

BESLEYİCİ ELEMENT KOMPOZİSYONUNDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİN MİKROALGLERDE LİPİD İÇERİĞİNE ETKİSİ

Leyla Uslu*, Oya Işık, Yasemin Mutlu

Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Adana

Özet:

Bu çalışmada *Isochrysis affinis galbana* (Prymnesiophyceae), *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) ve *Porphyridium cruentum* (Rhodellophyceae) türlerinde azot sınırlamasının büyüme, lipid ve klorofil *a* içerikleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada azot sınırlamasının *I. affinis galbana* ve *P. tricornutum*'da lipid içeriğinin yükselmesine sebep olduğu saptanmış, %50 azot eksilmesi yapılan çalışmada *I. affinis galbana*'da %30.91 lipid ve $0.755 \pm 0.03 \text{ gl}^{-1}$ biyomas, *P. tricornutum*'da %30.18 lipid ve $0.978 \pm 0.02 \text{ gl}^{-1}$ biyomas belirlenmiştir. Azotun tamamen çekildiği (%100 N(-)) çalışmada, *P. cruentum*'da lipid oranı (%11.23), diğer iki türe göre daha düşük bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Isochrysis affinis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum*, Lipid, N sınırlaması

Abstract:

The Effects of the Changes in the Composition of Nutrient on Lipid Content of Microalgae

In this study, the effects of nitrogen deficit on the growth rates, lipid and chlorophyll *a* contents of the species of *Isochrysis affinis galbana* (Prymnesiophyceae), *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) and *Porphyridium cruentum* (Rhodellophyceae) were examined. It was observed that nitrogen limitation increased the lipid content of *I. affinis galbana* and *P. tricornutum*. In the study subjected to 50% of nitrogen reduction, 30.91% lipid and $0.755 \pm 0.03 \text{ gl}^{-1}$ dry matter were detected in *I. affinis galbana*, and 30.18% lipid and $0.978 \pm 0.02 \text{ gl}^{-1}$ dry matter in the *P. tricornutum*. The study in which the nitrogen starvation (100% of nitrogen reduction) applied to *P. cruentum*, the lipid content(11.23%) was lower than the other two species.

Keywords: *Isochrysis affinis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum*, Lipid, N starvation

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi BAP Birimi tarafından desteklenmiş ve doktora tezinden özetlenmiştir.

* Correspondence to: Leyla USLU, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Balcalı Kampüsü 01330 Adana -TÜRKİYE

Tel: (+90 322) 338 60 84/2065 Fax: (+90 322) 338 64 39

E-mail: hizarcil@cu.edu.tr

Giriş

Son yıllarda mikroalgal biyoteknolojiye giderek artan ilgi, bazı mikroalg türlerinin hücre içinde yüksek miktarda biriktirmiş olduğu metabolitlerden kaynaklanmaktadır.

Algler çok uzun yıllardan beri farklı alanlarda kullanılmakta olup; hücrelerinde biriktirdikleri protein, vitamin, yağ asitleri, karbohidrat, mineral ve pigment, hidrokarbon, polisakkarit, antibiyotik ve daha birçok metabolitleri nedeniyle insanlar tarafından başlıca besin desteği olmak üzere değişik amaçlarla kullanılmaktadırlar. Bu nedenle II. Dünya savaşından buyana Amerika Birleşik Devletleri, Japonya, İngiltere, Almanya ve Norveç gibi gelişmiş ülkelerde mikroalglerin besinsel zenginliklerinden yararlanılmaktadır (Becker, 1994).

1970'li yıllarda değişik enerji kaynakları arayışı ile birlikte güneş enerjisi, dünyanın ilgisini üzerinde toplamıştır. Algler, güneş enerjisini etkin kullanan canlılardır ve bu nedenle de farklı mikroalg türlerinde yeni bileşenlerin keşfedilmesi amacıyla mikroalg üretim teknolojisine ilgi giderek artmaktadır.

Temel fitoplankton gruplarından alınan örnek türlerin kültürleri yapılarak, büyümeleri üzerine farklı fiziksel ve kimyasal faktörlerin etkilerinin saptanması, bu grupların doğal popülasyonlarının büyümeleri için gerekli olan sıcaklık, CO₂ düzeyi, besin kaynağının kalitesi ve düzeyi, ışığın yoğunluk ve süresi gibi kritik faktörlerin saptanması açısından da önemlidir (Cirik ve Gökpinar, 1999).

Mikroalgler deniz balıkları yetiştiriciliği ve kabukluların üretiminde larva beslemede canlı yem olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar ile mikroalglerin protein, lipid, polisakkarit, pigment, karotenoid, vitamin, sterol, enzim, antibiyotik ve daha pek çok kimyasal maddeler açısından zengin oldukları belirlenmiş ve biyokimyasal içeriklerinden yararlanma amacıyla son 20 yıldır büyük miktarlarda alg kültürleri yapılmaya başlanmıştır (Becker, 1994).

Mikroalglerin büyük ölçekli yığın kültürlerinden elde edilen biyomas ile bundan elde edilen protein, lipid, nişasta, gliserol, doğal pigment ve biyopolimer gibi metabolitlere olan ticari ilgi giderek artmaktadır. Birçok bilim adamı, mikroalgleri, uzun zincirli doymamış yağ asitleri kaynağı (PUFA), vitamin E, pigmentler ve steroller, protein ve aminoasit gibi diğer metabolitlerin

kaynağı olduğunu kabul etmişlerdir (Bandara ve ark., 2003).

Algal biyoteknolojideki gelişmelere rağmen mikroalg türlerinin kültürlerinde çeşitli güçlüklerle karşılaşmaktadır. Mikroalg kültürlerinde canlı kütlelerin biyokimyasal kompozisyonu, çevresel faktörler, besi ortamı, sıcaklık, tuzluluk, pH ve ışık gibi büyüme koşullarına bağlıdır (Sukennik, 1991).

Mikroalgler organik madde sentezini gerçekleştirmek için Karbon (C), Azot (N) ve Fosfor (P) gibi temel elementlere gereksinim duyarlar (Davis, 1977). Azot, enzim ve proteinlerin yapıtaşı olduğu için, yağ asitleri sentezi, algal hücrelerin protein fonksiyonları ve yapılaşmasında gereklidir. Azot kaynakları ve konsantrasyonları, alg kültürlerinde büyümeyi ve biyokimyasal kompozisyonu etkilemekte ve özellikle yağ asitleri değerlerinde ve karotenoid miktarında değişikliklere neden olmaktadır. Azot atomu karbohidratlar ve yağlar üzerinde etkilidir. Bunun yanı sıra N sınırlaması hücresel yağ asitleri ve hücresel büyüme ile ilişkili olduğundan, yağ asitleri bakımından zenginleştirmede N sınırlaması etkilidir. Mikroalg kültürlerinde N sınırlaması, biyomas ve klorofil *a* miktarlarında azalmaya neden olurken, mikroalglerin biyokimyasal yapısındaki yağlar gibi organik karbon bileşiklerinde artışa neden olmaktadır. Bu durumda mikroalglerin klorofil *a* oranı azalırken, karotenoidlerde artış olmaktadır (Shifrin ve Chisholm, 1981; Sukennik ve ark., 1989).

Son yıllarda, tek hücreli alglerden elde edilen yağ ve yağ asidi ürünleri oldukça dikkat çekmiştir. İlk olarak Solar Enerji Araştırma Enstitüsü biyoyakıt olarak algal yağların kullanımı üzerinde durmuştur (Neehan ve ark., 1986).

Enerji kaynağı olarak yenilenebilir, toksik olmayan, biyodizel yakıt kaynağı mikroalglerden yararlanma olanakları konusunda çalışmalar sürdürülmektedir. Bu amaçla yağ içeriği ve büyüme hızı yüksek mikroalg türlerinin belirlenmesi çalışmalarının yanında, hücre içinde mevcut yağ içeriğinin artırılmasını uyaran stres koşullarının belirlenmesi araştırmaları pek çok ülkede sürdürülmektedir (Converti ve ark., 2009; Damiani ve ark., 2010; Uslu ve ark., 2011).

Azot kaynağı ve düzeylerinin, algal kültürlerde büyüme ve biyokimyasal kompozisyonu etkileyen en önemli faktörlerden biri olduğu bi-

linmektedir (Xu ve ark., 2001). Bu çalışma, Prymnesiophyceae sınıfına ait *Isochrysis affinis galbana*, Bacillariophyceae sınıfına ait *Phaeodactylum tricorutum* ve Rhodellophyceae sınıfına ait *Porphyridium cruentum* türleri ile çalışılmıştır. *I. affinis galbana* iki kamçısı bulunan, haptoneması bulunmayan, sarı-kahverenkli tek bir kloroplastı olan, tek hücreli denizel bir türdür (Hoff ve Snell, 1987). Yüksek miktarda PUFA içermesinden dolayı akuakültürde özellikle bivalvia larvalarının beslenmesinde canlı yem kaynağı olarak kullanılmaktadır (Sánchez ve ark., 2000). Tek hücreli olan *Phaeodactylum tricorutum* oval ve fusiform hücre şekilleri olan pennat bir diyatom türüdür (Lewin, 1958). *P. tricorutum* %30-45 arasında PUFA içermekte ve bunun da %20-40'ını EPA oluşturmaktadır (Fajardo ve ark., 2007). EPA'nın kalp hastalıklarında, yüksek kolesterol tedavisinde, kandaki kolesterolü düşürmede ve romatizma riskinin azaltılmasında kullanıldığını ileri sürmüşlerdir (Dyerberg, 1986; Simopoulou, 1991; Durmaz, 2002'den). Rhodellophyceae sınıfına ait *Porphyridium cruentum* hücreleri tek başına ya da yığın bir şekilde düzensiz koloniler oluşturarak musilaj bir kılıfın içinde bulunurlar (Vonshak, 1988). Mikroalgal hücre metabolitleri daha çok dinlenme fazında üretilmektedir (Schlegel, 1985). Bu metabolitler organik asitler, karbohidrat, aminoasit, pestisit, vitamin, organik madde, antibiyotik, enzim ve toksik bileşenlerdir. *P. cruentum*'un kuru ağırlığının yaklaşık %28-39'unu protein, %40-57'sini karbohidrat ve %9-14'ünü de lipid oluşturur. Ayrıca tocopherol, K vitamini ve büyük miktarda da karotenoid içermektedir (Becker, 1994). Hücrelerin karakteristik kırmızı rengi, içerdiği fikokoitinlerden kaynaklanmaktadır (Gantt, 1981). Sınırlayıcı koşullar altında kültür viskoz bir yapı alır ve polisakkarit üretmeye başlar (Ramus ve ark., 1989).

Bu türlerde N sınırlamasının büyüme, lipid ve klorofil *a* üzerine etkisini belirlemek ve mikroalglerden yenilenebilir, toksik olmayan biyoyakıt eldesine kaynak oluşturmak amacıyla yürütülmüştür.

Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan *Isochrysis affinis galbana* ve *Phaeodactylum tricorutum* UTEX kültür koleksiyon laboratuvarından, *Porphyridium cruentum* Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinden temin edilmiştir.

Denemede, denizel türler için F/2 ve diatom türü için Si-F/2 kültür ortamı (Guillard, 1973) modifiye edilerek kullanılmıştır. Denemede kullanılan deniz suyunun tuzluluğu salinometre (Orion 3 Star) ile ölçüldükten sonra %30 olacak şekilde saf su ile ayarlanmıştır. Deneme kurulmadan önce besi ortamları 121°C'de 30 dakika süre ile otoklavda (Hirayama-HV-50L) steril edilmiştir.

Denemenin yürütüldüğü laboratuvarında sıcaklık, iklimlendirme cihazı (Arçelik, 24001) kullanılarak 22±2°C'de tutulmuştur. Deneme süresince kültürlerde 80µmolphotonm⁻²s⁻¹ ışık şiddeti kullanılmış, 16:8 saat aydınlık-karanlık periyodu uygulanmıştır. Uygulanan ışık şiddeti ışık metre (Licor, LI-250) ile ölçülmüştür. Işık kaynağı olarak floresan (Tekfen, TLD36 watt) lambalar kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan denizel türlerde lipid miktarları arasındaki farklılığı görmek amacıyla uygulanan muamelelerde besin eksikliği çalışılmış, bu amaçla F/2 ve Si-F/2 kültür ortamında bazı değişiklikler yapılmıştır. Besin eksikliği uygulamasında N elementi kültür ortamından birinci deney grubunda tamamen (%100) ve ikinci deney grubunda %50 oranında azaltılmıştır. F/2 besi ortamında 0.075gl⁻¹ NaNO₃ bileşiminde 882µmol⁻¹ N elementi bulunmaktadır. Kurulan muamele gruplarında 882µmol⁻¹ (kontrol), 441µmol⁻¹ (%50 N(-)) ve 0µmol⁻¹ (%100 N(-)) konsantrasyonunda N elementi olacak şekilde besi ortamı hazırlanmıştır.

Denemeler 8l'lik cam kavanozlarda 7l'lik kültür hacminde %20 aşılama yapılarak 3 tekrarlı olacak şekilde kurulmuştur. Denemenin başlangıç optik yoğunluk (OD), biyomas ve klorofil *a* değerini belirlemek amacıyla deneme kaplarından örnekler alınmıştır.

Günlük olarak klorofil *a* (Parsons ve Strickland, 1963), biyomas miktarı (Boussiba ve ark., 1992) ve optik yoğunluk belirlenmiştir. Optik yoğunluk *I. affinis galbana* türü için 680nm (Lin ve ark., 2007), *P. tricorutum* türü için 625nm (Acién Fernández ve ark., 2003) ve *P. cruentum* için 680nm (Kusmiyati, 2007) dalga boyunda visible spektrofotometre (Shimadzu, UV mini 1240) ile değerlendirilmiştir.

Deneme, kültürlerin duraklama fazının sonunda bitirilmiştir. Uygulanan muamelelere göre, deneme *I. affinis galbana* türü için kontrol grubu 11, %50 N(-) ve %100 N(-) grubu 7 gün devam etmiştir. *P. tricorutum* türü için kontrol, %50

N(-) ve %100 N(-) grubu 9'ar gün ve *P. cruentum* türü için kontrol grubu 18, %50 N(-) grubu 12 ve %100 N(-) grubu 7 gün sürmüştür.

Deneme sonunda geriye kalan kültürlerin tamamı 7500rpm dönme hızındaki soğutmalı santrifüj (Heraeus, Suprafuge 22) ile 10 dakika boyunca çöktürüldü. Elde edilen çöktürülmüş hücreler 55°C'de (Wenticell-111) 4 saat süreyle kurutularak lipid analizi için -21°C'de (Bosch-Dynamic No-Frost A) 15 gün süreyle saklanmıştır. Lipid değerleri yüzde biyomas oranına göre hesaplanmıştır. Lipid analizi Bligh ve Dyer (1959)'un uyguladığı yöntemle yapılmıştır.

Denemede uygulanan muamelelerden elde edilen verilerin kültürde OD, biyomas, klorofil *a* ve lipid değeri üzerine farklılık oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla, tek yönlü varyans analizi (ONE-WAY ANOVA) ve bu analizin sonucuna bağlı olarak farklılık oluşması durumunda farklılığı saptamak amacıyla Duncan çoklu karşılaştırma testi SPSSX 14.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır (Zar, 1999).

Bulgular ve Tartışma

Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Algal Biyoteknoloji Laboratuvarında farklı besi ortamının *I. affinis galbana*, *P. tricornutum* ve *P. cruentum* kültürlerinde optik yoğunluk (OD), biyomas miktarı ($g\ l^{-1}$), klorofil *a* ($\mu g\ l^{-1}$) ve lipid (%) içeriğine etkilerini belirlemek amacıyla kurulan deneme, uygulanan muamele gruplarına göre birbirinden farklı sürelerde tamamlanmıştır.

I. affinis galbana kontrol grubu ve 2 farklı besi ortamında kültüre alınmış ve her gruba ait

büyüme parametreleri belirlenmiştir. Uygulanan muamelelerin OD, biyomas, klorofil *a* ve lipid değeri üzerine etkisi istatistiksel olarak belirlenmiş ve farklılık olduğu saptanmıştır ($p<0.05$) (Tablo 1). Son gün elde edilen optik yoğunluk ve biyomas miktarlarına göre en yüksek değer kontrol grubunda elde edilmiş ve diğer 2 grup birbiriyle istatistiki olarak benzerlik göstermiştir. Klorofil *a* miktarı ise %100 N eksiltmesi yapılan grupta en düşük, en yüksek kontrol grubunda tespit edilmiştir. Denemenin son günü elde edilen lipid değerleri de istatistiki olarak farklı bulunmuş; en yüksek lipid eldesi %50 N eksiltmesi yapılan grupta 30.91 ± 1 olarak tespit edilmiştir.

P. tricornutum kontrol grubu ve 2 farklı besi ortamında kültüre alındığında uygulanan muamelelerin OD üzerine etkisi istatistiksel olarak farklılık yaratmamış ancak, biyomas, klorofil *a* ve lipid değerleri üzerine etkisi istatistiksel olarak farklılık yaratmıştır ($p<0.05$) (Tablo 2). Elde edilen son gün verilerine göre optik yoğunluklar 3 grupta da istatistiki olarak benzerlik gösterirken; biyomas miktarları karşılaştırıldığında en yüksek biyomasın kontrol grubunda elde edildiği ve diğer 2 grupta ise istatistiki olarak benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Klorofil *a* miktarları N eksiltme oranı arttıkça azalmalar göstermiş ve 3 grup birbirinden istatistiki olarak farklı bulunmuştur. En yüksek lipid oranı 30.18 ± 1 ile %50 N eksiltelen grupta saptanmıştır.

Tablo 1. *I. affinis galbana* büyüme değerleri ve lipid içeriklerinin karşılaştırılması

Table 1. Comparison of the growth values and lipid contents of *I. affinis galbana*

	Kontrol	%50 N(-)	%100 N(-)
Parametre (Son gün)			
OD ₆₈₀	0.381±0.02 ^a	0.137±0.005 ^b	0.129±0.004 ^b
Biyomas ($g\ l^{-1}$)	0.900±0.02 ^a	0.755±0.03 ^b	0.703±0.04 ^b
Klorofil <i>a</i> ($\mu g\ l^{-1}$)	1894.90±1 ^a	180.25±3 ^b	36.19±1 ^c
Lipid (%)	15.05±0.6 ^a	30.91±1 ^b	23.90±1 ^c

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen sütunlar ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0.05$), (n=3).

Tablo 2. *P. tricornutum* büyüme değerleri ve lipid içeriklerinin karşılaştırılması**Table 2.** Comparison of the growth values and lipid contents of *P. tricornutum*

	Kontrol	%50 N(-)	%100 N(-)
Parametre (Son gün)			
OD ₆₂₅	0.370±0.01 ^a	0.336±0.02 ^a	0.332±0.01 ^a
Biyomas (g l ⁻¹)	1.061±0.02 ^a	0.978±0.02 ^b	0.922±0.05 ^b
Klorofil <i>a</i> (µg l ⁻¹)	719.87±1 ^a	306.45±3 ^b	248.13±5 ^c
Lipid (%)	20.50±0.7 ^c	30.18±1 ^a	24.03±0.1 ^b

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen sütunlar ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır (p<0.05), (n=3).

P. cruentum türünde uygulanan muamelelerin OD, biyomas, klorofil *a* ve lipid değeri üzerine etkisi istatistiksel olarak belirlenmiş ve farklılık olduğu tespit edilmiştir (p<0.05) (Tablo 3). Son gün elde edilen verilere göre en yüksek OD, biyomas ve klorofil *a* değerlerinin kontrol grubunda, en düşük değerlerin ise %100 N eksilmesi uygulanan grupta elde edildiği saptanmıştır. Lipid miktarı %100 N eksilmesi uygulanan grupta en yüksek çıkarken, en düşük kontrol grubunda çıkmıştır (p<0.05).

I. affinis galbana, *P. tricornutum* ve *P. cruentum* türlerinin farklı N konsantrasyonlarına göre büyümeleri birbirinden farklı olup; biyomas verimlilikleri ve lipid içerikleri de birbirinden farklı bulunmuştur. *I. affinis galbana* türünde biyomas ve lipid miktarları, uygulanan muamele

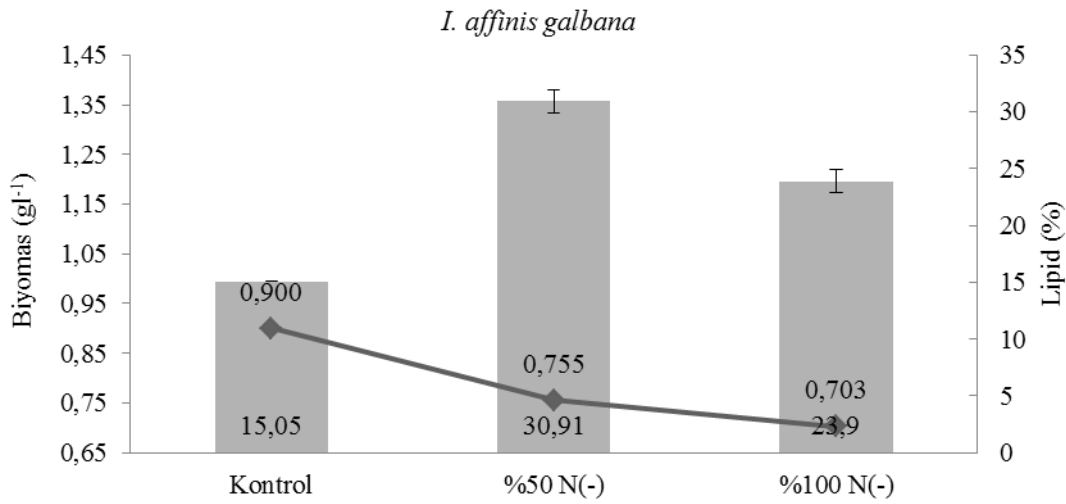
gruplarına göre farklılık göstermiştir. En fazla lipid oranı %30.91 ve 0.755±0.03g l⁻¹ biyomas ile %50 N(-) uygulanan grupta elde edilmiştir. En düşük biyomas miktarı 0.703±0.04g l⁻¹ ile %100 N(-) uygulanan muamele grubunda gözlenirken; lipid oranı %23.90 olarak bulunmuştur. En fazla biyomasa sahip olan kontrol grubunda ise lipid oranı %15.05 olarak bulunmuştur (Şekil 1).

P. tricornutum'da en yüksek lipid düzeyi %50 N(-) uygulanan grupta %30.18 ile bulunurken, biyomas miktarı 0.978±0.02g l⁻¹ olarak tespit edilmiştir. En düşük biyomasın (0.922±0.05g l⁻¹) tespit edildiği %100 N(-) uygulanan muamele grubunda lipid oranı %24.03 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise biyomas en yüksek, lipid ise en düşük bulunmuştur (Şekil 2).

Tablo 3. *P. cruentum* kültürlerinde büyüme değerleri ve lipid içeriklerinin karşılaştırılması**Table 3.** Comparison of the growth values and lipid contents of *P. cruentum*

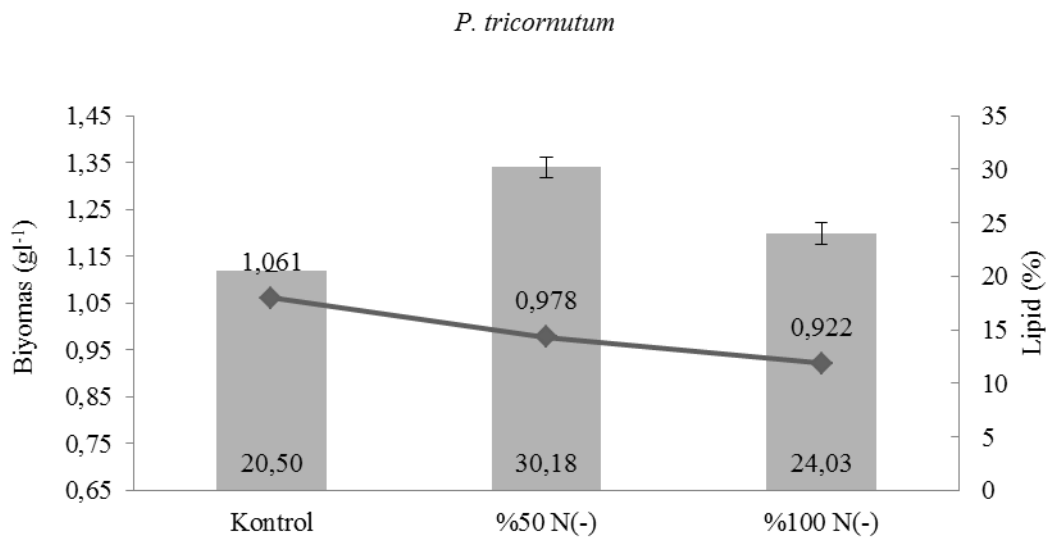
	Kontrol	%50 N(-)	%100 N(-)
Parametre (Son gün)			
OD ₆₈₀	0.577±0.08 ^a	0.469±0.05 ^b	0.346±0.01 ^c
Biyomas (g l ⁻¹)	1.327±0.06 ^a	1.177±0.01 ^b	0.938±0.04 ^c
Klorofil <i>a</i> (µg l ⁻¹)	298.23±4 ^a	159.71±7 ^b	68.40±0.7 ^c
Lipid (%)	7.44±0.2 ^c	9.50±0.9 ^b	11.23±0.4 ^a

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen sütunlar ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır (p<0.05), (n=3).



Şekil 1. *I. affinis galbana*'ya ait lipid ve biyomas miktarları

Figure 1. The lipid and biomass amounts to *I. affinis galbana*



Şekil 2. *P. tricornutum*'a ait lipid ve biyomas miktarları

Figure 2. The lipid and biomass amounts to *P. tricornutum*

P. cruentum türünde en fazla lipid oranı %11.23 ile %100 N(-) uygulanan muamele grubunda tespit edilirken, en düşük biyomas $0.938 \pm 0.04 \text{ gl}^{-1}$ ile yine aynı grupta belirlenmiştir. %50 N(-) yapılan grupta lipid oranı %9.50 ve biyomas $1.177 \pm 0.01 \text{ gl}^{-1}$ olarak bulunmuştur. En düşük lipid miktarı %7.44, $1.327 \pm 0.06 \text{ gl}^{-1}$ ile en yüksek biyomasa sahip olan kontrol grubunda tespit edilmiştir (Şekil 3).

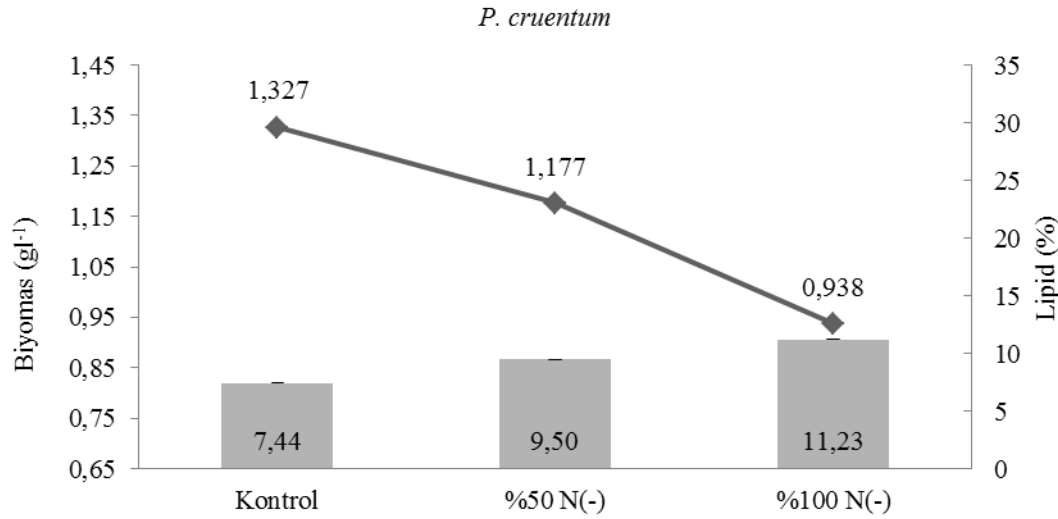
I. affinis galbana, *P. tricornutum* ve *P. cruentum* türlerine uygulanan muamelelerin türler

arasında istatistiki olarak karşılaştırılması yapılmış olup, Tablo 4 ve Tablo 5'te verilmiştir. Türlerin kontrol grubuna ait biyomas miktarları birbirinden farklı olup, en yüksek biyomas *P. cruentum*'da bulunurken; en düşük biyomas *I. affinis galbana*'da bulunmuştur. Azot eksiltme oranı arttıkça biyomas miktarı tüm türlerde azalma göstermiş olup, en düşük biyomas %50 N(-) yapılan grupta *I. affinis galbana*'da tespit edilmiştir. Bu muamele grubu; türlerin biyomas miktarları üzerine istatistiksel olarak farklılık yaratmış; en yüksek biyomas *P. cruentum*'da belirlenmiştir.

%100 N(-) uygulanan grupta biyomas miktarları istatistiksel olarak farklılık yaratmış olup; en düşük biyomas *I. affinis galbana*'da tespit edilirken; *P. tricornutum* ve *P. cruentum*'da biyomas miktarları benzerlik göstermektedir ($p>0.05$).

Türlere uygulanan muameleler sonucunda elde edilen lipid miktarları tüm türlerde kontrol grubunda düşük ve farklı çıkarken ($p<0.05$); %50 N(-)

) uygulaması yapılan türlerde en yüksek lipid oranı *I. affinis galbana* ve *P. tricornutum* türünde benzer bulunmuştur ($p<0.05$). *P. cruentum* türüne ait en yüksek lipid oranı ise %100 N(-) yapılan grupta bulunmuş ancak, diğer 2 türe göre lipid oranı bu muamele grubunda en düşük olarak tespit edilmiştir ($p<0.05$).



Şekil 3. *P. cruentum*'a ait lipid ve biyomas miktarları

Figure 3. The lipid and biomass amounts to *P. cruentum*

Tablo 4. Türler için biyomas miktarlarının karşılaştırılması

Table 4. Comparison of biomass amounts of the species

Tür	Biyomas miktarları (gl ⁻¹)		
	Kontrol	%50 N(-)	%100 N(-)
<i>I. affinis galbana</i>	0.900±0.02 ^a	0.755±0.03 ^a	0.703±0.04 ^a
<i>P. tricornutum</i>	1.061±0.02 ^b	0.978±0.02 ^b	0.922±0.05 ^b
<i>P. cruentum</i>	1.327±0.06 ^c	1.177±0.01 ^c	0.938±0.04 ^b

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen satırlar ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0.05$), (n=3).

Tablo 5. Türler için lipid miktarlarının karşılaştırılması

Table 5. Comparison of lipid contents of the species

Tür	Lipid içerikleri (%)		
	Kontrol	%50 N(-)	%100 N(-)
<i>I. affinis galbana</i>	15.05±0.6 ^b	30.91±1 ^a	23.90±1 ^a
<i>P. tricornutum</i>	20.50±0.7 ^a	30.18±1 ^a	24.03±0.1 ^a
<i>P. cruentum</i>	7.44±0.2 ^c	9.50±0.9 ^b	11.23±0.4 ^b

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen satırlar ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0.05$), (n=3).

Fiziksel koşullar ile birlikte kültür ortamında kullanılan besleyici elementler ile bunların konsantrasyonları mikroalgal büyüme ve mikroalgin biyokimyasal yapısı üzerinde değişikliklere neden olabilir. Büyüme, besi ortamlarında kullanılan besleyici elementin çeşidinin yanı sıra konsantrasyonları da etkilemektedir (Brown ve ark., 1989). Bu çalışmada birçok mikroalg türü için uygun olan F/2 besi ortamı kullanılmıştır.

Farklı N kaynakları ve konsantrasyonlarının mikroalglerin büyüme ve biyokimyasal yapısında etkili olduğu bilinmektedir (Gökınar, 1991; Fidalgo ve ark., 1995). F/2 besi ortamında N kaynağı olarak $\text{NO}_3\text{-N}$ 'u kullanılmaktadır. Bu çalışmada $882\mu\text{mol}^{-1}$ $\text{NO}_3\text{-N}$ 'u temel alınmış (Guillard, 1973), bununla birlikte besi ortamına eklenen N kaynağında %50 oranında ($441\mu\text{mol}^{-1}$) ve %100 oranında ($0\mu\text{mol}^{-1}$) azaltma yolu ile N sınırlaması gerçekleştirilmiştir. Ortamdaki N düzeyleri *I. affinis galbana*, *P. tricornutum* ve *P. cruentum*'da büyüme etkileyen parametrelerden olmuştur. Azot sınırlamasının %50 ve %100 yapıldığı her üç türde de OD ve biyomas miktarlarında düşüşlerin olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada düşük N konsantrasyonunun *N. oculata*'da büyüme hızını düşürdüğü, *C. vulgaris*'te ise etkilemediği belirlenmiştir (Converti ve ark., 2009). Xu ve ark. (2001), *Ellipsoidion* sp.'yi farklı N kaynakları ve azotsuz ortamda kültüre almışlardır. Çalışmada azotsuz ortamdaki kültürde büyümenin düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Alglerin lipid içerikleri ile birlikte elde edilen biyomas miktarları da önem taşımaktadır. Azot eksikliği uygulanan kültürlerde genellikle biyomas düşmektedir. Thomas ve ark. (1984), *P. tricornutum*'u hücrelere yetecek kadar N bulunan bir ortamda ve N eksikliğinin yapıldığı bir ortamda kültüre almış ve biyomas miktarının N eksikliği uygulanan besi ortamında düşük olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan benzer çalışmalarda da N sınırlanmasının türlerde hücre yoğunluğunun düşmesine ve biyomas miktarlarında azalmalara neden olduğu belirtilmiştir (Kilham ve ark., 1997; Pruvost ve ark., 2009). Bu çalışmada *I. affinis galbana*'da en düşük biyomas miktarı %23.9 lipid elde edilen %100 N(-) uygulanan grupta $0.703\pm 0.04\text{gl}^{-1}$ olarak, *P. tricornutum*'da en düşük biyomas %100 N(-) uygulanan grupta $0.922\pm 0.05\text{gl}^{-1}$ olarak, *P. cruentum* türünde de en düşük biyomas en fazla lipid oranına sahip olan %100 N(-) uygulanan grupta $0.938\pm 0.04\text{gl}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ile bu çalışmadan elde edilen biyomas miktarındaki azal-

malar benzerlik göstermekte olup; N sınırlamasının türleri strese sokup büyümeyi yavaşlattığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

Azot eksikliği uygulaması birçok türde lipid oranını artırmaktadır. Yapılan bu çalışma stres faktörlerinden N eksikliğinin *I. affinis galbana*, *P. tricornutum* ve *P. cruentum* türlerinde hücresel yağ içeriğine etkisini belirlemek üzere planlanmış ve kültürlerde büyüme periyodu sonunda ortalama lipid miktarları karşılaştırılmıştır. Kültürlerde muamelelere göre belirlenen ortalama % lipid değerleri arasında önemli bir fark olduğu belirlenmiştir. Muamelelerden elde edilen sonuçlara göre uygulanan N eksikliği ile stres oluşturulması türlerde lipid miktarında artışa neden olmuştur. Yapılan bu çalışmada %50 N(-) uygulanan gruplarda *I. affinis galbana* %30.91, *P. tricornutum* %30.18 ile en yüksek lipid elde edilirken; *P. cruentum* türünde en yüksek lipid %11.23 ile %100 N(-) yapılan grupta bulunmuştur. Yürütülen bazı çalışmalarda N eksikliğinde *P. tricornutum*'un yüksek miktarda lipid biriktirdiği (Thomas ve ark., 1984); *I. galbana*'da N miktarının yükseltildiğinde lipid oranının %22'den %16.9'a düştüğü (Utting, 1985); azot açlığında *Porphyridium cruentum*'un lipid içeriğini 2 katına çıkardığı (Piorreck ve Pohl, 1984) bildirmişlerdir.

Azot sınırlamasının büyüme yavaşlattığı ancak lipid oranını artırdığı *Dunaliella tertiolecta*, *N. Oloebundas*, *I. affinis galbana*, *B. braunii*, *D. salina*, *Nannochloropsis* sp., *N. oculata*, *C. vulgaris*, *P. tricornutum*, *Chaetoceros* sp., *I. galbana*, *P. lutheri*, *N. atomus*, *Tetraselmis* sp. ve *Gymnodinium* sp., *H. pluvialis* ve *S. platensis* gibi pek çok mikroalg türünde belirlenmiştir (Fabregas ve ark., 1989; Tornabene ve ark. 1983; Sukenik ve Wahnnon 1991; Zhila ve ark., 2005; Weldy ve Huesemann, 2007; Rodolfi ve ark., 2009; Converti ve ark., 2009; Reitan ve ark., 1994; Damiani ve ark., 2010; Uslu ve ark., 2011). Bu çalışmada da benzer şekilde azot sınırlaması büyüme hızını yavaşlatmış, bununla birlikte hücresel lipid oranını artırmıştır. Ancak burada önemli olan artan yağ içeriğinin ekonomik olarak değerlendirilebilmesi amacıyla biyomas oranının makul düzeylerde elde edilebilmesidir.

Lipid üretimine etki eden faktörlerden biri de uygulanan aydınlanma süresidir. Aydınlanma süresi uzadıkça hücre yoğunlukları artmaktadır. 18 saatlik aydınlanma süresi ile 12 saatlik aydınlanma süresi karşılaştırıldığında, hücre konsantrasyonları arasında farkın fazla olmadığı ve maksimum hücre yoğunluğuna ulaşıldığı bildirilmiştir

(Oh ve ark., 2009). Bu çalışmada kültürlere 16:8 aydınlık-karanlık periyodu ve $80 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti uygulanmıştır. Oh ve ark., (2009) *P. cruentum* türünü farklı büyüme koşullarında kültüre alarak en fazla yağ oranını %19.3 ile 12:12 aydınlık-karanlık periyodu uygulanan grupta saptamışlardır. Renaud ve ark. (2002), *Isochrysis* sp., *Chaetoceros* sp., *Rhodomonas* sp. ve *Cryptomonas* sp. türlerini 12:12 aydınlık-karanlık periyodu uygulayarak kültüre almışlar ve en yüksek lipid oranını %21.7 ile *Isochrysis* sp.'de belirlemişlerdir. Bandarra ve ark., (2003) yaptıkları çalışmada *I. galbana*'yı 2 farklı aydınlanma zamanında (24 saat devamlı ışık ve 16:8 aydınlık-karanlık periyodu) kültüre almış ve en yüksek PUFA oranının 8 saatlik aydınlanma yapılan kültürlerde meydana geldiğini bildirmişlerdir. Araştırmacıların bildiriyle yapılan bu çalışmalar ile uygulanan aydınlık-karanlık periyodunun yağ artışı olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır.

Alg kültürlerinin farklı fazlarında elde edilen biyomasın biyokimyasal içerikleri farklılıklar göstermektedir. Lipid miktarı kültürün yaşıyla artış göstermektedir. Durgunluk fazında elde edilen lipid miktarı diğer fazlara göre daha yüksektir (Liang ve ark., 2002). Bu çalışmada türler durgunluk fazının sonunda hasat edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *Cylindrotheca* türünde (Liang ve ark., 2002) ve *I. galbana* (Fidalgo ve ark., 1998)'da en yüksek lipid miktarları duraklama fazında elde edilmiştir.

Mikroalg kültürlerinde N sınırlamasının metabolitler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, hücre sayısı ve klorofil *a* miktarlarında azalma saptanırken, yağ gibi organik karbon bileşikler oranlarında artış kaydedilmiştir. Bununla birlikte kültürlerde karoten miktarının artmasına bağlı olarak renkte sararma gözlenmiştir (Shifrin ve Chisholm, 1981; Sukenik ve ark., 1989). Yürütülen bu çalışmada her üç türde de %50 N ve %100 N(-) yapılan kültürlerde klorofil içeriğinde azalmalar meydana gelmiştir. En düşük klorofil *a* düzeyi her üç türde de %100 N(-) grupta bulunmuş, *I. affinis galbana*'da $36.9 \mu\text{g l}^{-1}$, *P. tricornutum*'da $248.1 \mu\text{g l}^{-1}$ ve *P. cruentum*'da $68.4 \mu\text{g l}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. N sınırlaması yapılan tüm kültürlerde renkte sararma gözlenmiştir.

Kültürlerden elde edilen OD değerlerine baktığımızda, *I. affinis galbana* türünde en yüksek OD değeri kontrol grubunda belirlenirken, diğer 2 grupta istatistiki olarak benzerlik bulunmuştur.

Ancak gözlem değeri en düşük bulunan grup %100 N(-) yapılan grup olmuştur. *P. tricornutum* türünde ise 3 grupta da elde edilen OD değeri istatistiksel olarak benzer olmasına rağmen, gözlem değeri en yüksek kontrol grubu olurken, en düşük grup yine diğer türde olduğu gibi %100 N(-) yapılan grup olmuştur. *P. cruentum* türünde en yüksek OD kontrol grubunda en düşük ise %100 N(-) yapılan grupta tespit edilmiştir. Bu durum bize diğer parametrelerde olduğu gibi, N eksilmesi yapılan gruplarda optik yoğunluğun daha düşük olduğu sonucunun elde edilmesini sağlamıştır.

Sonuç

Elde edilen bulgulara göre, özellikle *P. tricornutum* türünün kültürünün kolay, biyomas miktarı ve yağ içeriğinin yüksek olması nedeniyle endüstriyel boyutlara taşınması kuvvetle önerilebilir. Bu amaçla *P. tricornutum*'un dışarı ortamda fotobiyoreaktör sistemde ve açık havuzlarda süreklilik çalışmaları önerilmekte ve elde edilen biyomasın biyoyakıtı dönüştürülerek alternatif yakıt kaynağı olarak değerlendirilmesi araştırılmalıdır.

Kaynaklar

- Acien Fernández, F.G., Hall, D.O., Cañizares Guerrero, E., Krishna Rao, K. and Molina Grima, E., (2003). Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor, *Journal of Biotechnology*, **103**:137-152.
doi: [10.1016/S0168-1656\(03\)00101-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00101-9)
- Bandarra, N.M., Pereira, P.A., Batista, I., Vilela, H., (2003). Fatty acids, sterols and α -tocopherol in *Isochrysis galbana*, *Journal of Food Lipids*, **10**(1):25-34.
doi: [10.1111/j.1745-4522.2003.tb00003.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2003.tb00003.x)
- Becker, E.W., (1994). Microalgae biotechnology and microbiology, Cambridge University Press, Cambridge.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**:911-917.
doi: [10.1139/o59-099](https://doi.org/10.1139/o59-099)
- Boussiba, S., Fan, L., Vonshak, A., (1992). Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *H. pluvialis*, *Methods in Enzymology*, **213**: 386-391.

- doi:** [10.1016/0076-6879\(92\)13140-S](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)13140-S)
- Brown, M.R., Jeffry, S.W., Garland, C.D., (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review, CSIRO Mar. Lab. Rep. 205-244.
- Cirik, S., Gökpinar, Ş., (1999). Plankton Bilgisi ve Kültürü, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No:47, Ders kitabı, 2.baskı. İzmir.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M., (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *Chemical Engineering and Processing*, **48**: 1146-1151.
doi: [10.1016/j.cep.2009.03.006](https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006)
- Damiani Cecilia, M., Popovich, C.A., Constenla, D. and Leonardi, P.I., (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock, *Biore-source Technology*, **101**(11): 3801-3807.
doi: [10.1016/j.biortech.2009.12.136](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.136)
- Davis, A.R., (1977). Principles of Oceanography, University of South Florida Aquafarms, Inc., Florida.
- Durmaz, Y., Işık, O., Bandarra, N.M, Cirik, S., Turan, G., Gökpinar, Ş., (2002). *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) Yağ Asitleri Kompozisyonuna Kurutma Yöntemlerinin Etkisi, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, **19**(1-2):189-195.
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., (1989). Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate, *Aquaculture*, **83**(3-4): 289-304.
doi: [10.1016/0044-8486\(89\)90041-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90041-0)
- Fajardo, A.R., Cerdan, L.E., Medina, A.R., Fernandez, F.G.A., Moreno, P.A.G., Grima, E.M., (2007). Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornerutum*, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**: 120-126.
doi: [10.1002/ejlt.200600216](https://doi.org/10.1002/ejlt.200600216)
- Fidalgo, J.P., Cid, A., Abalde, J. and Herrero, C., (1995). Culture of the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* with different nitrogen sources: growth, nutrient conversion and biochemical composition, *Cahiers de Biologie Marine*, **36**: 165-173.
- Fidalgo, J.P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A. and Herrero, C., (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipids classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, **166**(1-2): 105-116.
doi: [10.1016/S0044-8486\(98\)00278-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00278-6)
- Gantt, E., (1981). Phycobilisomes, *Annual Review of Plant Physiology*, **32**: 327-347.
doi: [10.1146/annurev.pp.32.060181.001551](https://doi.org/10.1146/annurev.pp.32.060181.001551)
- Gökpinar, Ş., (1991). Akuakültürde önemli beş deniz flagellatının inorganik N alımları üzerine sıcaklık değişimlerinin etkisi, *Doktora Tezi*, Dokuz Eylül Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, İzmir.
- Guillard, R.R.L., (1973). Division Rates, in Stein, R.J. eds, *Handbook of Phycological Methods*, Culture Methods and Growth Measurement, Cambridge Univ. Press, 283-311, New York.
- Hoff, F.H., Snell T.W., (1987). Plankton Culture Manual, Florida Aqua Farms, Dade City.
- Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Goulden, C.A., Lynn, S.G., (1997). Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*, *Freshwater Biology*, **38**: 591-596.
doi: [10.1046/j.1365-2427.1997.00231.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1997.00231.x)
- Kusmiyati, N.W.S.A., (2007). Antibacterial activity assay from *Porphyridium cruentum* microalgae, *Biodiversitas*, **8**(1): 48-53.
- Lewin, J.C., (1958). The Taxonomic Position of *Phaeodactylum tricornerutum*, *Journal of General Microbiology*, **18**: 427-432.
doi: [10.1099/00221287-18-2-427](https://doi.org/10.1099/00221287-18-2-427)
- Liang, Y., Mai, K., Sun, S., (2002). Effects of harvest stage on the total lipid and fatty acid composition of four *Cylindrotheca* strains, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **20**(2): 157-161.
doi: [10.1007/BF02849653](https://doi.org/10.1007/BF02849653)
- Lin, Y.H., Chang, F.L., Tsao, C.Y., Leu, J.Y., (2007). Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of

- Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor, *Biochemical Engineering Journal*, **37**(2): 166-176.
doi: [10.1016/j.bej.2007.04.014](https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.04.014)
- Neenan, B., Feinberg, D., Hill, A., McIntosh, R., Terry, K., (1986). Fuels from microalgae: Technology status, potential, and research requirements, Publ. No. SERi/SP-231-2550, Solar Energy Research institute.
doi: [10.2172/6685301](https://doi.org/10.2172/6685301)
- Oh, H.S., Han, J.G., Kim, Y., Ha, J.H., Kim, S.S., Jeong, M.H., Jeong, H.S., Kim, N.Y., Cho, J.S., Yoon, W.B., Lee, S.Y., Kang, D.H. And Lee, H.Y., (2009). Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **108**(5): 429-434.
doi: [10.1016/j.jbiosc.2009.05.020](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.05.020)
- Parsons, T.R., Strickland, J.D.H., (1963). Discussion of Spectrophotometric Determination of Marine Plant Pigments, with Revised Equations for Ascertaining Chlorophylls and Carotenoids, *Journal of Marine Research*, **21**(3): 115-163.
- Piorreck, M., Pohl, P., (1984). Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acid in green and bluegreen algae during one growth phase, *Phytochemistry*, **23**: 217-223.
doi: [10.1016/S0031-9422\(00\)80305-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80305-2)
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., Legrand, J., (2009). Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor, *Bioresource Technology*, **100**(23): 5988-5995.
doi: [10.1016/j.biortech.2009.06.004](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.004)
- Ramus, J., Kenney, B.E., Shaughnessy, E.J., (1989). Drag reducing properties of microalgal exopolymers, *Biotechnology and Bioengineering*, **33**: 550-556.
doi: [10.1002/bit.260330506](https://doi.org/10.1002/bit.260330506)
- Retan, K.J., Rainuzzo, J.R., Olsen, Y., (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae, *Journal of Phycology*, **30**(6): 972-979.
doi: [10.1111/j.0022-3646.1994.00972.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00972.x)
- Renaud, M.S., Thinh, V.L., Lambrinidis, G., Parry, L.D., (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures, *Aquaculture*, **211**(1-4): 195-214.
doi: [10.1016/S0044-8486\(01\)00875-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00875-4)
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*, **102**(1): 100-112.
doi: [10.1002/bit.22033](https://doi.org/10.1002/bit.22033)
- Sánchez, S., Martínez, M., Espinola, F., (2000). Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium, *Biochemical Engineering Journal*, **6**(1): 13-18.
doi: [10.1016/S1369-703X\(00\)00071-1](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00071-1)
- Schlegel, H.G., (1985). Allgemeine Microbiologie, Thieme, Stuttgart, 571p.
- Shifrin, N.S., Chisholm, S.W., (1981). Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles, *Journal of Phycology*, **17**(4): 374-384.
doi: [10.1111/j.0022-3646.1981.00374.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1981.00374.x)
- Sukenik, A., Wahnou, R., (1991). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*, *Aquaculture*, **97**(1): 61-72.
doi: [10.1016/0044-8486\(91\)90279-G](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90279-G)
- Sukenik, A., (1991). Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae), *Bioresource Technology*, **35**(3): 263-269. doi: [10.1016/0960-8524\(91\)90123-2](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90123-2)
- Sukenik, A., Carmeli, Y., Berner, T., (1989). Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp., *Journal of Phycology*, **25**(4): 686-692.
doi: [10.1111/j.0022-3646.1989.00686.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1989.00686.x)
- Thomas, W.H., Seibert, D.L.R., Alden, M., Natori, A., Eldridge, P., (1984). Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. I. Introduction and *Phaeodactylum tricorutum* experiments, *Biomass*, **5**(3): 181-209.

- doi: [10.1016/0144-4565\(84\)90022-2](https://doi.org/10.1016/0144-4565(84)90022-2)**
- Tornabene, T.G., Holzer, G., Lien, S., Burris, N., (1983). Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*, *Enzyme and Microbial Technology*, **5**(6): 435-440.
- Uslu, L., Işık, O., Koç, K., Göksan, T., (2011). The effects of nitrogen deficiencies on the lipid contents of *Spirulina platensis*, *African Journal of Biotechnology*, **10**(3): 386-389.
- Utting, S.D., (1985). Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance, *Aquacultural Engineering*, **4**(3): 175-190.
doi: [10.1016/0144-8609\(85\)90012-3](https://doi.org/10.1016/0144-8609(85)90012-3)
- Vonshak, A., (1988). *Porphyridium*, in Borowitzka MA, Borowitzka LJ eds, *Micro-algal biotechnology*, Cambridge University Press, Cambridge, 122-134.
- Weldy, C.S., Huesemann, M., (2007). Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity, *U.S. Department of Energy Journal of Undergraduate Research*, **7**(1): 115-122.
- Xu, N., Zhang, X., Fan, X., Han, L. and Zeng, C., (2001). Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (Eustigmatophyta), *Journal of Applied Phycology*, **13**(6): 463-469.
doi: [10.1023/A:1012537219198](https://doi.org/10.1023/A:1012537219198)
- Zar, J.H.,(1999). *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River. Prentice Hall, New Jersey. 4th Edition. Cap 12, 231-272.
- Zhila, N.O., Kalacheva, G.S. and Volova, T.G., (2005). Effect of nitrogen limitation on the growth and lipid composition of the green alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252, *Russian Journal of Plant Physiology*, **52**(3): 357-365.