ga je prvi opisao u svom radu „*Esej o principima populacije*“. Taj model postao je temelj za većinu budućih modela rasta populacije.

Malthus je formulirao relativno jednostavan model rasta populacije na temelju vlastitih zapažanja. Iznio je kako je rast populacije multiplikacijski, odnosno da populacije rastu prema geometrijskom nizu. Uzmimo u obzir da prosječna jedinka proizvodi više od jednog potomka tijekom života, tada će populacija rasti eksponencijalno s vremenom (Slika 2).



Slika 2. Projekcije Malthusovog modela rasta populacije pri različitim parametrima modela.

Malthusov model predstavlja primjer modela jedne varijable i jednog parametra. Varijabla je veličina od interesa koju promatramo i obično se s vremenom mijenja. Parametri su veličine koje su nam poznate i prije izrade modela. Često su obje veličine konstante, iako je moguće da se parametri tijekom vremena mijenjaju.

Dakle, bilo koja vrsta može se potencijalno povećati numerički prema geometrijskom nizu. Naprimjer, ako vrsta ima nepreklapajuće populacije (npr. jednogodišnje biljke), a svaki organizam stvara R potomaka, dakle, populacijski broj N u generacijama t = 0,1,2, ... jednak je:

$$N_1 = N_0 \times R \tag{1}$$

$$N_t = N_0 \times R^t \tag{2}$$

Gdje je:

N_1	broj jedinki u generaciji t_1 (prva generacija potomaka)
N_0	broj jedinki u generaciji t_0
R	broj potomaka koje su dale odrasle jedinke (N)
t	vrijeme

Kada je *t* (generacijsko vrijeme) velik, onda je to jednadžba (3) kojoj se može aproksimirati eksponencijalna funkcija:

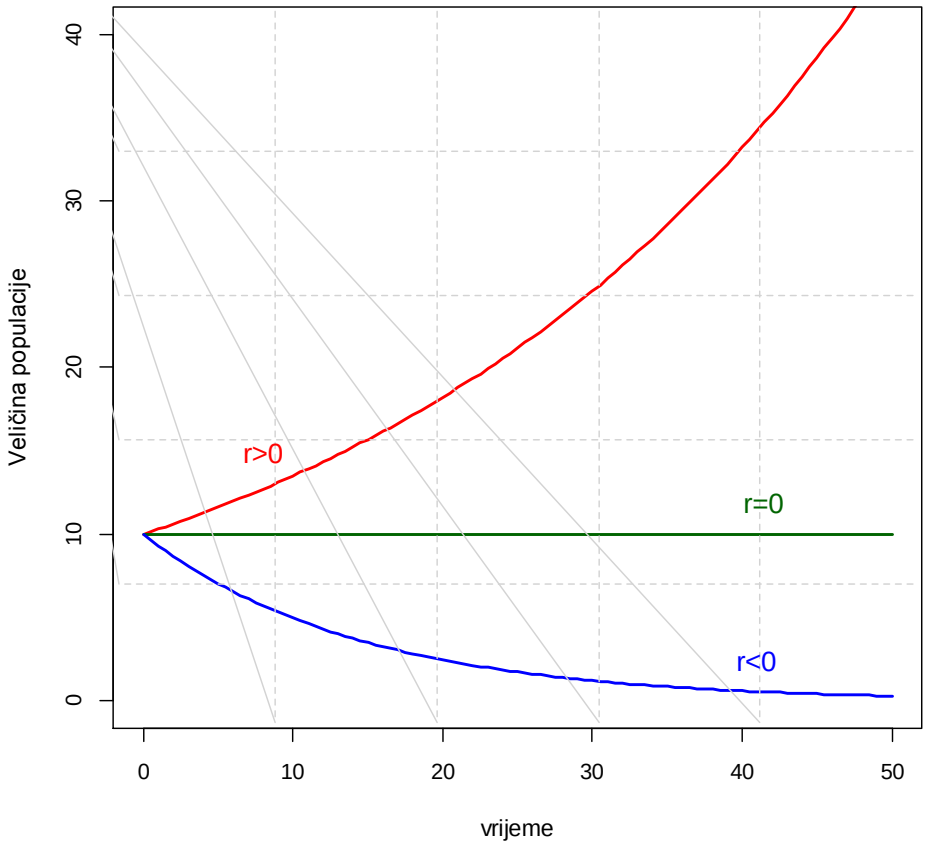
$$N_t = N_0 \times \exp(r \times t) = N_0 \times e^{rt} \quad (3)$$

Gdje je:

N_t	broj jedinki u generaciji *t*
N_0	broj odraslih jedinki koje potencijalno mogu dati potomke
e	aproksimacija eksponencijalne funkcije
r	stopa rasta populacije

Stopa rasta populacije *r* u Malthusovom modelu može biti pozitivna ili negativna (Slika 3).

1. Populacija se eksponencijalno smanjuje (r<0), kada je stopa rasta populacije manja od 0
2. Populacija eksponencijalno raste (r> 0), kada je stopa rasta populacije veća od 0
3. Populacija se ne mijenja (r = 0), kada je stopa rasta populacije jednaka 0



Slika 3. Mogući ishodi Malthusovog modela.

Parametar *r* u literaturi se susreće pod različitim nazivima:

- Malthusov parametar
- Intrinzična stopa rasta
- Trenutna stopa prirodnog prirasta
- Stopa rasta populacije

Pretpostavke eksponencijalnog modela:

1. Kontinuirana reprodukcija (npr. nema sezone parenja)
2. Svi organizmi su identični (npr. dobna struktura)
3. Okoliš je konstantan u prostoru i vremenu (npr. resursi su neograničeni)

Međutim, eksponencijalni model je robustan, te daje razumnu točnost čak i ako ti uvjeti nisu ispunjeni. Organizmi se mogu razlikovati u starosnim strukturama, preživljavanju i mortalitetu. No uzimajući u obzir veliku brojnost nekih populacija za njihove stope nataliteta i mortaliteta možemo reći da su podjednake.

Parametar *r* u eksponencijalnom modelu može se tumačiti kao razlika između stope nataliteta (reprodukcije) i stope mortaliteta prema jednadžbi (4):

$$\frac{dN}{dt} = (b - m)N = rN \tag{4}$$

Gdje je:

b	stopa nataliteta
m	stopa mortaliteta
r	intrinzična stopa rasta populacije
N	broj jedinki
t	generacijsko vrijeme

Natalitet je broj potomaka organizama proizvedenih po jednoj jedinki u populaciji po jedinici vremena. Mortalitet je vjerojatnost umiranja svake jedinke. Stopa rasta populacije (*r*) jednaka je natalitetu (*b*) minus mortalitetu (*m*).

1.5. PRIMJENE EKSPONENCIJALNOG MODELA

Iako se Malthusov model rasta za neke populacije čini neadekvatnim, u nekim granama biologije ipak pronalazi svoje adekvatne primjene (Sharov, 1996):

- mikrobiologija - omogućava izračun stope rasta bakterija,
- konzervacijska biologija - modeliranje obnavljanja narušenih populacija,

- uzgoj kukaca - predviđanje prinosa,
- praćenje porasta broja jedinki alohtonih vrsta (primjerice biljke ili kukci alohtonih staništa),
- ribarstvo – predviđanja dinamike rasta ribljih populacija.

1.6. KAPACITET OKOLIŠA

S biološke točke gledišta, nedostatak Malthusovog modela ideja je o kapacitetu okoliša. Kapacitet okoliša neke biološke vrste je maksimalna veličina populacije koju okoliš može podnijeti neodređeno vrijeme, s obzirom na potrebne resurse: hranu, stanište, interspecijsku kompeticiju itd. U populacijskoj biologiji kapacitet okoliša (K) se definira kao okoliš pod maksimalnim opterećenjem.

Kako populacija raste, smanjuje se kapacitet okoliša za populaciju, dakle smanjuje se dostupnost hrane, otpadne tvari mogu se akumulirati, a stope nataliteta imaju tendenciju smanjenja dok se stope mortaliteta povećavaju. Iz tih razloga matematički model dinamike rasta populacije trebao bi uključivati kapacitet okoliša.

1.7. VERHULSTOV MODEL RASTA POPULACIJE

Verhulstov model rasta populacije naziva se još i logističkim modelom. Model je deterministički, što znači da ne uključuje nikakve stohastičke komponente (vjerojatnost).

Logistička jednadžba izražava ograničenje ili usporavanje rasta populacije u skladu s porastom veličine populacije, predviđajući da će na kraju doći do stabilne točke koja je maksimalno održiva s obzirom na dostupnost resursa. Pod tim podrazumijevamo pristup suncu, vodi, hrani (nutrijentima), pa čak i zaklonjenosti od predatora i parazita. Međutim, realno stanje u okolišu je daleko složenije.

S obzirom na nestabilnost nekog sustava (dostupnost resursa) za očekivati je da će dinamika rasta neke populacije varirati. To je jedan od razloga zbog čega se Malthusov model rasta populacije smatra teško primjenjivim u realnom okolišu.

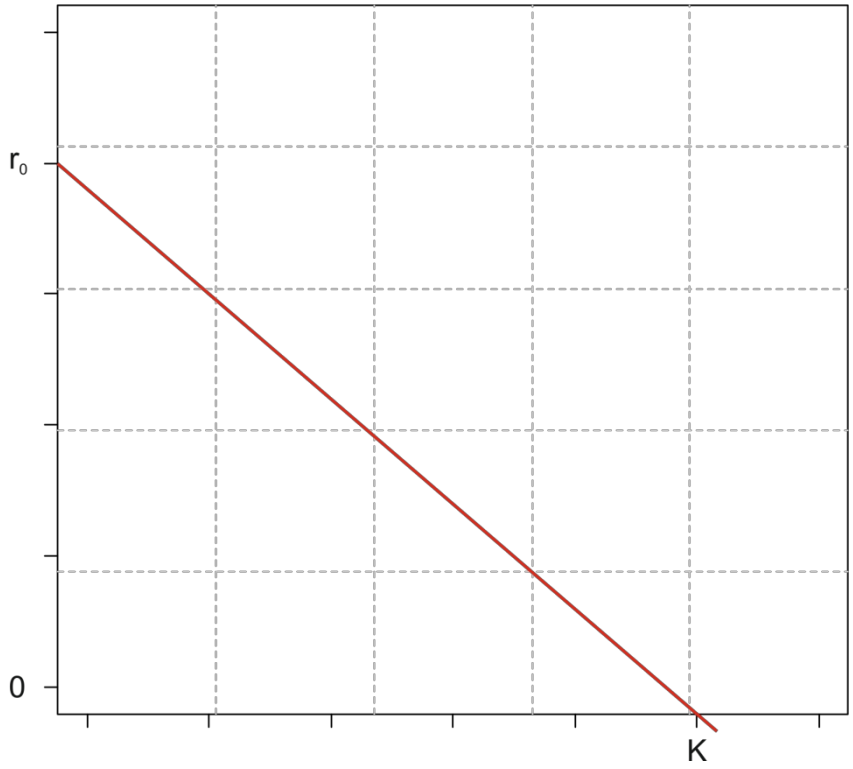
Logistički model razvijen je od strane belgijskog matematičara Pierra Verhulsta (1838). Logistički rast pretpostavlja da sustav raste eksponencijalno do točke infleksije, pritom se stopa rasta usporava do kapaciteta okoliša (K). Iz takvog kretanja dinamike populacije dobivamo karakterističan S-oblik krivulje (Stone, 1980).

Verhulstov model sugerira da stopa rasta populacije može biti ograničena, odnosno može ovisiti o gustoći u izrazu (5):

$$r = r_0 \times \left(1 - \frac{N}{K}\right) \tag{5}$$

Gdje je:

r	stopa rasta populacije
r_0	maksimalna stopa rasta populacije
N	broj jedinki
K	kapacitet okoliša



Slika 4. Grafički prikaz stope rasta populacije kada je natalitet maksimalan.

Pri niskoj gustoći naseljenosti (N << 0), natalitet je maksimalan i raste do r_0 (što je ujedno i maksimalna stopa rasta neke populacije). Parametar r_0 može se protumačiti kao stopa rasta populacije u nedostatku intraspecijske kompeticije.

Stopa rasta populacije (r) opada s brojem jedinki (N), i doseže 0 kada N = K, odnosno kada je broj jedinki dosegnuo kapacitet okoliša. Parametar K gornja je granica rasta populacije odnosno kapacitet okoliša. To se obično tumači kao količina resursa izraženih po broju organizama koje ti resursi mogu podnijeti. Ako populacija premašuje kapacitet okoliša K, onda stopa rasta populacije postaje negativna i dolazi do pada broja jedinki.

Dinamika populacije prema Verhulstu opisana je diferencijalnom jednadžbom (6):

$$\frac{dN}{dt} = rN = r_0 N\left(1 - \frac{N}{K}\right) \tag{6}$$

Gdje je:

r stopa rasta populacije

N broj jedinki

K kapacitet okoliša

koja ima sljedeće rješenje (7):

$$\frac{dN}{dt} = \frac{K}{1 + \left(\frac{K - N_0}{N_0}\right)e^{-rt}} \tag{7}$$

Gdje je:

N_t	broj jedinki u vremenu *t*
N_0	broj jedinki u vremenu 0 (početno stanje)
K	kapacitet okoliša
r_0	maksimalna stopa rasta
t	vrijeme

Tri su moguća ishoda modela:

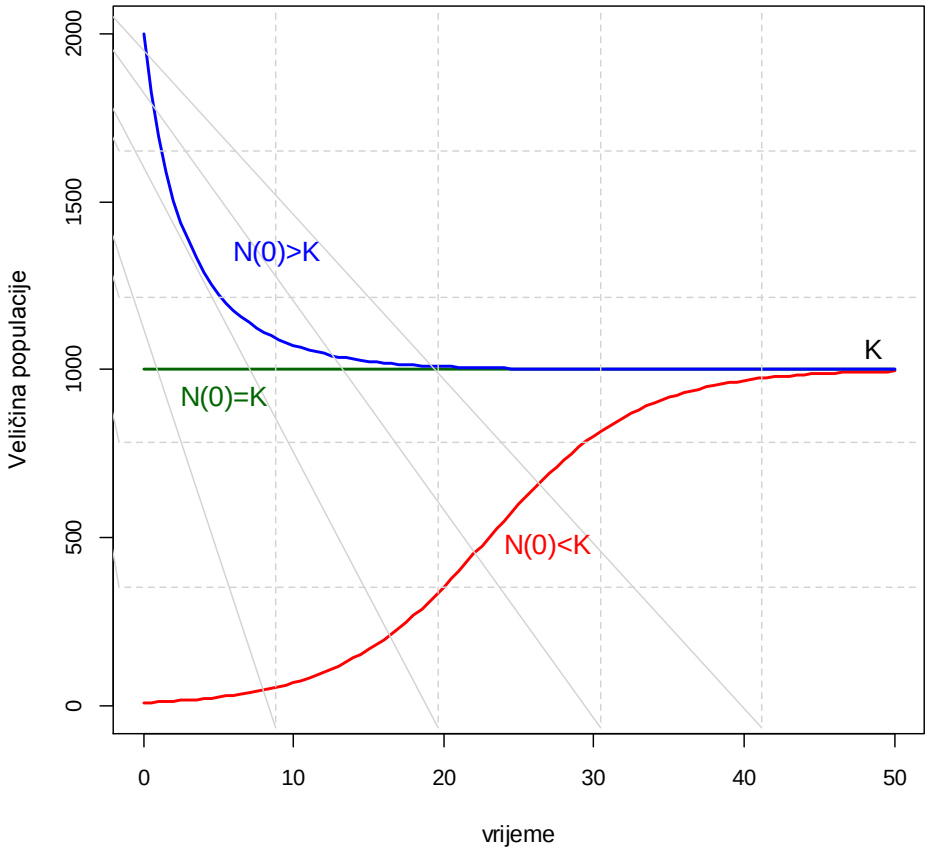
1. Populacija raste i doseže gornju granicu, odnosno kapacitet okoliša kada je $N_0<K$,
2. Populacija se smanjuje i dostiže gornju granicu, odnosno kapacitet okoliša kada je $N_0 >K$,
3. Populacija se ne mijenja kada je $N_0 = K$ ili je $N_0=0$.

Logistički model ima dva ravnotežna stanja:

1) $N^* = 0$
2) $N^* = K^*$

Prvo je ravnotežno stanje nestabilno, jer bi malo odstupanje od ove ravnoteže dovelo do rasta populacije. Drugo ravnotežno stanje je stabilno jer i nakon malih promjena populacija se vraća u stanje ravnoteže. Logistički model uzima u obzir dva ekološka procesa: reprodukciju i intraspecijsku kompeticiju. Oba procesa ovise o veličini populacije

(ili gustoći populacije). Stopa oba modela odgovara zakonu ovisnosti gustoće s koeficijentima: r_0 za reprodukciju i r_0/K za intraspecijsku kompeticiju.



Slika 5. Grafički prikaz dinamike rasta populacije koje su moguće prema Verhulstovom modelu.

1.7.1. Tumačenje parametara logističkog modela

1.7.1.1. Parametar r_0

Taj parametar relativno je lako interpretirati: to je najveća moguća stopa rasta populacije, što je neto učinak nataliteta (reprodukcije) i mortaliteta (isključujući mortalitet ovisan o gustoći populacije). Populacije čije je vrijeme reprodukcije relativno sporo (npr. slonovi) imaju nizak r_0, dok primjerice populacije čije je vrijeme reprodukcije relativno brzo (npr. većina kukaca) ima visok r_0.

Problem logističkog modela taj je što parametar r_0 kontrolira ne samo stopu rasta populacije, nego jednako tako i opadanje broja jedinki u populaciji (na N> K). Nije logično da organizmi s niskom stopom reprodukcije trebaju imati isto tako nisku stopu mortaliteta. Ako je reprodukcija spora, a mortalitet visok, tada logistički model više nije primjenjiv (Sharov, 1996).

1.7.1.2. Parametar K

Parametar K ima biološko značenje za populacije s jakim interakcijama među jedinkama koje kontroliraju svoju reprodukciju. Naprimjer, uzmimo u obzir glodavce čija je reprodukcija kontrolirana socijalnom strukturom unutar populacije, teritorijalnost ptica te kompetencija biljaka za prostor i svjetlost.

Međutim, parametar *K* nema jasno značenje za organizme čija populacijska dinamika ovisi o ravnoteži natalitetnih i mortalitetnih procesa (npr. većina populacija kukaca). U tom slučaju ravnoteža gustoće populacije ne odgovara količini resursa, prema tome izraz kapacitet okoliša nije odgovarajući. Naprimjer, ravnotežna gustoća može ovisiti o mortalitetu uzrokovanom predacijskim pritiskom (Sharov, 1996).

1.8. VAŽNOST PRIMJENJENOG MODELIRANJA ALGALNIH KULTURA

1.8.1. Modelni organizmi

Prvi koraci istraživanja na području modelnih organizama započeli su u 19. stoljeću istraživanjima Charlesa Darwina i Gregora Mendela i njihovim radovima na prirodnoj selekciji i genetskom nasljeđivanju. Ovi rani radovi u pronalaženju standarda za usporedbu organizama nastavili su se u 20. stoljeću, kada je započet laboratorijski uzgoj modelnih organizama.

Modelni organizmi vrste su koje su široko proučavane *in vivo*, te je njihovo održavanje, uzgoj u laboratorijskim uvjetima i manipuliranje prilikom izvođenja eksperimenta jednostavno. Modelni organizmi pružaju informacije koje mogu biti primjenjive i na druge vrste (Rader, 2004). Kao modelni organizmi koriste se mikroorganizmi (bakterije, fitoplankton, zooplankton) te biljke i životinje.

1.8.2. Algalne kulture

Algalne kulture oblik su akvakulture koji se odnosi na uzgoj različitih vrsta algi (Slika 6). Većina algi koje se uzgajaju u laboratoriju i koriste u istraživanjima pripadaju kategoriji mikroalgi, odnosno fitoplanktonu. Za istraživanja su pogodne i slatkovodne i morske vrste. Lako se održavaju u laboratorijskim uvjetima, pogodne su za mnoga istraživanja. Više od 40.000 različitih vrsta mikroalgi identificirano je do sada na temelju mikroskopskih i molekularnih metoda (Christi, 2007; Brennan i Owende, 2010; Godhe i sur., 2001)



a) (web 1) b) (web 2) c) (web 3)

Slika 6. Uzgoj algalnih kultura: a) otvoreni sustavi; b) i c) laboratorijski uzgoj

Neke od najčešće korištenih mikroalglnih kultura u znanstvenim istraživanjima su *Chlorella sp., Scenedesmus sp., Selenastrum sp., Chlamydomonas sp.* itd.

Osim algalnih kultura modeliraju se i druge akvakulture primjerice uzgoj riba i školjkaša. Kako alge čine temelj hranidbenog lanca o njihovoj će stopi rasta ovisiti cijela kaskada hranidbene mreže, stoga se njihova dinamika rasta tumači i modelira već dugi niz godina kroz brojna istraživanja (Caswell i Neubert, 1998; Edward i Bees, 2001; Gatto, 1991).

Kroz toksikološka, molekularno biološka, biokemijska, biotehnološka, genetička istraživanja i ekološko matematička modeliranja izrađeno je na stotine modela rasta mikroalgalnih populacija. To upućuje na važnost primjene ovih modela u opisivanju dinamike rasta mikroalgi.

1.8.3. Modeli algalnih kultura

Scenedesmus sp. kozmopolitska je, fitoplanktonska, slatkovodna mikroalgalna vrsta koja je čest predmet istraživanja posljednjih nekoliko godina (Sancho i sur., 1997; Yin Hu i sur., 2012). Najčešće je opisivana dinamika rasta mikroalgalne kulture uvjetovana intenzitetom svjetlosti, temperaturnim intervalima, nutrijentima fosforom i dušikom ili teškim metalima (Martinez i sur., 1997).

Prema autorima Xin i Yu-ping (2010), rast mikroalgalne kulture *Scenedesmus sp.* opisan je logističkom krivuljom. Limitirajući faktor u njihovom istraživanju bila je temperatura. Kulture su uzgajane u četiri replike, pri četiri različite temperature 10 °C, 20 °C, 25 °C, 30°C. Rezultati su pokazali da nema statistički značajne razlike među stopama rasta kultura pri različitim uzgojnim temperaturama, iako su samo pri temperaturama 10 °C i 20 °C krivulje rasta opisane logističkom krivuljom, dok pri ostalim temperaturama kulture algi nisu rasle logistički.

U drugim istraživanjima (Li i sur., 2010a) korištenjem različitih koncentracija dušika i fosfora opisane su dinamike rasta mikroalgalnih kultura *Scenedemus sp*., te dobiveni rezultati upućuju na logističku krivulju rasta populacije koja se u odnosu na koncentracije nutrijenata (dušika i fosfora) razlikuje uglavnom u stacionarnim fazama rasta.

Do sada u literaturi ni u jednom radu nije opisan učinak volumena fotobioreaktora na dinamiku rasta mikroalgalne populacije.

2. CILJ RADA

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada jest :

1. Matematički opisati rast populacije algi *Scenedesmus sp*., te odrediti relativnu stopu rasta organizama (*r*) i kapacitet okoliša (*K*) mikroalgane kulture uzgajane u kontroliranim uvjetima fotobioreaktora za volumene 5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL.
2. Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka izraditi determinacijsko predikcijski matematički model rasta populacije alga *Scenedesmus sp*.
3. Ispitati utječe li volumen fotobioreaktora na rast i dinamiku rasta populacije algi *Scenedesmus sp*.

3. MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3.1. KEMIKALIJE

Za pripremu medija i održavanje monokulture algi *Scenedesmus sp.* korištene su sljedeće kemikalije:

- natrijev nitrat, $NaNO_3$
- kalcijev klorid dihidrat, $CaCl_2$ x $2H_2O$
- magnezijev sulfat heptahidrat, $MgSO_4$x $7H_2O$
- dikalijev hidrogen fosfat trihidrat, K_2HPO_4 x $3H_2O$
- kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4
- natrijev klorid, NaCl
- dinatrijev etilen diamin tetraacetat, Na_2EDTA
- željezov triklorid heksahidrat, $FeCl_3$x $6H_2O$
- manganov (II) klorid tetrahidrat, $MnCl_2$x $4H_2O$
- cinkov klorid, $ZnCl_2$
- kobaltov (II) klorid heksahidrat, $CoCl_2$ x $6H_2O$
- natrijev molibdat dihidrat,Na_2MoO_4 x$2H_2O$

Koncentracija stanica u fitoplanktonskim monokulturama općenito je veća od onih u prirodi te se iz tog razloga priprema medij obogaćen hranjivim tvarima (mikronutrijentima i makronutrijetnima). Medij (podloga) pripremljen je prema modificiranom receptu 3NBBM+V (*Bold Basal Medium with 3 fold Nitrogen and Vitamins; modified*) bez vitamina B (*Culture Collection of Algae and Protozoa*) na sljedeći način:

Pripremljene su stock otopine iz kojih je izrađena gotova otopina medija.

Stock otopine u g po 1000 mL vode	**volumen za 1000 mL gotovog medija**
1. 25.0 g $NaNO_3$	30.0 mL
2. 2.5 g $CaCl_2$ x $2H_2O$	10.0 mL
3. 7.5 g $MgSO_4$ x $7H_2O$	10.0 mL
4. 7.5 g K_2HPO_4 x $3H_2O$	10.0 mL
5. 17.5 g KH_2PO_4	10.0 mL
6. 2.5 g NaCl	10.0 mL
7. otopina elemenata u tragovima*	6.0 mL

* Dodano je u 1000 ml destilirane vode 0,75 g Na_2EDTA i minerala točno sljedećim redoslijedom:

7.1.	$FeCl_3x\ 6H_2O$	97.0 mg
7.2.	$MnCl_2x\ 4H_2O$	41.0 mg
7.3.	$ZnCl_2$	5.0 mg
7.4.	$CoCl_2x\ 6H_2O$	2.0 mg
7.5.	$Na_2MoO_4x\ 2H_2O$	4.0 mg

Gotov medij čuvan je u hladnjaku pri temperaturi od 4 ℃.

3.2. PRIBOR I INSTRUMENTI

Kroz pripremu ovog rada i izvođenje eksperimenta korišteni su sljedeći pribor i instrumenti:

- standardno stakleno laboratorijsko posuđe
- plastične boce, 1L
- podesive mikropipete, *Eppendorf*
- mikroskop, *Leica*
- hladnjak, +4℃
- autoklav, *Melag*
- CO_2 inkubator*, Binder CB*
- električna rotacijsko vibracijska mješalica, *Vortex*
- spektrofotometar, *UV-visible 1601 Shimadzu*
- špiritni plamenik
- mikrokivete
- pH –metar*, MettlerToledo*
- mjerač osvjetljenosti, luxometar
- fluorescentna žarulja, *Osram*
- vaga, *Sartorius*

3.3. MODELNI ORGANIZMI

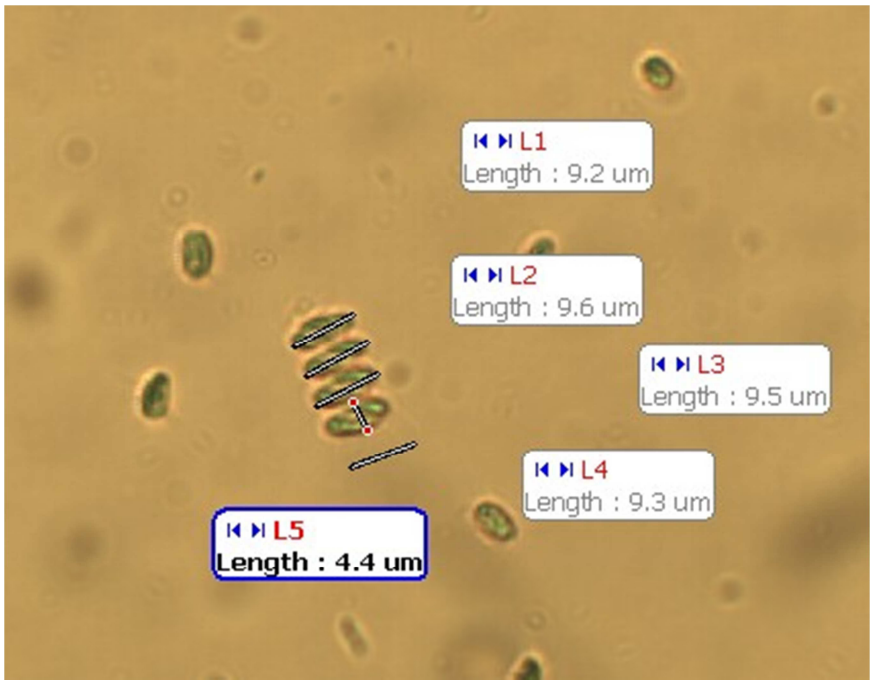
U ovom radu kao modelni organizam korištena je čista kultura algi *Scenedesmus sp.* Rod *Scenedesmus* je često korišten kao čista kultura u mnogim znanstvenim istraživanjima jer

je lako održiv u laboratorijskim uvjetima, morfologija je dobro poznata, kao i fiziologija, biokemija i genetika organizma. Kultura je dobivena iz algalne zbirke „Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju“, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

3.4. MONOKULTURA ALGA

3.4.1. Sistematika alge *Scenedesmus sp.*

Carstvo:	Plantae
Koljeno:	Chlorophyta
Razred:	Chlorophyceae
Red:	Chlorococcales
Porodica:	Scenedesmaceae
Podporodica:	Scenedesmoidea
Rod:	Scenedesmus
Vrsta:	*Scenedesmus sp.* (Meyen, 1829)



Slika 7. *Scenedesmus sp.*(fotografirala: Sonja Dragojević).

3.4.2. Biologija algi *Scenedesmus sp.* (Meyer, 1829)

Alga *Scenedesmus sp*. građena je kao cenobij, što je jednostavan kolonijalni oblik jednostaničnih algi u kojemu još uvijek nije došlo do specijalizacije i diferencijacije. Stanice su povezane zajednički izlučenom galertom ili zajedničkom staničnom stijenkom koja se sastoji od stanica poredanih u ravninu. Stanice su valjkaste, ali mogu biti i polumjesečastog ili jajolikog oblika. Obično su na kraju svake stanice dvije duge izrasline do 200 µm koje u dužini vire s vanjskih kutova, dok druge stanice mogu imati dodatne izrasline u obliku bodlji. Svaka stanica sadrži jedan parijetalni, pločasti kloroplast s jednim pirenoidom. Scenedesmus pripada razredu zelenih algi zbog dominantnosti pigmenata klorofila a i klorofila b. Kolonije najčešće imaju dvije ili četiri stanice, ali mogu imati 8, 16, 32, a rijetko ili povremeno su jednostanične.

Nespolno se razmnožavaju autosporama. Scenedesmus čini dio fitoplanktona uglavnom u eutrofnim slatkovodnim ribnjacima i jezerima, rijetko u bočatim vodama, a raširen je širom svijeta u svim klimatskim uvjetima. Opisano je više od stotinu vrsta iz roda Scenedesmus, a razlikuju se po broju i rasporedu stanica te izraslinama na galerti.

Sve ove karakteristike čine ga vrlo čestim modelnim organizmom u istraživanju različitih bioloških problema.



Slika 8. Morfološka raznolikost unutar roda *Scenedesmus.* (web 4).

3.4.3. Uzgoj mikroalgalne kulture

Za pravilan uzgoj mikroalgalnih kultura potrebno je osigurati nekoliko uvjeta koji su jednako važni:

- Temperatura
  Kultura algi, održavali su se u klimatiziranoj prostoriji na temperaturi od 25 ± 2 ℃
- Intenzitet svjetlosti
  Svjetlo je najvažniji faktor za razvoj fotosintetskih algi kako u *in-vitro* tako i *in-vivo* uvjetima. Na rast algi utječu valne duljine emitirane svjetlosti, gustoća toka i trajanje izloženosti svjetlu. Iz tih razloga kultura je održavana na kontinuiranom intenzitetu svjetla 3000 - 4000 luxa, fluorescentnim cijevima hladne bijele svjetlosti na udaljenosti od 25 cm. Kulture su maksimalno izlagane fotonskom unosu u omjeru svjetlo: tama – 24:0 sata.
- pH
  pH kultura održavan je u rasponu od 6,8-7,0. To je najpogodniji pH interval za održavanje slatkovodnih kultura algi.
- Hranjivi medij
  Hranjivi medij bitan je segment za održavanje mikroalgalnih kultura jer je obogaćen mikronutrijentima i makronutrijentima (prema ranije navedenom receptu) koji omogućavajući normalan rast algi.

3.4.4. Priprema medija mikroalgalne kulture

1. Sterilizacija
   Za pravilnu proizvodnju algi u mikroalgalnoj monokulturi, bilo je potrebno osigurati sterilne uvjete.
   Pripremljeni medij u plastičnim bocama volumena 1 L s navojem i čepom te staklene posude koje su korištene kao dijelovi fotobioreaktora su sterilizirane u autoklavu. Sterilizacija je vršena pri temperaturi od 120℃ i tlaku od 1,5 bara kroz 40 minuta. Staklene posude su prilikom sterilizacije oblagane papirom kako bi se prilikom manipulacije smanjila mogućnost kontaminacije.

Tim postupkom se uklanjaju štetni organizmi, odnosno druge vrste alga, zooplanktonski fitofagi, bakterije ili bakterijske spore prisutne u vodi koje mogu činiti osnovu za razvoj neželjenih bolesti (Loosanoff i Davis, 1963).

2. Inokulacija

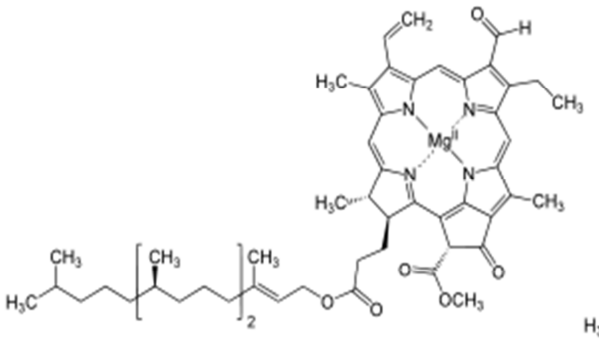
Nove kulture, odnosno eksperimentalni volumeni su inokulirani iz čistog matičnog algalnog soja u prethodno sterilizirane staklene posude fotobioreaktora. Taj postupak je vršen unutar inkubatora kako bi se izbjegla kontaminacija.

3. Mikroskopiranje i utvrđivanje vrste

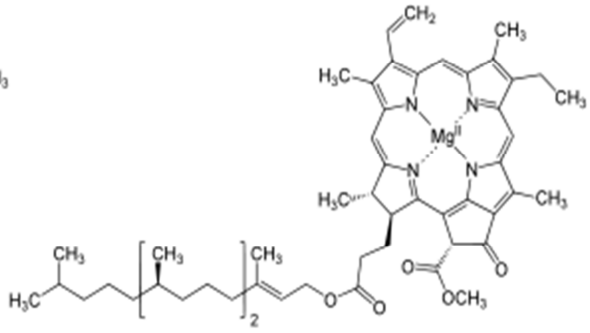
Mikroskopskim pregledom uzorka matične mirkoalgalne kulture utvrđen je rod algalne vrste uz pomoć ključa za determinaciju.

4. Spektrofotometrijsko određivanje biomase

Koncentracija biomase, odnosno prirast algi i njihove biomase, praćena je svaka 24 sata. Spektrofotometrijski je mjerena optička gustoća pigmenata u algi *Scenedesmus sp.* na valnim duljinama: 450 nm, 680 nm, 750 nm. Pri valnoj duljini 450 nm mjeren je sadržaj klorofila b (Pevalek – Kozlina, 2003) (Slika 9),a pri 680 nm mjeren je sadržaj klorofila a (Blanken i Hoff, 1983) (Slika 10). Količina klorofila a i b pokazatelj je biomase vodenog tijela. Van vidljivog spektra u infracrvenom području pri valnoj dulji 750 nm mjeren je cjelokupni pigmentni sadržaj mikroalgalne kulture (Griffiths i sur., 2011), jer je poznato kako pigmentni sadržaji variraju sa starenjem kulture i promjenom okolišnih uvjeta (Nicholls i Dillon 1978; Healey 1975).



Slika 9. Strukturna formula klorofila b (web 5).



Slika 10. Strukturna formula klorofila a (web 6).

5. Protresanje kulture

   Kulture su potresane električno vibracijsko rotacijskom mješalicom dva puta dnevno kako bi se kultura aerirala. Osim aeracije važnost potresanja je i u sprječavanju prianjanja stanica algi uz stjenke fotobioreaktora.

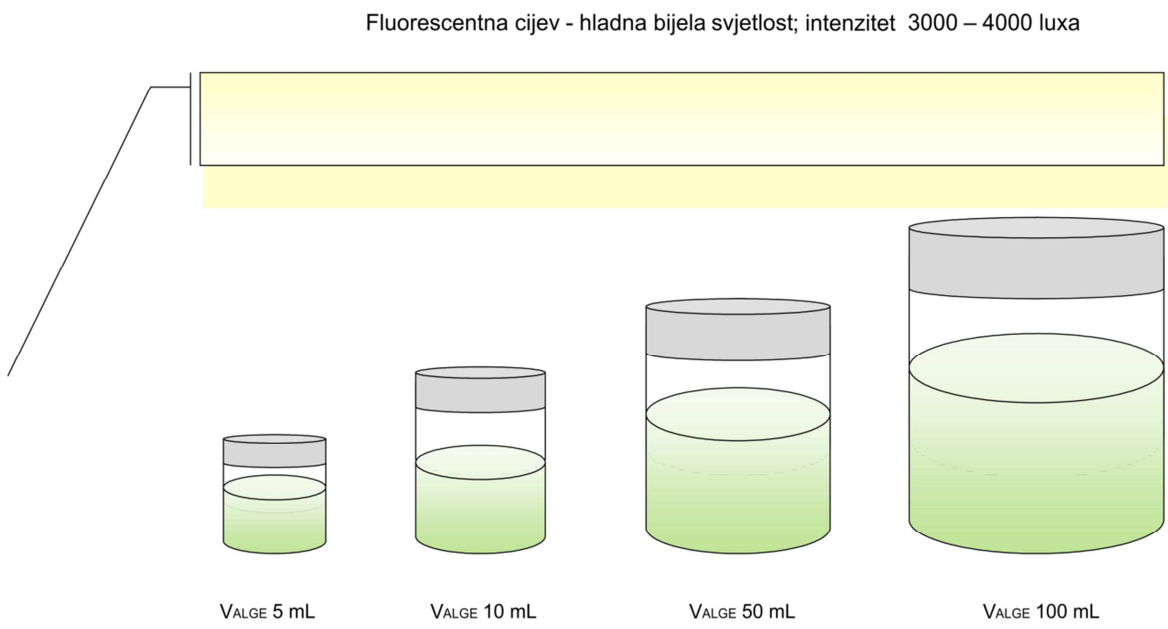
3.5. FOTOBIOREAKTOR

Za potrebe izvođenja eksperimenta sastavljen je fotobioreaktor (Slika 11). Fotobioreaktori fleksibilni su (podešavanje željenih uvjeta) zatvoreni sustavi koji se mogu optimizirati prema biološkim i fiziološkim karakteristikama algalne vrste koja se uzgaja. U fotobioreaktoru izravna izmjena plinova i zagađivača (npr. mikroorganizmi, prašina) između uzgajanih stanica i atmosfere je ograničena ili nije moguća zbog stijeni reaktora (Mata i sur., 2009). Jedan od najvažnijih faktora koji osigurava normalan rast algalnih kultura je svjetlost. Izvor svjetlosti u fotobiorekatoru osigurava fotonski unos energije iz okoliša (Tredici, 1999). Veliki dio svjetlosti ne dospijeva izravno na površinu kulture stoga stjenke fotobioreaktora moraju biti transparentne (Mata i sur., 2009).
Postavljena su četiri različita eksperimentalna volumena od 5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL u četiri replike. Staklene posude moraju biti prikladnog volumena, odnosno omjer eksperimentalnog volumena algi i volumen posude mora biti 1:2,5 (ER – EPA, 2010) (Tablica 2).

Tablica 2. Omjer volumena algi, zraka i posuda u eksperimentu.

V_{algi}	V_{zraka}	$V_{(alge+zrak)\ posude}$
5 mL	7,5 mL	12,5 mL
10 mL	15 mL	25 mL
50 mL	75 mL	125 mL
100 mL	150 mL	250 mL

Otvor staklenih posuda kroz cijeli je eksperiment bio zaštićen aluminijskom folijom (sterilnom), kako bi se spriječila kontaminacija. Izmjena plinova unutar fotobioreaktora vršena je svakodnevnom aeracijom kultura i protresanjem na električno vibracijsko rotacijskoj miješalici.



Slika 11. Shematski prikaz fotobioreaktora sastavljenog za izvođenje eksperimenta.

3.6. RAČUNALNI PROGRAM R

R je integrirani paket programskih objekata za manipulaciju podacima, izračune i grafičke prikaze (Venables i sur., 2012) koji predstavlja implementaciju S programskog jezika (Ihaka i Gentleman, 1996). R programski jezik pruža široki izbor statističkih tehnika (modeliranje linearnih i nelinearnih funkcija, klasični statistički testovi, analize vremenskih serija, klasifikacije i grupiranja) te velik izbor grafičkih tehnika (R Development Core Team, 2010).

Za sve izračune te prilagođavanje podataka korišten je paket *drc* (eng. *dose response curve*). Paket *drc* radi pod R programskim jezikom (Ritz i Streibig, 2005). Svi eksperimentalni podaci su prilagođavani linearno-logističkim modelom pomoću četiri-parametarske funkcije (LL.4) unutar *drc* paketa (Seber i Wild, 1989).

3.7. IZRAČUN STOPE RASTA POPULACIJE

Kroz 47 dana eksperimenta svaka 24 sata mjerena je koncentracija klorofila a, klorofila b i ukupna koncentracija pigmenata *in vivo.* Mjerenje se izvodilo spektrofotometrijski (Shimadzu 1601) pri valnim duljinama: 450 nm, 689 nm, 750 nm.

Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbanci pri valnim duljinama 450 nm (8), 689 nm (9), 750 nm (10) izračunat je broj algalnih stanica po mililitru, odnosno biomasa. U korištenim izrazima se nalaze konstante koje označavaju odnos između mikroalgalne gustoće (N, stanice*ml^{-1}) i optičke gustoće pri valnim duljinama (Li i sur., 2010a). Broj algalnih stanica po mililitru izračunat je prema izrazima:

$$N_{450} = 5 \cdot 10^6 OD_{450} - 18737 \quad (8)$$

$$N_{689} = 6 \cdot 10^6 OD_{689} - 17696 \quad (9)$$

$$N_{750} = 7 \cdot 10^6 OD_{750} - 30125 \quad (10)$$

Gdje je:

N_{450}	gustoća mikroalgalne populacije pri 450 nm
N_{689}	gustoća mikroalgalne populacije pri 689 nm
N_{750}	gustoća mikroalgalne populacije pri 750 nm
18737	konstanta pri 450 nm
17696	konstanta pri 689 nm
30125	konstanta pri 750 nm

Iz prethodnih izraza dobivene su gustoće mikroalgalne populacije (N_{450}, N_{689}, N_{750}) za sve tri valne duljine pri kojima je vršeno mjerenje. Te vrijednosti potom su upotrijebljene u jednadžbi 11 za izračun stope rasta populacije (*r*).

Prilikom izračuna stope rasta mikroalgalne populacije korišten je sljedeći izraz (11):

$$r = \frac{\ln N_{t2} - \ln N_1}{t_2 - t_1} \quad (11)$$

Gdje je:

r	relativna stopa rasta populacije[d^{-1}]
t_1	vrijeme početka mjerenja rasta populacije
t_2	vrijeme završetka mjerenja rasta populacije
N_{t1}	gustoća mikroalgalne populacije u vremenu t_1
N_{t2}	gustoća mikroalgalne populacije u vremenu t_2

3.8. PRILAGOĐAVANJE PODATAKA ČETIRI - PARAMETARSKOJ LOGISTIČKOJ FUNKCIJI

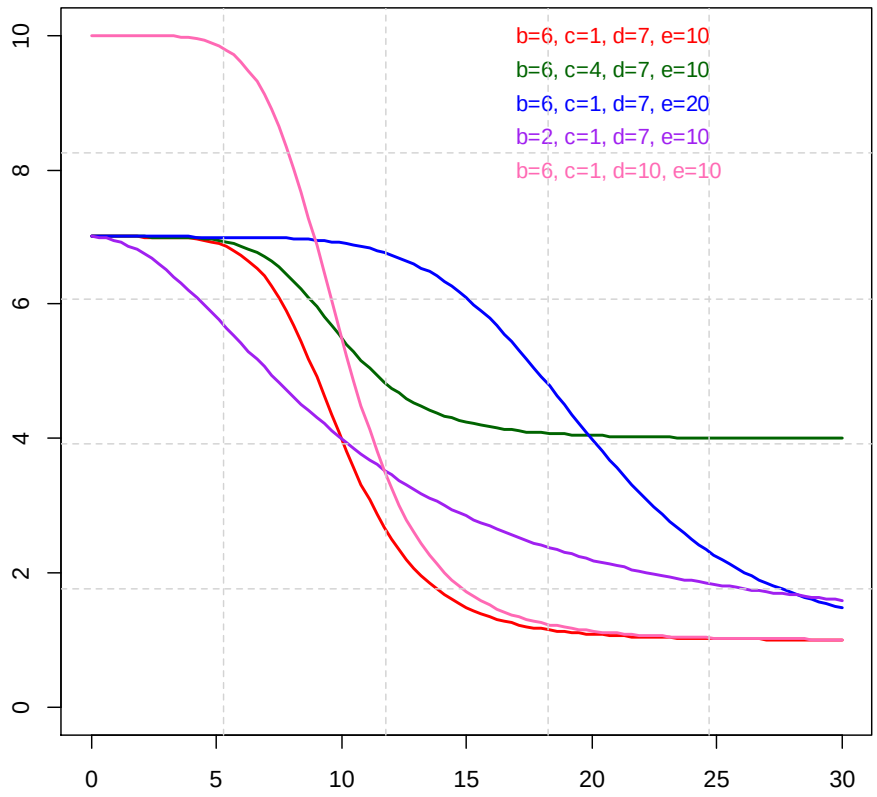
Logistička funkcija sigmoidalna je krivulja koja se često koristi u populacijskoj ekologiji, biomatematici, toksikologiji, statistici i ekonomiji. Funkcija može biti opisana različitim brojem parametara, pa tako govorimo o pet-, četiri-, tri- i dvo- parametarskoj logističkoj funkciji. Prilikom prilagođavanja krivulja, funkciju odabiremo ovisno o raspodjeli naših podataka, odnosno minimalnim i maksimalnim vrijednostima.

U ovom slučaju korištena je četiri-parametarska logistička funkcija, koja je prilagođavana pomoću R paketa *drc* (Slika 13). Četiri parametarska logistička funkcija opisana je s četiri parametra (*b*, *c*, *d* i *e*) i ima opći oblik (12):

$$f(x) = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\ln(x) - \ln(e)))} \tag{12}$$

Gdje je:

c	donja asimptota funkcije
d	gornja asimptota funkcije
b	nagib funkcije
e	točka infleksije



Slika 13. Model četiri-parametarske logističke funkcije pri različitim parametrima.

3.9. PROCJENA KAPACITETA OKOLIŠA

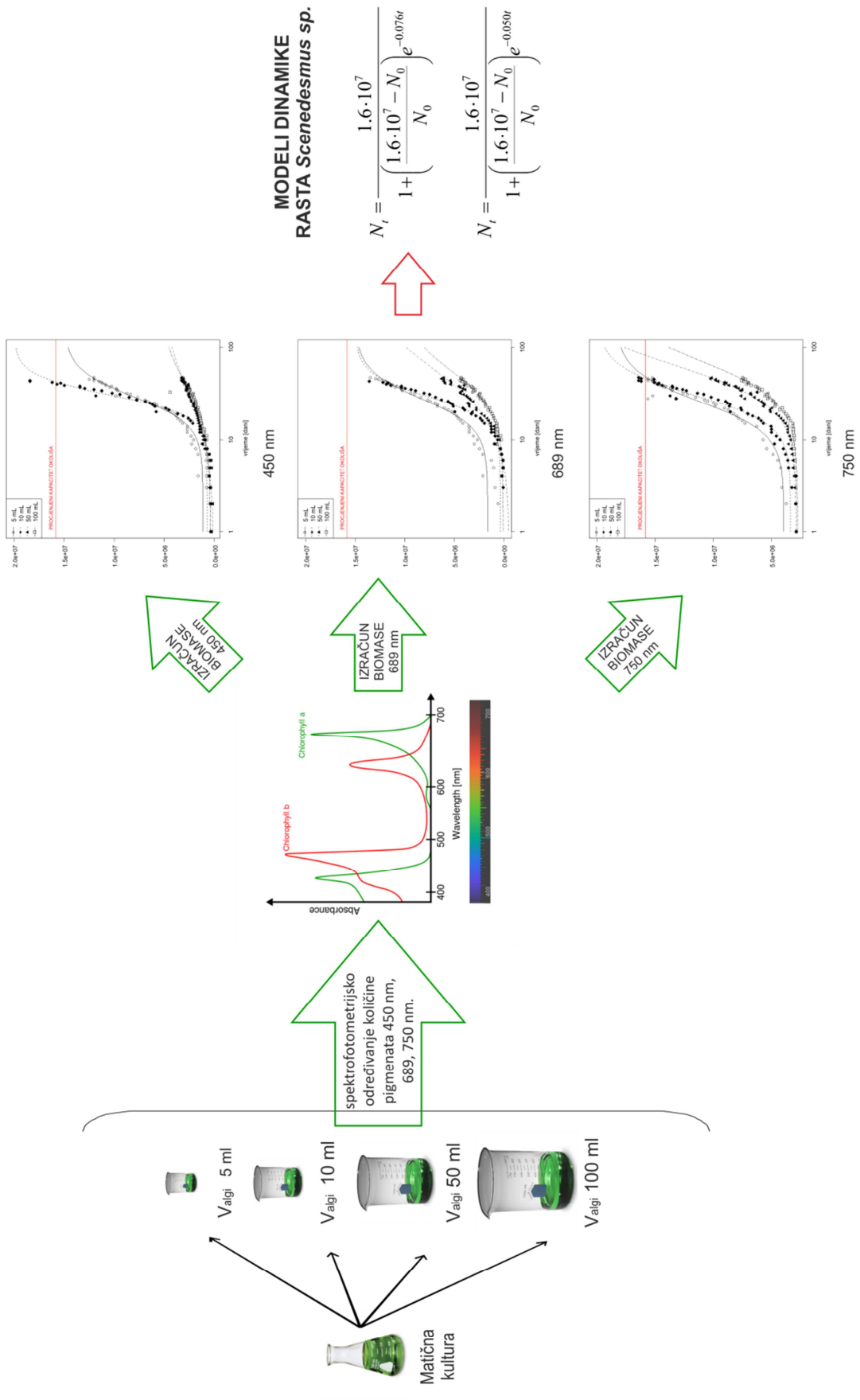
Kapacitet okoliša za mikroalgalnu populaciju procijenjen je na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka iz izrade logističkog modela. Kapacitet okoliša procijenjen je kao srednja vrijednost svih gornjih asimptota funkcije (ranije navedena kao *d* parametar četiri-parametarske logističke funkcije) pri valnim duljinama 450 nm, 689 nm i 750 nm.

3.10. DIZAJN EKSPERIMENTA

Cjelokupno istraživanje dinamike rasta populacija algi *Scenedesmus sp.* može se podijeliti u nekoliko koraka:

1. Postavljanje fotobiorektora (volumena 5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL)
2. Dnevna mjerenja količine pigmenata (klorofil a, b i ukupni sadržaj pigmenata u stanicama algi *Scenedesmus sp.*), spektrofotometrijski na tri valne duljine (450 nm, 689 nm i 750 nm) tijekom 47 dana.
3. Odabir modela rasta populacija algi *Scenedesmus sp.*
4. Izračun broja stanica algi *Scenedesmus sp.* po mililitru, na temelju izmjerenih apsorbanci pomoću izraza 8, 9, i 10.
5. Procjena stope rasta (*r*) populacije algi *Scenedesmus sp.* prema izrazu 11, posebno za male (5 mL, 10 mL) i posebno za velike (50 mL, 100 mL) eksperimentalne volumene na temelju rezultata dobivenih izračunom broja stanica *Scenedesmus sp.* po mL za sve tri valne duljine (450 nm, 689 nm i 750 nm).
6. Prilagođavanje eksperimentalnih podataka (prethodno izračunatom broju algi *Scenedesmus sp.* po mL) četiri-parametarskoj logističkoj krivulji, posebno za svaku valnu duljinu (450 nm, 689 nm i 750 nm)
7. Procjena kapaciteta okoliša (*K*) za vrstu *Scenedesmus sp*. na temelju prilagođavanja četiri-parametarskoj logističkoj funkciji. Gornja asimptota prilagođenih funkcija (*d* parametar funkcije) ekvivalentna je kapacitetu okoliša (K).
8. Izrada modela rasta populacije algi *Scenedesmus sp*. na temelju procijenjenih parametara, posebno za male (5 mL, 10 mL) i posebno za velike (50 mL, 100 mL) eksperimentalne volumene.

Shema cjelokupnog eksperimenta prikazana je na Slici 14.



Slika 14. Shematski prikaz eksperimenta (web 7).

4. REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. IZRADA MODELA RASTA POPULACIJE

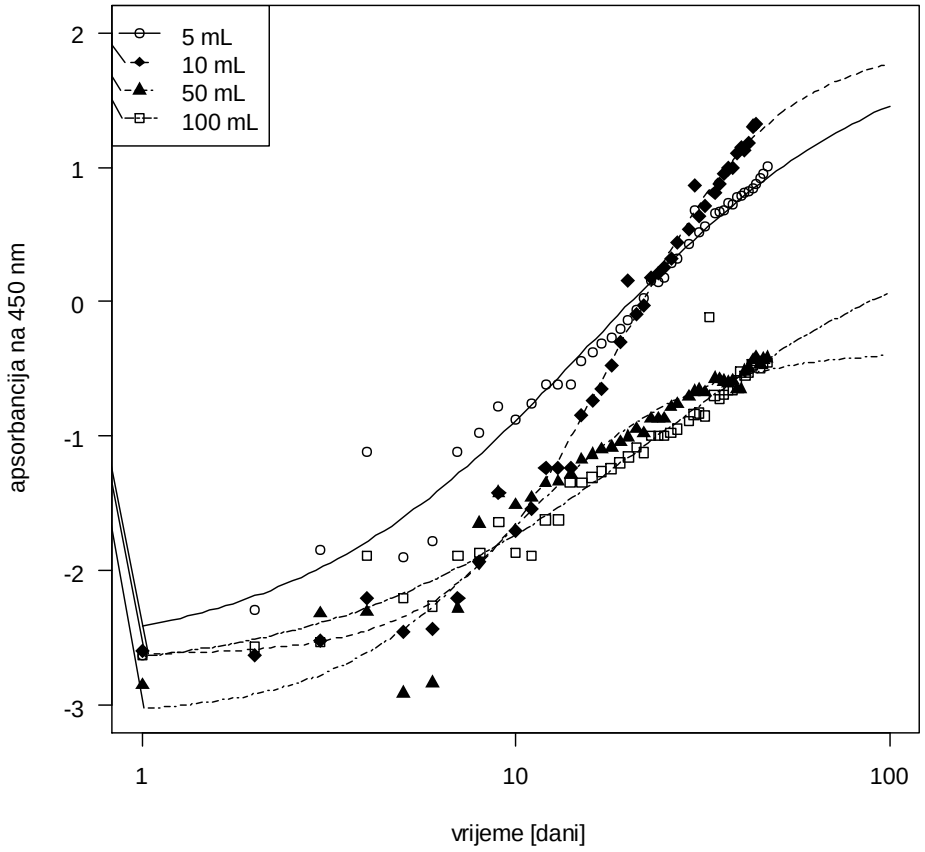
U prvom koraku izrade modela napravljeni su jednostavni grafički prikazi dinamike rasta populacije za pojedinačne valne duljine, kako bi se procijenio odabir modela za opis dinamike rasta populacije algi. Zatim je na temelju apsorbanci izračunata gustoća populacije algi za svaki dan na temelju funkcija pronađenih u literaturi. Podatci dnevnog broja organizama (broj algi po mL) prilagođavani su četiri-parametarskom logističkom funkcijom kako bi se procijenio kapacitet okoliša za *Scenedesmus sp*. za svaku od tri valne duljine (450 nm, 689 nm, 750 nm) pri kojima je vršeno mjerenje. Stopa rasta populacije (*r*) procijenjena je prema izrazu 11. Nakon što su procijenjeni parametri *r* (stopa rasta populacije) i *K* (kapacitet okoliša) pristupilo se izradi modela dinamike rasta alge *Scenedesmus sp*.

4.2. MODEL RASTA ALGALNIH KULTURA PRI VALNOJ DULJINI 450 nm

Spektrofotometrijskim mjerenjem pri valnoj duljini 450 nm, dobivene su vrijednosti apsorbanci, na temelju kojih je izrađen grafički prikaz rasta algalne populacije za sva četiri eksperimentalna volumena 5 mL, 10 mL, 50 mL i 100 mL. Pri valnoj duljini 450 nm mjerena je količina klorofila b, koji je pokazatelj rasta algalne populacije u kulturi, jer je prisutan u svim stanicama zelene mikroalge *Scenedesmus sp* .

Prema grafičkom prikazu (Slika 14) možemo vidjeti da rast kulture algi *Scenedesmus sp*. (450 nm) pri kojoj je mjerena koncentracija klorofila b, za eksperimentalni algalni volumen od 5 mL započinje zaostajnom (eng. *lag*) ili indukcijskom fazom, u kojoj dolazi do minimalnog porasta algalne populacije. Trajanje indukcijske faze za eksperimentalni volumen 5 mL algalne kulture dva je dana od početka mjerenja, što je relativno kratko vrijeme trajanja indukcijske faze u odnosu na trajanje indukcijske faze većih eksperimentalnih volumena od 10 mL, 50 mL i 100 mL. Nakon indukcijske faze, rast algalne kulture volumena 5 mL kreće se prema eksponencijalnoj fazi rasta populacije. Potom rast populacije algalne kulture 30 – tog dana od početka eksperimenta prati linearni dio logističke krivulje, što znači da se rast algalne populacije usporava, ali veličina algalne populacije volumena 5 mL prema kraju eksperimenta, odnosno 47. dan od početka mjerenja, nije dosegnula stacionarnu fazu u kojoj gustoća populacije postaje relativno konstantna. Za eksperimentalni algalni volumen od 10 mL trajanje indukcijske faze je tri dana od početka mjerenja, što je duže vrijeme trajanja te faze u odnosu na mali

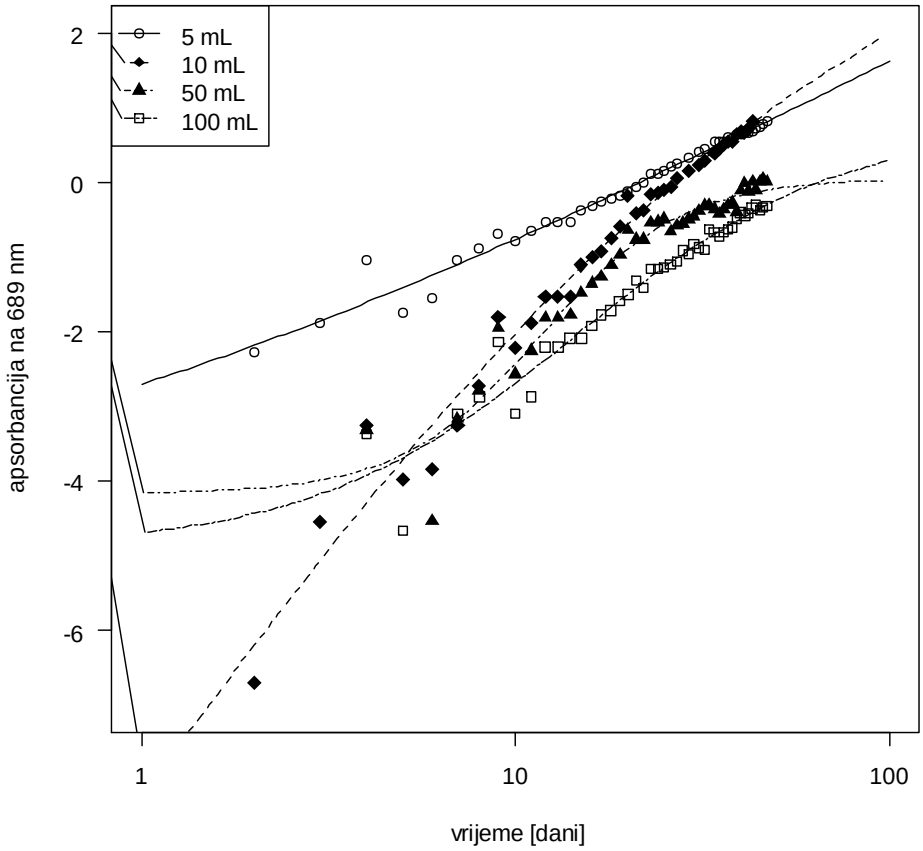
eksperimentalni volumen od 5 mL, ali i zamjetno kraća indukcijska faza u odnosu na velike eksperimentalne volumene od 50 mL i 100 mL. Kultura alge *Scenedesmus sp*. pri eksperimentalnom volumenu od 50 mL prati indukcijsku fazu logističke krivulje, u kojoj je porast algalne populacije relativno mali, osam dana od početka mjerenja, što ukazuje na duže trajanje zaostajne faze velikog algalnog volumena u odnosu na male algalne volumene od 5 mL i 10 mL. Nakon osmog dana od početka eksperimenta, rast algalne kulture od 50 mL nalazi se u ranoj eksponencijalnoj fazi rasta do 15-tog dana od početka eksperimenta. Nadalje, rast algalne kulture volumena 50 mL prati eksponencijalnu fazu rasta logističke funkcije do kraja eksperimenta, odnosno do 47-og dana. Algalna kultura *Scenedesmus sp.* volumena 100 mL ima najduže vrijeme trajanja rasta u indukcijskoj fazi kako je vidljivo prema grafičkom prikazu, čak osam dana od početka eksperimenta. Nakon toga rast algi eksperimetalnog volumena 100 mL prati eksponencijalni rast logističke krivulje u ranoj fazi do 20-og dana, nakon čega prati linearni rast logističke krivulje do kraja eksperimenta, odnosno 47-og dana.



Slika 14. Model rasta algalnih kultura *Scenedesmus sp*. praćen na valnoj duljini 450 nm.

4.3. MODEL RASTA ALGALNIH KULTURA PRI VALNOJ DULJINI 689 nm

Na temelju spektrofotometrijskog mjerenja koncentracije klorofila a pri valnoj duljini 689 nm, dobivene su vrijednosti apsorbanci. Klorofil a također je pokazatelj rasta algalne populacije u kulturi jer se nalazi u svim stanicama zelene mikroalge *Scenedesmus sp*.. Za sva četiri eksperimentalna volumena 5 mL, 10 mL, 50 mL i 100 mL izrađen je grafički prikaz rasta algalnih kultura na temelju dobivenih vrijednosti apsorbanci.



Slika 15. Model rasta algalnih kultura *Scenedesmus sp.* praćen na valnoj duljini 689 nm.

Iz grafičkog prikaza (Slika 15) rasta kultura algi *Scenedesmus sp*. pri 689 nm pri kojoj je mjerena koncentracija klorofila a vidljivo je da eksperimentalni algalni volumen 5 mL započinje zaostajnom (eng. lag) ili indukcijskom fazom. Indukcijska faza za eksperimentalni volumen 5 mL algalne kulture pri 689 nm je završila 24 sata od početka eksperimenta, nakon čega je započela faza ranog eksponencijalnog rasta. Rast eksperimentalnog algalnog volumena 10 mL započinje linearnim rastom. Rast kultura alge *Scenedesmus sp*. pri eksperimetalnom volumenu 50 mL prati indukcijsku fazu logističke krivulje, u kojoj je porast algalne populacije relativno nizak. Sedmi dan od početka

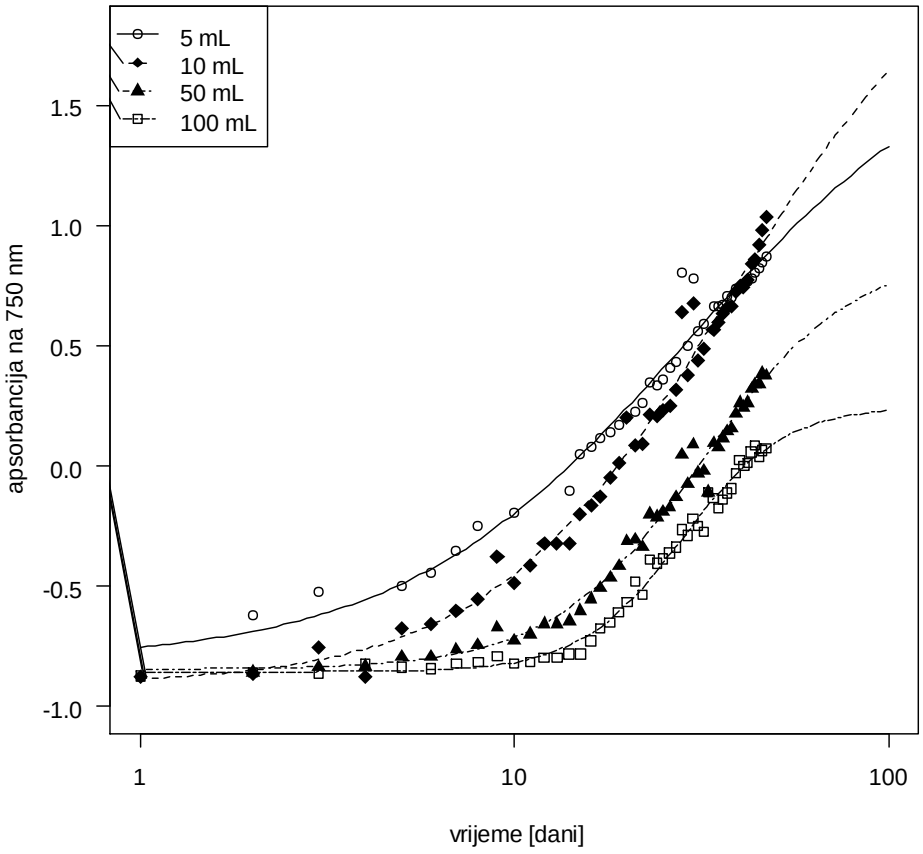
eksperimenta rast algalne kulture volumena 50 mL prelazi u eksponencijalnu fazu rasta po logističkoj krivulji. Nakon rapidnog porasta algalne populacije, praćenjem količine klorofila b uočava se usporavanje rasta, koja je na grafičkom prikazu vidljiva kao linearni dio logističke krivulje. Linearna faza rasta algalne populacije volumena 50 mL nastavljena je do kraja eksperimenta, odnosno 47-og dana. Algalna kultura *Scenedesmus sp.* volumena 100 mL ima najduže vrijeme trajanja rasta u indukcijskoj fazi. Kako je vidljivo prema grafičkom prikazu (Slika 15), trajanje indukcijske faze eksperimentalnog volumena 100 mL je vrlo slično trajanju indukcijske faze eksperimentalnog algalnog volumena 50 mL i iznosi sedam dana od početka eksperimenta. Indukcijska faza rasta algi eksperimetalnog volumena 100 mL završava početkom eksponencijalne faze rasta kulture koja je započela osmog dana od početka eksperimenta. Eksponencijalna faza rasta populacije *Scenedesmus sp.* volumena 100 mL završava 20-og dana, kada možemo uočiti da populacija započinje svoju linearnu fazu rasta. Drugim riječima došlo je do usporavanja rasta algalne populacije. Linearan rast eksperimentalnog volumena 100 mL vidljiv je do kraja eksperimenta, odnosno 47-og dana, odnosno algalne populacije eksperimentalnih volumena 50 mL i 100 mL nisu dosegnule stacionarnu fazu.

4.4. MODEL RASTA ALGALNIH KULTURA PRI VALNOJ DULJINI 750 nm

Spektrofotometrijskim mjerenjem pri valnoj duljini 750 nm dobivene su vrijednosti apsorbanci. Pri valnoj duljini 750 nm mjerena je ukupna količina pigmenata u stanicama zelene alge *Scenedesmus sp*.. Na temelju dobivenih podataka izrađen je grafički prikaz rasta algalnih kultura *Scenedesmus sp.* za sva četiri eksperimentalna volumena 5 mL, 10 mL, 50 mL i 100 mL (Slika 16).

Prema grafičkom prikazu (Slika 16) vidljivo je da rast kulture algi *Scenedesmus sp.* pri 750 nm pri kojoj je mjerena ukupna koncentracija pigmenata, za eksperimentalni algalni volumen 5 mL započinje indukcijskom fazom i završava drugi dan od početka mjerenja ukupne koncentracije pigmenata. U indukcijskoj fazi došlo je do najmanjeg rasta algalne populacije volumena 5 mL. U odnosu na ostale eksperimentalne algalne volumene volumen od 5 mL ima najkraće vrijeme trajanja indukcijske faze, iz koje rast algalne populacije dalje prati eksponencijalni dio logističke funkcije do 25-og dana od početka eksperimenta. Do kraja praćenja ukupne količine pigmenata, rast algalne populacije je linearan, odnosno usporen gustoćom algalne populacije. Kultura algi u eksperimentalnom volumenu 10 mL prema dobivenim apsorbancama pokazuje dulje trajanje indukcijske faze u odnosu na kulturu volumena 5 mL, koja u ovom slučaju traje pet dana. Nakon

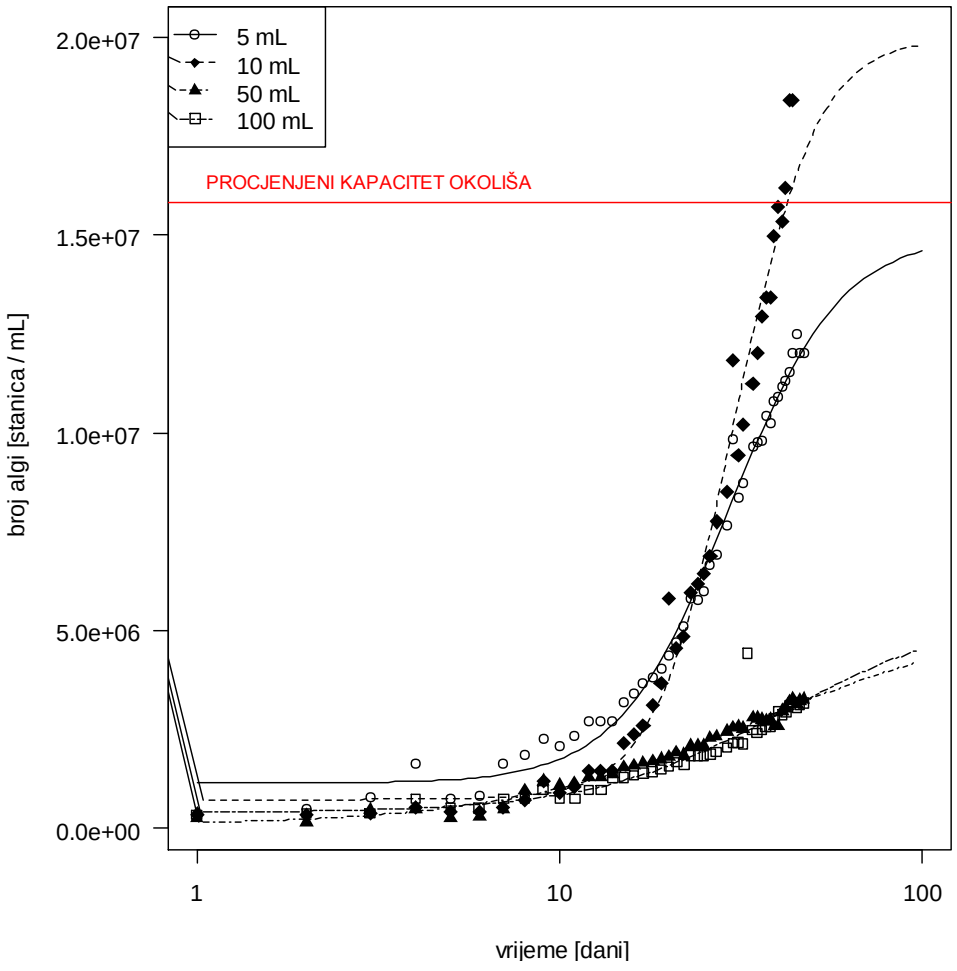
indukcijske faze slijedi eksponencijalna faza rasta algalne populacije volumena 10 mL. Do usporavanja rasta algalne populacije volumena 10 mL, odnosno linearne faze rasta, dolazi 25-og dan od početka eksperimenta. Takav trend rasta populacije nastavljen je do kraja eksperimenta. Za algalni volumen 50 mL možemo uočiti kako je trajanje indukcijske faze, faze minimalnog rasta populacije, znatno duže u odnosu na trajanje indukcijske faze malih volumena 5 mL i 10 mL i traje do osmog dana od početka eksperimenta. Nakon toga rast algalne populacije volumena 50 mL ulazi u ranu fazu eksponencijalnog rasta populacije. Usporavanje rasta algalne populacije volumena 50 mL započinje 20-og dana od početka eksperimenta i nastavlja se do završetka eksperimenta. Vrlo sličnu dinamiku rasta populacije ima i algalni volumen 100 mL, čija indukcijska faza traje najduže u odnosu na ostale eksperimentalne volumene. Tek 25–og dana od početka eksperimenta vidljiva je (Slika 16) eksponencijalna faza rasta. Linearna faza rasta za volumen 100 mL započinje 30-og dana od početka eksperimenta i nastavlja se do kraja mjerenja.



Slika 16. Rast algalnih kultura *Scenedesmus sp.* praćen na valnoj duljini 750 nm.

4.5. IZRAČUN BIOMASE I PROCJENA KAPACITETA OKOLIŠA PRI 450 nm

Na temelju dobivenih apsorbanci pri valnoj duljini 450 nm izračunata je biomasa, odnosno broj stanica algi po mililitru za sve eksperimentalne algalne volumene. Potom je iz podataka dobivenih prilagođavanjem četiri-parametarskoj logističkoj funkciji iz srednjih vrijednosti parametra *d* (gornje asimptote funkcije) procijenjen kapacitet okoliša, odnosno maksimalna brojnost algalnih stanica po mililitru.



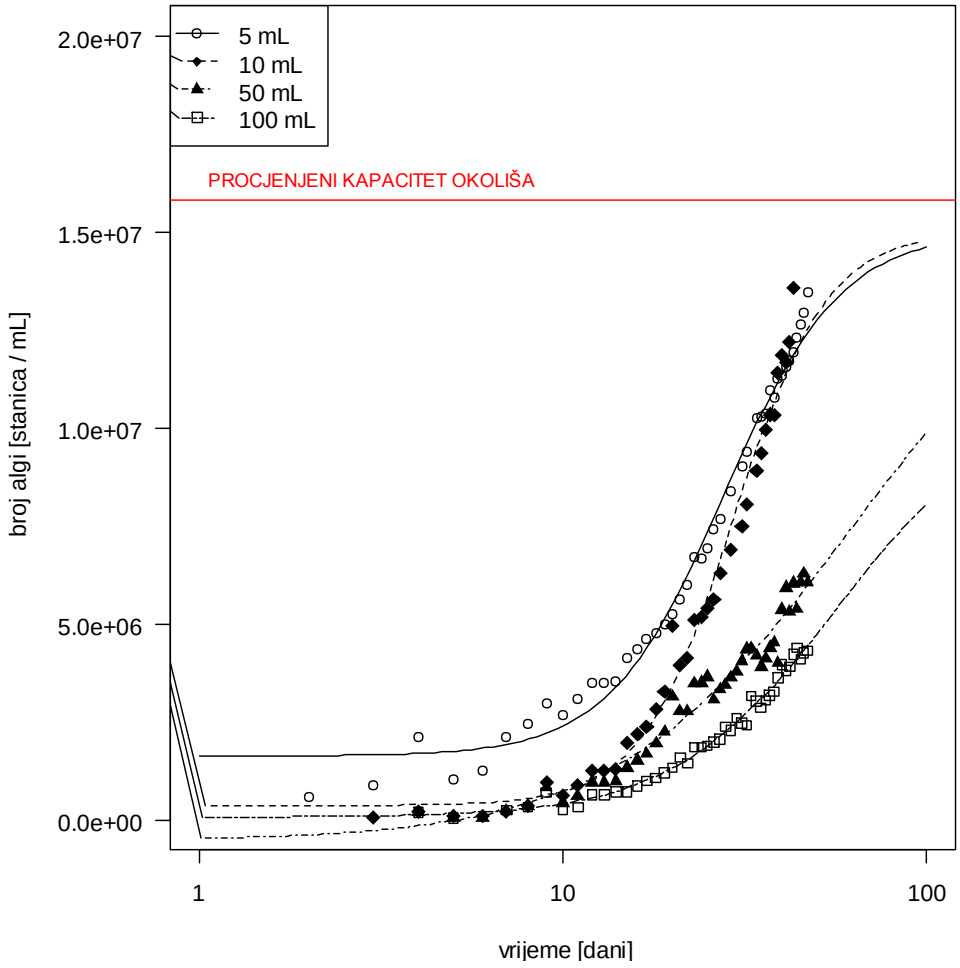
Slika 17. Logistički rast algalnih kultura s procijenjenim kapacitetom okoliša (K=1,6 x 10^7) pri valnoj duljini 450 nm.

Za biomasu, odnosno broj algalnih stanica po mililitru pri valnoj duljini 450 nm, procijenjeni kapacitet okoliša iznosi 1,6 x 10^7 algalnih stanica po mililitru. Prema grafičkom prikazu (Slika 17) logističkog rasta za eksperimentalni volumen od 5 mL nije dosegnut kapacitet okoliša. Prema prilagođenoj četiri-parametarskoj logističkoj funkciji može se vidjeti da bi kroz kratak vremenski interval ovaj volumen trebao dosegnuti procijenjeni kapacitet

okoliša. Prema eksperimentalnim podatcima iz kojih je dobivena vrijednost biomase algalni volumen od 10 mL je dosegnuo kapacitet okoliša. Eksperimentalni algalni volumeni 50 mL i 100 mL nalaze se u indukcijskoj fazi, te nakon 10 dana od početka eksperimenta prate eksponencijalni rast, pa je jasno kako nisu dosegnuli kapacitet okoliša.

4.6. IZRAČUN BIOMASE I PROCJENA KAPACITETA OKOLIŠA PRI 689 nm

Na temelju dobivenih apsorbanca pri valnoj duljini 689 nm izračunata je biomasa, odnosno broj stanica algi po mililitru za sva četiri eksperimentalna volumena. Potom je iz podataka dobivenih prilagođavanjem četiri-parametarskoj logističkoj krivulji za valnu duljinu 689 nm iz srednjih vrijednosti parametra *d* (gornje asimptote funkcije) procijenjen kapacitet okoliša.

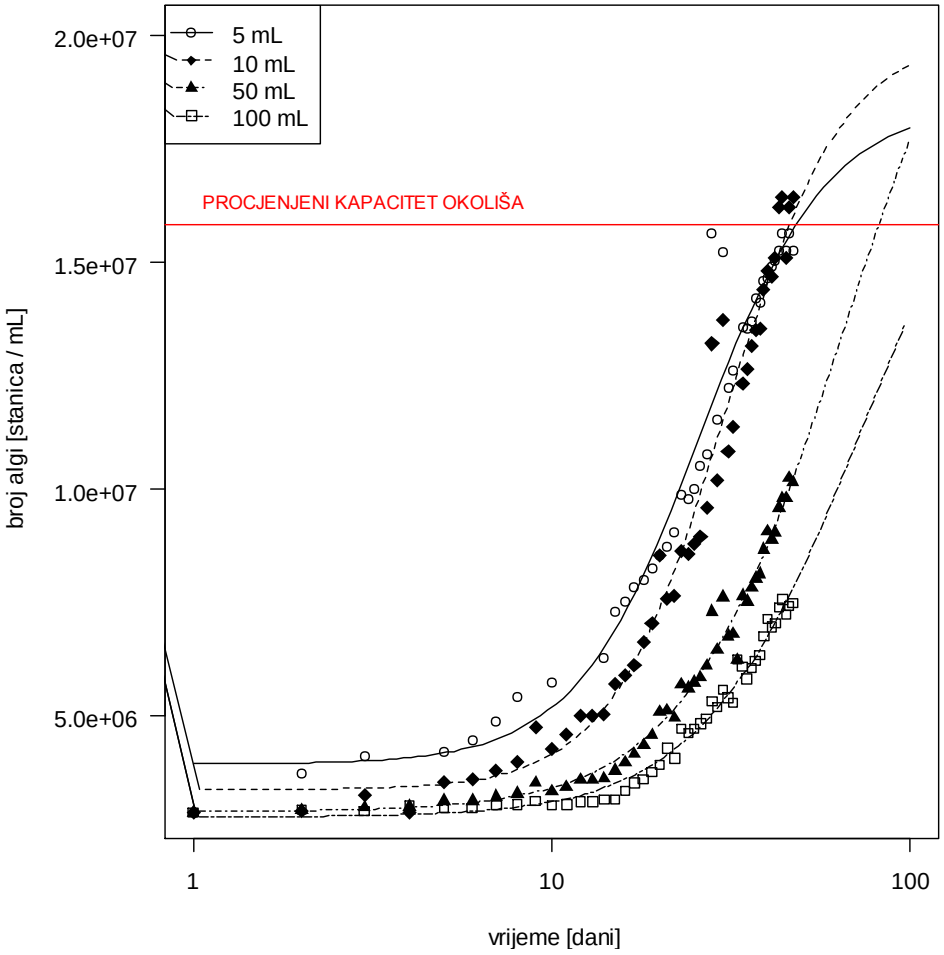


Slika 18. Logistički model rasta algalnih kultura s procijenjenim kapacitetom okoliša (K = 1,6 x 10^7) pri valnoj duljini 689 nm.

Za biomasu, odnosno broj algalnih stanica pri valnoj duljini 689 nm, procijenjeni kapacitet okoliša iznosi 1,6 x 10^7 alganih stanica po mililitru. Prema grafičkom prikazu (Slika 18) algalni volumeni 5 mL i 10 mL nisu dosegnuli kapacitet okoliša, iako je na temelju grafičkog prikaza moguće predvidjeti vrijeme dostizanja procijenjenog kapaciteta okoliša. Algalni volumeni 50 mL i 100 mL pokazuju rani eksponencijalni rast populacije te je iz dobivenih podataka biomase pri valnoj duljini 689 nm, vidljivo da ove algalne populacije nisu dosegnule procijenjeni kapacitet okoliša.

4.7. IZRAČUN BIOMASE I PROCJENA KAPACITETA OKOLIŠA PRI 750 nm

Na temelju dobivenih apsorbancija pri valnoj duljini 750 nm izračunata je biomasa, odnosno broj stanica algi po mililitru. Potom je iz podataka dobivenih prilagođavanjem četiri-parametarskoj funkciji za valnu duljinu 750 nm iz srednjih vrijednosti parametra *d* (gornje asimptote funkcije) procijenjen kapacitet okoliša za sva četiri eksperimentalna volumena.



Slika 19. Logistički model rasta algalnih kultura s procijenjenim kapacitetom okoliša (K= 1,6 x 10^7) pri valnoj duljini 750 nm.

Za biomasu, odnosno broj algalnih stanica pri valnoj duljini 750 nm, procijenjeni kapacitet okoliša iznosi 1,6 x 10^7 algalnih stanica po mililitru. Prema grafičkom prikazu (Slika 18) algalni volumeni 5 mL i 10 mL dosegnuli su procijenjeni kapacitet okoliša. Algalni volumeni 50 mL i 100 mL prate eksponencijalni rast populacije i ulaze u stacionarnu fazu rasta, ali nisu dosegnuli procijenjeni kapacitet okoliša

4.8. MODEL RASTA POPULACIJE ALGI *Scenedesmus sp.* PRI MALIM EKSPERIMENTALNIM VOLUMENIMA 5 mL I 10 mL

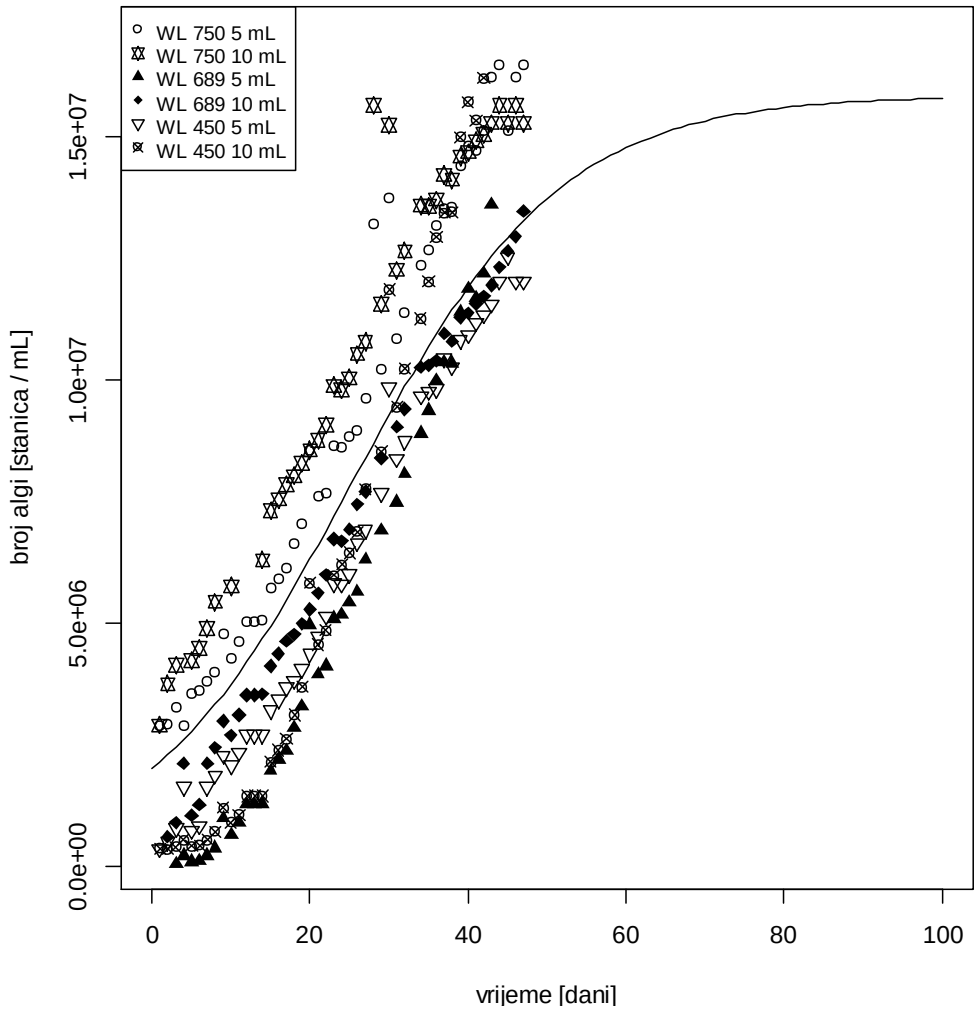
Kako eksperimentalni volumeni od 5 mL i 10 mL imaju sličnu dinamiku rasta, stopa rasta populacije algi procijenjena je odvojeno za male i velike eksperimentalne volumene. Stopa rasta populacije (*r*) za male volumene, procijenjena prema izrazu 11, iznosi 0.076±0.033. Nakon što su procijenjeni stopa rasta populacije (*r*) i kapacitet okoliša (*K*), bilo je moguće izraditi model rasta populacije algi *Scenedesmus sp.* kada su u pitanju mali eksperimentalni volumeni (13):

$$N_t = \frac{1.6 \cdot 10^7}{1 + \left(\frac{1.6 \cdot 10^7 - N_0}{N_0} \right) e^{-0.076t}} \tag{13}$$

Gdje je:

K ($1{,}6 \cdot 10^7$)	procijenjeni kapacitet okoliša za vrstu *Scenedesmus sp.* [br. algi/mL]
r (0.076±0.033)	procijenjena stopa rasta populacije za male eksperimentalne volumene
N_0	početni broj organizama po mL
t	vrijeme [dan]

Na slici 20 prikazana je usporedba eksperimentalnih podataka algane biomase s Verhulstovim modelom rasta populacije za volumene 5 mL i 10 mL. Prema grafičkom prikazu jasno je vidljivo kako eksperimentalni podatci dobiveni za algalne volumene *Scenedesmus sp.* pri valnim duljinama 450 nm, 689 nm, 750 nm prate model rasta populacije prema Verhulstu. Prema grafičkom prikazu vidljive su dvije faze rasta algalne populacije. Rast kultura volumena 5 i 10 mL započeo je u eksponencijalnoj fazi rasta te 20-og dana ulazi u stacionarnu fazu rasta.



Slika 20. Usporedba logističkog modela rasta populacije za volumene 5 mL i 10 mL, s eksperimentalnim podatcima.

4.9. MODEL RASTA POPULACIJE ALGI *Scenedesmus sp.* PRI VELIKIM EKSPERIMENTALNIM VOLUMENIMA 50 mL I 100 mL

Stopa rasta populacije (*r*) za velike eksperimentalne volumene, procijenjena prema izrazu 11, iznosi 0.050±0.015. Nakon što su procijenjeni stopa rasta populacije (*r*) i kapacitet okoliša (*K*), bilo je moguće izraditi model rasta populacije algi *Scenedesmus sp.* kada su u pitanju veliki eksperimentalni volumeni (14).

$$N_t = \frac{1.6 \cdot 10^7}{1 + \left(\frac{1.6 \cdot 10^7 - N_0}{N_0} \right) e^{-0.050t}} \tag{14}$$

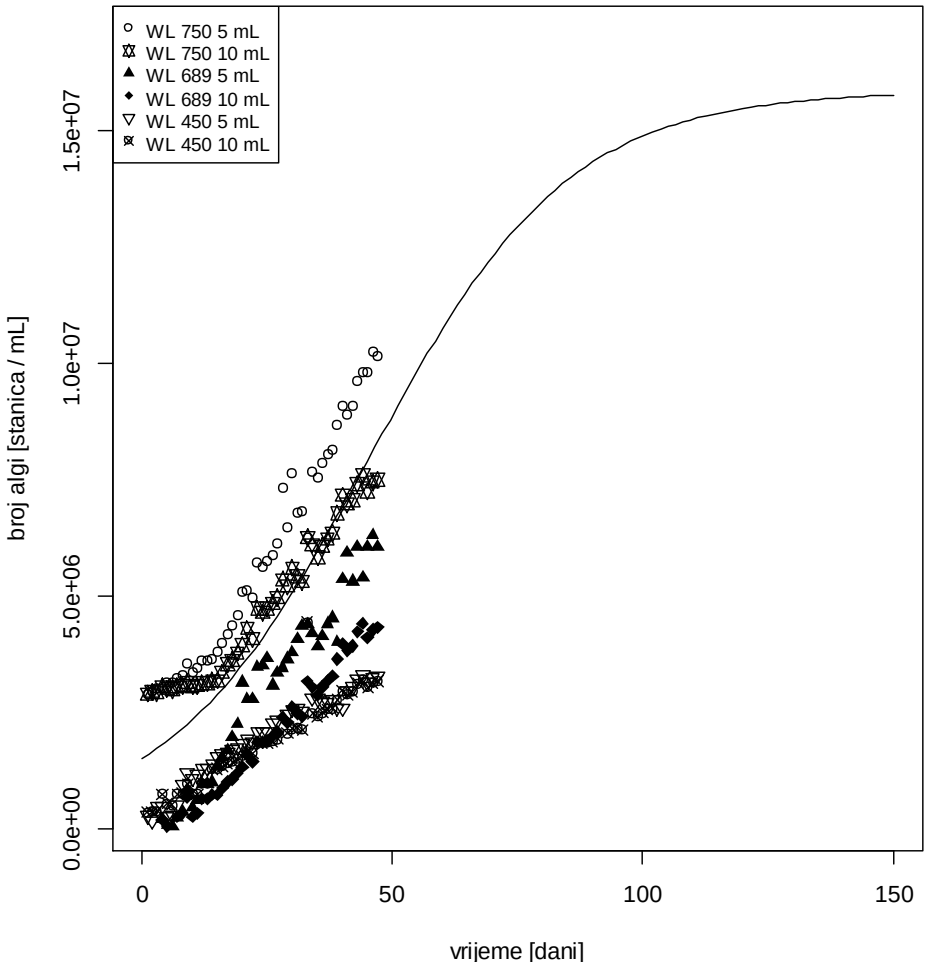
Gdje je:

K ($1{,}6 \cdot 10^7$) procijenjeni kapacitet okoliša za vrstu *Scenedesmus sp.* [br. algi/mL]

r (0.050±0.015) procijenjena stopa rasta populacije za velike eksperimentalne volumene

N_0 početni broj organizama po mL

t vrijeme [dan]



Slika 21. Logistički model rasta populacije za volumene 50 mL i 100 mL.

Na grafičkom prikazu (Slika 21) možemo vidjeti usporedbu eksperimentalnih podataka algane biomase s modelom rasta populacije. Eksperimentalni podatci dobiveni za algalne volumene 50 mL i 100 mL *Scenedesmus sp.* pri valnim duljinama 450 nm, 689 nm, 750 nm prate model rasta populacije. Na slici je vidljivo kako eksperimentalni volumeni 50 mL i 100 mL prate logističku krivulju u eksponencijalnom dijelu te za vrijeme trajanja cijelog eksperimenta nisu došle do stacionarne faze rasta.

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

Mikroalgalna biotehnologija grana je za koju postoji rastući interes. Nekoliko mikroalgalnih rodova kao što su *Chlorella*, *Spirulina* i *Scenedesmus* se uzgajaju i u komercijalne svrhe za različite primjene (Borowitzka, 1992). Proizvodnja biomase za hranu, stočnu hranu, proizvodnju visoko vrijednih kemikalija, bioaktivnih spojeva, gnojiva, akvakultura, antioksidanata i prirodnih bojila samo su neke od mogućih primjena (Pulz i Gross, 2004). Praćenje mikroalgalne biomase vodenih ekosustava je također od velike važnosti (YSI Environmental, 2005), dajući nam uvid u primjerice primarnu produkciju oceana ili toksičnih cvjetanja algi ili općenito ekološki status nekog vodenog tijela. Točno mjerenje koncentracije biomase mikroalgalnih populacija važno je u većini studija fiziologije i biotehnologije algi (Griffits i sur., 2011).

Brzi razvoj ljudskog društva posljednjih desetljeća postupno prelazi kapacitet resursnih rezervi na zemlji, na što nas upućuju i sve češće energetske krize. Iz tih razloga interes za uzgoj mikroalganih kultura ne jenjava, jer se smatraju najpogodnijim izvorom druge generacije biogoriva (Yin-Hu i sur., 2012). Mikroalgalne kulture se uzgajaju ili u otvorenim sustavima (umjetna jezera posebne namjene za uzgoj algi) ili u zatvorenim sustavima (fotobioreaktorima). S obzirom na prednosti zatvorenih sustava (fotobioreaktora) u odnosu na otvorene sustave, a to je mogućnost bolje kontrole nad uvjetima uzgoja algalnih kultura, razrađen je velik broj modela fotobioreaktora, u rasponu od laboratorijskih do industrijskih mjerila (Ugwu i sur., 2008).

Također, neki autori navode kako bi mikroalgalna biotehnologija mogla utrti put za razvoj zatvorenog ekološkog sustava za održavanje života (eng. *Closed Ecological Life Support System* (*CELSS*)) za međuplanetarna putovanja, zbog svojih nutritivnih vrijednosti i mogućnosti lake manipulacije. Takve populacije lako se obnavljaju, ukoliko se prinos biomase oduzima u točno određenoj fazi rasta (Lee i Palsson, 1995; Cogne i sur., 2005; Klanjšček i Legović, 2001). Relativno niski uzgojni zahtjevi mikroalgalnih kultura čine ih najadekvatnijim izborom za sustave tog tipa.

Uzimajući u obzir širok izbor aplikacija mikroalgi, jasan je veliki interes u kontroli i opisivanju njihove dinamike rasta (Thornton i sur., 2010).

U ovom radu izrađen je determinacijsko predikcijski model dinamike rasta algalne populacije *Scenedesmus sp*.. Na temelju tog modela moguće je predvidjeti trajanje pojedinih faza rasta monokultura, na temelju čega se mogu izvoditi preliminarna istraživanja.

Općenito, dinamiku rasta algalnih kultura nekoliko autora opisuje kroz četiri faze: prva faza rasta je zaostajna ili indukcijska faza (eng. *lag*) u kojoj je povećanje stanične gustoće minimalno. Trajanje indukcijske faze u optimalnim uzgojnim uvjetima kulture razlikuje se među mikroalgalnim vrstama. Indukcija rasta algalne populacije objašnjava se kao fiziološka adaptacija staničnog metabolizma rasta, kao što su povećanje razine enzima i metabolita uključenih u stanične diobe i fiksaciju ugljika (Spencer, 1954). U ovom radu volumen u kojima su kulture uzgajane, imao je utjecaj na trajanje indukcijskih faza, pa su tako manji algalni volumeni 5 ml i 10 ml imali kraće vrijeme trajanja indukcijske faze, dok su veći algalni volumeni 50 ml i 100 ml imali duže vrijeme trajanja indukcijske faze.

Druga faza rasta algalnih populacija opisuje se eksponencijalna faza. U eksponencijalnoj fazi dolazi do geometrijskog povećanja algalne populacije prema Malthusovom zakonu. Stopa rasta mikroalgalne populacije mjera je povećanja biomase tijekom vremena, a to se određuje upravo iz eksponencijalne faze. Stopa rasta jedan je važan način izražavanja relativnog ekološkog uspjeha vrste ili soja u prilagodbi na svom prirodnom okruženju ili u eksperimentalnom okolišu koji mu je nametnut. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da je trajanje eksponencijalne faze malih eksperimentalnih volumena 5 mL i 10 mL kraće u odnosu na trajanje eksponencijalne faze velikih eksperimentalnih volumena 50 mL i 100 mL. Usporedbom dinamike rasta malih i velikih eksperimentalnih volumena jasno je vidljivo kako se veliki volumeni dulje vrijeme nalaze u ranoj fazi eksponencijalnog rasta, dakle i stopa rasta (*r*) velikih eksperimentalnih volumena 50 mL i 100 mL niža je od stope rasta (*r*) malih eksperimentalnih volumena. Utjecaj na takvu razliku u dinamici rasta imala je promjena temperature u fotobioreaktoru koja je varirala za 1–2 °C. Zbog specifičnog toplinskog kapaciteta vode, utjecaj temperaturne promjene na dinamiku rasta eksperimentalnih algalnih kultura imao je veći učinak na male eksperimentalne volumene 5 mL i 10 mL, nego na veće eksperimentalne volumene 50 mL i 100 mL. Odnosno, mali eksperimentalni volumeni podložniji su temperaturnom stresu, što je rezultiralo većom stopom rasta. Do sada su autori (Moore i sur., 1995; Naoki i sur., 1979) opisivali utjecaj temperature na dinamiku rasta mikroalganih kultura fotobioreaktora, ne uzimajući u obzir utjecaj veličine eksperimentalnog volumena. U ovom radu pokazano je kako veličina eksperimentalnih volumena ima utjecaj na dinamiku rasta mikroalgalnih populacija. Iz tih razloga smatra se da su veći volumeni algalnih kultura primjenjivi u uzgoju i produkciji mikroalgi jer su manje podložni temperaturnom stresu, koji kako je vidljivo iz rezultata jedan od najvažnijih čimbenika koji određuju dinamiku rasta algalnih kultura.

Treća faza rasta algalnih kulutura opisuje se kao usporavanje rasta populacije. Faza usporavanja rasta populacije prati linearni dio logističke krivulje koji slijedi nakon

eksponencijalne faze. U toj fazi gustoća je algalne populacije vrlo velika. Do usporavanja rasta dolazi iz više razloga, a to su iscrpljivanje nutrijenata iz podloge, velika gustoća stanica što dovodi do zasjenjenja, čiji je rezultat smanjena fotosinteza i produkcija algalnih stanica. Ulazak u stacionarnu fazu, odnosno linearni dio logističke funkcije eksperimentalni volumen 5 mL prati vremenski najranije u odnosu na ostale eksperimentalne volumene, što je i očekivano obzirom na prethodno opisanu dinamiku, gdje je isti volumen prvi ulazio u eksponencijalnu fazu. Isto tako i eksperimentalni volumen od 10 mL s odmakom prati linearni dio logističke funkcije u odnosu na eksperimentalni volumen 5 mL. Veliki eksperimentalni volumeni 50 mL i 100 mL pokazivali su linearni rast u kasnoj fazi eksperimenta.

Četvrta faza je stacionarna faza rasta, u kojoj su limitirajući faktori i stopa rasta izbalansirani, što rezultira relativno konstantnom gustoćom algalne populacije. Stacionarna faza rasta u matematičkom smislu odgovara kapacitetu okoliša. Prema dobivenim eksperimentalnim podatcima niti jedan od eksperimentalnih volumena nije dosegnuo stacionarnu fazu.

Za potrebe izrade modela dinamike rasta alge *Scenedesmus sp.* bilo je potrebno procijeniti parametre logističkog modela – stopu rasta *(r*) i kapacitet okoliša (*K*). Kapacitet okoliša određivan je u prijašnjim istraživanjima (Li i sur., 2011), gdje je procijenjen na $1 \cdot 10^6$ stanica po mL. Vrlo sličan rezultat dobiven je i u ovom radu gdje procijenjeni kapacitet okoliša iznosi $1{,}6 \cdot 10^7$ stanica po mL. Stopa rasta populacije algi *Scenedesmus sp.* također je određivana u prijašnjim istraživanjima. U istraživanju Li i sur. (2011) određivana je stopa rasta populacije algi *Scenedesmus sp*. (komercijalni soj LX1) u ovisnosti o temperaturi. Za temperaturu od 25 °C, koja je najsličnija našim eksperimentalnim uvjetima, određena je stopa rasta od 0.38±0.02 [d^{-1}]. U našem istraživanju dinamika rasta različita je u malim i velikim eksperimentalnim volumenima. Za male eksperimentalne volumene određena je stopa rasta od 0.076±0.033 [d^{-1}], a za velike volumene 0.05±0.015 [d^{-1}], što je značajno niža stopa rasta u odnosu na onu procijenjenu u radu Li i sur. Ta razlika može se objasniti razlikom u soju algi koji je istraživan. Naime, komercijalni sojevi algi namijenjeni su kultivaciji te mogu imati značajno različite karakteristike u odnosu na druge sojeve iz istog roda algi.

Usporedbom eksperimentalnih podataka s modelom rasta populacije vidljivo je da model dobro opisuje rast populacije algi. Tijekom eksperimenta nijedan eksperimentalni volumen nije dosegnuo procijenjeni kapacitet okoliša. Međutim, na temelju modela, vidljivo je da bi kultura algi trebala doseći kapacitet okoliša za otprilike 100 dana (Slika 17., 18. i 19.).

Prema literaturnim podatcima očekivano trajanje eksperimenta bilo je 30 do 40 dana. Međutim, kako u tom periodu kultura algi niti u jednom od eksperimentalnih volumena nije dosegla kapacitet okoliša, eksperiment je prekinut 47-og dana. Eksperiment je prekinut jer se prilikom svakog mjerenja iz fotobioreaktora oduzima volumen od 25 µL. Oduzimanjem mjernih volumena ukupni volumen smanjuje se s trajanjem eksperimenta te se zbog dostizanja razine kritičnog volumena značajno povećava šum u podatcima. Međutim, na temelju procjene kritičnih parametara dinamike rasta i izrađenog logističkog modela bilo je moguće kalibrirati model te donijeti temeljne zaključke o dinamici rasta populacije algi *Scenedesmus sp.* Međutim, kako bi se ti parametri preciznije procijenili potrebno je pratiti dinamiku rasta u većem broju eksperimentalnih volumena, a trajanje eksperimenta treba predvidjeti na period od 100 do 150 dana.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

- Stopa rasta populacije alge *Scenedesmus sp.* različita je u malim i velikim eksperimentalnim volumenima. Stopa rasta u malim volumenima procijenjena je na 0,076±0,033, a u velikim 0,050±0,015.
- Kapacitet okoliša za vrstu *Scenedesmus sp.* procjenjen je $1{,}6 \cdot 10^7$.
- Dinamika rasta mikroalgalne populacije *Scenedesmus sp.* može se opisati logističkom modelom.
- Veličina eksperimentalnih volumena utječe na dinamiku rasta mikroalgalne populacije *Scenedesmus sp.*

7. LITERATURA

Bender EA 2000. *An Introduction to Mathematical Modeling*, New York : Dover. ISBN 0-486-41180-X

Borowitzka MA. 1992. Algal biotechnology products and processes — matching science and economics. Journal of Applied Phycology 4, 267–279.

Brennan L i Owende P. 2010. Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, Renewable Sustainable Energy. Review, 14, 557–577

Caswell H i Neubert MG. 1998. Chaos and closure terms in plankton food chain models, J. Plankton Res. 20 (9), 1837 - 1845

Chisti Y 2007. Biodiesel from microalgae, Biotechnology Adv, vol 25, Pages 294 –306

Cogne G, Cornet JF, Gross JB, 2005. Design, operation, and modeling of a membrane photobioreactor to study the growth of the cyanobacterium Arthrospira platensis in space conditions. Biotechnol. Prog. 21, 741–750.

Cohen JE. 2004. Mathematics is biology's next microscope, only better; biology is mathematics' next physics, only better. *PLoS Biol 2*(12): e439.

Committee on Mathematical Sciences Research for DOE s Computational Biology. 2005. Mathematics and 21st century biology, National Research Council, THE NATIONAL ACADEMIES PRESS Washington, D.C., ISBN-10: 0-309-09584-0

Culture Collection of Algae and Protozoa, Dunstaffnage Marine Laboratory,Oban, Argyll, PA37 1QA, UK, URL http://www.ccap.ac.uk

Den Blanken HJ, Hoff AJ. 1983. High-resolution absorbance-difference spectra of the triplet state of the primary donor P-700 in Photosystem I subchloroplast particles measured with absorbance-detected magnetic resonance at 1.2 K. Evidence that P-700 is a dimeric chlorophyll complex, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics Vol 724, Issue 1, Pgs 52–61

Diercks – Horn S, Metfies H, Jäckel S, Medlin LK. 2011. The ALGADEC device: A semi-automated rRNA biosensor for the detection of toxic algae, *Harmful Algae*, *Volume 10, Issue 4*, *Pages 395-401*

Directive 2003/30/EC, 2003. on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport;May 8, 2003.

Edward KY. Shonkwiler RW, HerodJV. 2010. An Introduction to the Mathematics of Biology: With Computer Algebra Models, Springer

Edwards AM, Bees MA. 2001. Generic dynamics of a simple plankton population model with a non-integer exponent of closure. Chaos Solitons Fract. 12, 289 -300

ER EPA, Enviromental protection agency Emilia Romagna Region 2010., Algal inhibition test, Bologna County, Italy Dir 92/69/EEC

Godhe A., Anderson D M, Rehnstam-Holm AS. 2001. PCR amplification of

microalgal DNA for sequencing and species identification: studies on fixatives and algal growth stages, Harmful Algae, 1, 375–382

Guiry MD, Guiry GM.2010. AlgaeBase, URL http//:www.algaebase.org

Griffiths MJ, Garcin C, van Hille RP, Harrison STL. 2011. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density, Journal of Microbiological Methods 85 (2011) 119–123

Healey, F.P., 1975. Physiological indicators of nutrient deficiency in algae. Tech. Rep. 585. Department of the Environment, Fisheries and Marine Service Research and Development Directorate, Winnipeg, Man.

Hoppensteadt F.2007.,Mathematical biology. Institute od Mathematical sciences Scholarpedia, 2(6) :2877

Hoppensteadt F.1995. Getting started in mathematical biology, Notices of the AMS

Ihaka R, Gentleman R. 1996. R: a language for dana analysis and graphics, *J Comput Graph Statist* 5:299-314.

Kar TK, Chakrabotryb K. 2010. Bioeconomic modelling of a prey predator system using differentialalgebraic equations, *Comput Graph Statist* 5:299-314.,International Journal of Engineering, Science and TechnologyVol. 2, No. 1, 2010, pp. 13-34

Klanjšček T i Legović T. 2001. Toward a closed life support system for interplanetary missions, Ecological Modelling 138 (2001) 41-54

Lee, C.G., Palsson, B.Ř., 1995. Light emitting diode-based algal photobioreactor

with external gas exchange. J. Ferment. Bioeng. 79, 257– 263.

Levin SA. 1991. Mathematics and biology:The interface challenges and opportunities; Cornell University

Littler MM, Littler DS, Brooks BL. 2006. Harmful algae on tropical coral reefs: Bottom-up eutrophication and top-down herbivory, *Harmful Algae*, *Volume 5, Issue 5*, *Pages 565-585*

Li X, Hu HY, Gan K et al. 2010.a; Effects of different nitrogen and phosphorus concentration on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of freshwater microalga *Scenedesmus sp.,* Bioresurce technology 101, 5494-5500

Li X, Hong – ying H, Yu – ping Zhang 2010.b Growth and lipid accumulation properties of freshwater microalgae Scenedesmus sp. Under different cultivation temperature, Bioresurce technology 102 820119 3098 - 3102

Li Y, Wang B, Wu N, Lan CQ. 2008. a, Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans,* Applied Microbiology and biotechnology; 81(4):629-36

Li Y, Horsman M, Wu N, Lan CQ, Dubois-Calero N. 2008.b, Biofuels from microalgae, Biotechnology Progress, 24(4):815-20

Loosanoff VL, Davis HC. **1963.** Rearing of bivalve mollusks, U.S. Bureau of Commercial Fisheries biological laboratory, Milford, Connecticut

Makarevičienė V, Andrulevičiūtė V, Skorupskaitė V, Kasperovičienė J. 2011. Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp*.* as a Potentional Biofuel Feedstock, *Environmental Research, Engineering and Management*, No. 3(57), P. 21 – 27

Martinez Sancho ME, Jimenez Castilo JM, El Yousfi F. 1997. Influence of phosporus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus,* Process Biochemistry, Vol. 32, No. 8, pp 657-664

Mata TM, Martins AA,Caetano NS, 2009. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 217–232

May RM. 2004. Uses and Abuses of Mathematics in Biology, Zoology Department, Oxford University, Oxford OX1 3PS, UK,*Science* 303 (5659): 790-793

McKelvey S. 1996. Setting hunting quotas – modified logistic model, Workshop, Department of Mathematics, Saint Olaf College, Northfield, Minnesota

Melis A, Happe T, 2001. Hydrogen Production. Green Algae as a Source of Energy, Plant Physiology vol.127 no.3 740-748

Meyen FJF, 1829. Beobachtungen ueber einige niedere Algenformen. *Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae* 14: 768-778, pl. XLIII.

Moore LR, Goericke R, Chisholm SW. 1995. Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus:* Influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties, Mar. Eco. Prog. Ser., Vol 116: 259-275

Moroney JV, Ynalvez RA, 2009. Algal photosynthesis, Wiley and Sons, DOI: 10.1002/9780470015902.a0000322. pub2

Naoki S, Norio M, Yoshiro M, Nobuo U. 1979. Effect of growth temperature on lipid and fatty acid compositions in the blue-green algae, *Anabaena variabilis and anacystis nidulans*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, Vol 572, Issue 1, Pgs 19–28

Nicholls, K.H., Dillon, P.J., 1978. An evaluation of phosphorus–chlorophyll–phytoplankton relationships for lakes. Int. Rev. Hydrobiology. 63 (2), 141–154

Perales-Vela HV, Gonzalez-Moreno S, Montes-Horcasitas C, Canizares-Villanueva RO. 2007. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae), Chemosphere 67 (2007) 2274–2281

Pevalek – Kozlina B. 2003. Fiziologija bilja, Udžbenici Sveučilište u Zagrebu, Zagreb ISBN 953-200-775-x

Pulz, O i Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology Biotechnology 65, 635–648.

R Development Core Team, 2010. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org.

Rader K, 2004. Making mice, standardizing animals for american biomedical research 1900 – 1955, Princeton university press, New Jersey 08540

Raja R, Hemaiswarya S, Kumar NA, Sridhar S, Rengasamy R. 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. Critical Reviews in Microbiology, 34(2):77-88

Rajfur M, Kłos A, Wacławek M. 2012. Sorption of copper(II) ions in the biomass of algae *Spirogyra* sp., *Bioelectrochemistry*, *Volume 87*, *October 2012*, *Pages 65-70*

Richardson J.W., Johnson M.D., Outlaw J.L.2012. Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest, *Texas A&M University, Department of Agricultural Economics,* VOL 1. Issue 1 Algal research 93 – 100.

Ritz C, Streibig JC. 2005. Bioassay Analysis using R. *J Statist Software,* Vol 12, Issue 5.

Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson L, Betenbaugh MJ. 2008. A green light for engineered algae:redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution, Current Opinion in Biotechnology, 19(5):430-6

Seber GAF, Wild CJ. 1989. *Nonlinear Regression*, New York: Wiley & Sons (p. 330).

Sharov A. 1996. Quantitative Population Ecology Course, Department of Entomology, Virginia Tech, Blacksburg, VA

Shonkwiler RW, Herod J. 2009. Mathematical biology. Springer 2nd ed.

Thieme HR. 2003. Mathematics in population biology, Princeton series in theoretical and computational biology, Princeton University Press, ISBN 0-691-09290-7

Thom R.1993. Biological organisation: Its definition and mathematisation, in Mathematics Applied to Biology and Medicine (J. Demongeot, V. Cappasso, eds.) Wuerz, Winnipeg.

Tredici MR,1999. "Photobioreactors". *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*. John Wiley & Sons, Inc.. pp. 395–419.

Thornton A, Weinhart T, Bokhove O. 2010. Modeling and optimization of algae growth, Report, Mathematics of computatuinal Science, Universiry of Twente

Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae, Review, Bioresource Technology 99 (2008) 4021–4028

Venables WN, Smith DM, R Core Team. 2012. An Introduction to RNotes on R: A Programming Environment for Data Analysis and GraphicsVersion 2.15.1 (2012-06-22)

Wang B, Li Y, Wu N, Lan CQ,2008. CO_2 bio-mitigation using microalgae, Applied Microbiology and biotechnology 79 (5) :707 – 18

Xin L, Hong-ying H, Ke G, Ying-xue S. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.,* Bioresource Technology 101 (2010) 5494–5500

Yin-Hu W, Yin Y, Xin L, Hong-Ying H, Zhen-Feng S. 2012. Biomass production of a Scenedesmus sp. under phosphorous-starvation cultivation condition, Bioresource Technology 112 (2012) 193–198

YSI Environmental 2005. Why measure Chlorophyll, Tech Note, 0201 T606.

WEB ADRESE :

web 1 http://www.bionomicfuel.com/scientists-confirm-algae-is-the-most-effective alternative-energy-source-full/

web 2 http://www.cawthron.org.nz/aquatic-biotechnologies/overview.html

web 3 http://www.scienceimage.csiro.au/index.cfm?event=site.image.detail&id=719

web 4 http://www.scienceimage.csiro.au/index.cfm?event=site.image.detail&id=719

web 5 http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorophyll_a

web 6 http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorophyll_b

web 7 http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorophyll_b