

Azot Kaynakları ve Konsantrasyonlarının *Nannochloropsis oculata* (Droop, 1955) (Eustigmatophyceae)'nın Büyüme ve Pigment Kompozisyonuna Etkisi

Yaşar Durmaz

Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 35100, Bornova, İzmir, Türkiye
E mail: yasar.durmaz@ege.edu.tr

Abstract: Effects of nitrogen sources and concentration on the growth and pigment composition of the *Nannochloropsis oculata* (Droop, 1955) (Eustigmatophyceae). Effects of nitrogen sources and concentration on the production of carotenoids and chlorophyll *a* of the *Nannochloropsis oculata* were examined. *N. oculata* were grown in laboratory, 2 L erlens as batch cultures in sterilized seawater enriched with F/2 medium (salinity 2.5 ‰). Cultures were kept at 18±1°C under controlled temperature conditions. Sodium nitrate, ammonium chloride and urea were used as the nitrogen sources. It was arranged combinations of two different concentrations in the medium (882 and 441 µmol L⁻¹). The main pigments of *N. oculata* were determined by TLC method as β-carotene, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, violaxanthin, canthaxanthin, astaxanthin and vaucherixanthin. Total carotenoids and chlorophyll *a* were highest at 882 µmol L⁻¹ NO₃⁻-N in first harvest samples (4.17±0.37 mg g⁻¹ dry weight (dw) and 12.42±1.08 mg g⁻¹ dw, respectively). NO₃⁻-N and NH₄⁺-N as a inorganic nitrogen sources for *N. oculata* obtained same growth rate and biochemical composition. But urea-N as a nitrogen source for this species determined to be unsuitable source.

Key Words: Mikroalgler, *Nannochloropsis oculata*, karoten, β-karoten, chlorofil *a* and TLC.

Özet: Azot kaynakları ve konsantrasyonlarının *Nannochloropsis oculata* türünün karotenoidler ve klorofil *a* üretimi üzerine etkileri incelendi. *N. oculata*, laboratuvarında 2 L'lik erlenlerde, F/2 besin ortamı ile zenginleştirilmiş steril deniz suyunda yığın kültürleri yapıldı (Tuzluluk ‰ 2.5). Kültürler 18±1°C sabit sıcaklıkta tutuldu. Azot kaynakları olarak sodyum nitrat, amonyum klorür ve üre olarak kullanıldı. Azot kaynakları besin ortamlarına 882 ve 441 µmol L⁻¹ konsantrasyonlar kullanıldı. Denemeler sonunda β-Karoten, klorofil-*a*, klorofil-*b*, violaksantin, kantaksantin, astaksantin, vokeriyaksantin ve zeaksantin *N. oculata*'da ana pigmentler olarak TLC yöntemi ile saptandı. Toplam karotenoidler ve klorofil *a* düzeyleri bakımından en yüksek değerler 882 µmol L⁻¹ NO₃⁻-N ile hazırlanan besin ortamında ilk alınan örneklerde elde edildi (değerler sırasıyla, 4.17±0.37 mg g⁻¹ dw ve 12.42±1.08 mg g⁻¹ dw). *N. oculata* türü için inorganik azot kaynaklarından NO₃⁻-N ve NH₄⁺-N ile büyüme ve biyokimyasal yapısı açısından benzer sonuçlar elde edildi. Fakat üre-N'nun bu tür için uygun kaynak olmadığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Mikroalgler, *Nannochloropsis oculata*, karoten, β-karoten, klorofil *a* ve TLC.

Giriş

Nannochloropsis Eustigmatophyceae sınıfı üyesidir. 1981 yılında Hibbered tarafından *Nannochloropsis* olarak adlandırılmıştır (Maruyama ve diğ., 1986; Rodolfi ve diğ., 2003). Bu mikroalg türü genellikle balık çiftliklerinde rotifer besini ve yeşil su tekniği için balık larvalarının beslenmesinde kullanılır (Lubzens ve diğ., 1995; Rodolfi ve diğ., 2003; Zittelli ve diğ., 2004; Hu, 2004). *Nannochloropsis* klorofil *b*, hücresel ksantofil gibi pigment bileşimlerinin yanı sıra, yağ asitlerinden özellikle yüksek eikosapentaenoik asit (20:5n-3) içeriği (Maruyama ve diğ., 1986), steroller (Gladu ve diğ., 1995), gibi yüksek düzeyleri ile tanımlanmaktadır (Volkman ve diğ., 1993). *N. oculata* türünde klorofil-*a*, β-karoten, viyolaksantin ve vokeriyaksantin ana pigmentlerdir. Ayrıca bu alg türü kantaksantin ve astaksantin gibi sekonder karoten gruplarında içermektedir (Lubián ve diğ., 2000).

Azot kaynakları ve düzeyleri, alg kültürlerinde büyüme ve biyokimyasal yapıyı etkilemekte ve karoten miktarlarında değişikliklere sebep olmaktadır (Xu ve diğ., 2001, Lourenco ve diğ., 2002). Mikroalg kültürlerinde azot sınırlaması hücre

sayısı ve klorofil *a* miktarlarında azalmaya neden olurken, mikroalglerin biyokimyasal yapısındaki yağlar gibi organik karbon bileşikleri oranlarında artış olmaktadır. Bununla birlikte kültürlerde klorofil-*a* oranı azalırken karoten miktarının artmasına bağlı olarak renkte sararma gözlenmiştir (Shifrin ve Chisholm, 1981; Sukenik ve diğ., 1989).

Azotun çeşitli formları mikroalg kültürleri için uygundur. Kültürlerde hücreler tarafından kullanılabilen en önemli azot kaynakları nitrat azotu (NO₃⁻-N), amonyum azotu (NH₄⁺-N) ve üre azotu ((NH₂)₂CO-N)'dur (Gökpınar, 1991; Levasseur ve diğ., 1993; Grobbelaar, 2000). Bu yüzden, bu çalışmada *N. Oculata*'nın karotenoid ve klorofil pigmentleri içeriği üzerine farklı azot kaynaklarının (NO₃⁻-N, NH₄⁺-N ve (NH₂)₂CO-N) ve azot sınırlamasının etkileri araştırıldı.

Materyal ve Yöntem

Yeşil alglerden *Nannochloropsis oculata* (CCAP-8491, İskoçya) Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinden temin edildi.

Kültür ortamı olarak F/2 besin ortamı ile zenginleştirilmiş

deniz suyu kullanıldı (Guillard, 1975). Kültür ortamı % 35'lik doğal deniz suyuna, ortam tuzluluğu % 25 olacak şekilde saf su ilave edildi. Hazırlanan stok solusyonlar, kültür ortamları, kullanılan erlenler ve diğer malzemeler otoklavda 121°C'de 20 dakika bekletilerek, Vitamin solusyonu ise 0.22 µ filitreden geçirilerek sterilize edildi.

1., 2. ve 3. grup denemelerde azot kaynağı olarak 882 ve 441 µmol L⁻¹ NaNO₃ ve NH₄ Cl ve (NH₂)₂CO kullanıldı (Tablo 1). Bu şekilde üç azot kaynağı ile altı deney grubu oluşturuldu.

Tablo 1. F/2 besin ortamında kullanılan azot kaynakları ve konsantrasyonları

	Azot Kaynakları	Konsantrasyonlar	
1.Deneme	NaNO ₃ (Nitrat-N)	882 µmol L ⁻¹	441 µmol L ⁻¹
2.Deneme	NH ₄ Cl (Amonyum-N)	882 µmol L ⁻¹	441 µmol L ⁻¹
3.Deneme	(NH ₂) ₂ CO (Üre-N)	882 µmol L ⁻¹	441 µmol L ⁻¹

N. oculata kültürlerinde 2L hacmindeki erlenler 1.5 L besin ortamı ile dolduruldu. Kültürlerin aydınlatılmasında daylight floresan lambalar (Philips TLM 40W/54RS) kullanıldı. Aydınlatma seviyesi erlenlerin yüzeyinden Li-Core (Model SPH, Quantum SPG A0525) ışık ölçer ile 196 µmol m⁻² s⁻¹ tespit edildi. Laboratuvar sıcaklığı klima ile 18±1°C'ye ayarlandı. Sürekli havalandırma ile kültürlerin karıştırılması yapıldı.

Farklı büyüme fazlarından alınan 250 ml hacmindeki örnekler 8000 rpm 18 °C'de 10 dakika santrifuj (Kubota 6000) edilerek çöktürüldü. Elde edilen algal pasta -80°C'de buzdolabında 24 saat bekletilerek dondurulduktan sonra 48 saat -40°C de 10⁻¹ atm basınçta ayarlanan freeze-dry (Edward) ile kurutma gerçekleştirildi.

Hücre sayımı elektronik sayıcı (Coulter EPICS XL) ile her iki günde bir yapıldı. Hücre sayısından Spesifik büyüme hızı (µ) aşağıdaki formüllere göre bulundu;

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

Formülde X₂ ve X₁, sırasıyla t₂ ve t₁ zamanlarındaki biyomas konsantrasyonlarını belirtir.

Toplam karoten ve klorofil-a miktarlarının tespiti spektrofotometrik yöntemle göre aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı. 5 mg kurutulmuş örnek alınarak 5 ml metanol (Merck %100, Germany) ile muamele edildikten sonra, hücreler lka (Ultra Turrax T25) homojenitör ile 5 dakika süre ile homojenize edildi. Daha sonra 10 dakika 70°C'de ultrason (Transonic T570/H) banyoya tabi tutuldu. Elde edilen ekstrakt madde 3500 rpm'de santrifuj ile ayrıldı. Örnekler spektrofotometrede (Hitachi U-2001) 475 nm ve 666 nm dalga boylarında okundu. Aşağıda verilen formüller ile toplam karoten ve klorofil-a miktarları tespit edildi.

$$C_{\text{Karoten}} (\text{mg g}^{-1}) = 4.5 A_{475} (\text{Zou ve Richmond, 2000})$$

A₄₇₅ 475 nm dalga boyunda okunan absorbans (soğurma) değeri.

$$C_{\text{Klorofil-a}} (\text{mg g}^{-1}) = 13.9 A_{666} (\text{Sanchez ve diğ., 2005})$$

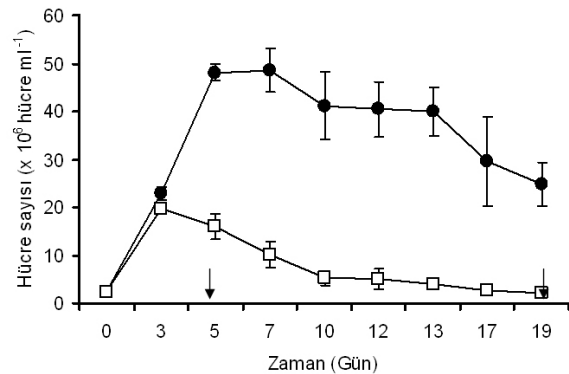
A₆₆₆ 666 nm dalga boyunda okunan absorbans değeri.

Pigmentlerin tanımlanmasında Thin Layer Chromatograph (TLC) kullanıldı (Gouveia ve diğ., 1997). TLC plakları (Silica gel 60F₂₅₄ Merk) 20x20 cm boyutlarında olup alüminyum kâğıt üzerine yayılmış şekildedir. Pigment standartları olarak β-karoten ve astaksantin (Sigma-Aldrich) kullanıldı.

Veriler Kolmogorow-Smirnow testi ile normal dağılışa uygun olup olmadığı kontrol edildikten sonra parametrik testlerden Anova (tek yönlü varyans analizi) testi uygulandı. Gruplar arasında farklılık olup olmadığını ve farklılığın nerede olduğunu tespit edebilmek için Tukey testi uygulandı (Zar, 1999). İstatistik analizler için SPSS for Windows (ver 12.0) ve Graphpad Prism Software for Windows (ver 4.0) programları kullanıldı.

Bulgular

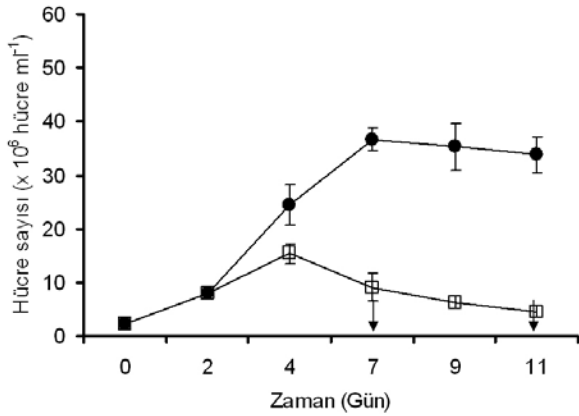
NO₃-N konsantrasyonlarında (882, 441 µmol L⁻¹) gerçekleştirilen denemelerde ilk örnek alma işlemi 5. günde, 2. örnek alma işlemi ise 19. günde alındı (Şekil 1). NO₃-N konsantrasyonda hazırlanan besin ortamında maksimum hücre sayısı 882 µmol L⁻¹lik konsantrasyonda elde edildi (5.30 x10⁷ hücre ml⁻¹). 441 µmol L⁻¹ NO₃-N konsantrasyonu ile hazırlanan besin ortamında ise en yüksek 2.02 x10⁷ hücre ml⁻¹ kayıt edildi. Spesifik büyüme hızları bakımdan ise 882 µmol L⁻¹lik NO₃-N konsantrasyonda hazırlanan besin ortamında 3. günde en yüksek 0.76±0.03 bölünme gün⁻¹, azot sınırlamasında ise 0.70±0.04 bölünme gün⁻¹ değerleri elde edildi.



Şekil 1. NO₃-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (882 ve 441 µmol L⁻¹ oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder) Ok işaretleri örnek alma zamanlarını belirtir.

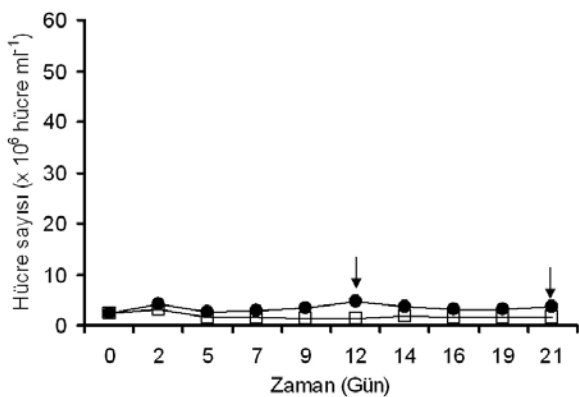
NH₄⁺-N ile hazırlanan besin ortamlarında ilk örnek alma işlemi 7. günde, 2. örnek alma işlemi ise 11. günde alındı (Şekil 2). NH₄⁺-N konsantrasyonlarında maksimum hücre sayısı 882 µmol L⁻¹lik konsantrasyonda elde edildi (3.84 x10⁷ hücre ml⁻¹). 441 µmol L⁻¹ NH₄⁺-N konsantrasyonundaki kültür en yüksek 1.74 x10⁷ hücre ml⁻¹ hücre sayısı tespit edildi. Spesifik büyüme hızları bakımdan ise 2. günde her iki

konsantrasyonda da aynı değer kayıt edildi (0.66 ± 0.03 bölünme gün⁻¹). 4. günde $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ spesifik büyüme hızı 0.56 ± 0.07 bölünme gün⁻¹ değerine düşerken azot sınırlamasında ise yaklaşık %50 oranında azalma kayıt edildi (0.32 ± 0.09 bölünme gün⁻¹).



Şekil 2. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (882 ve $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder) Ok işaretleri örnek alım zamanlarını belirtir.

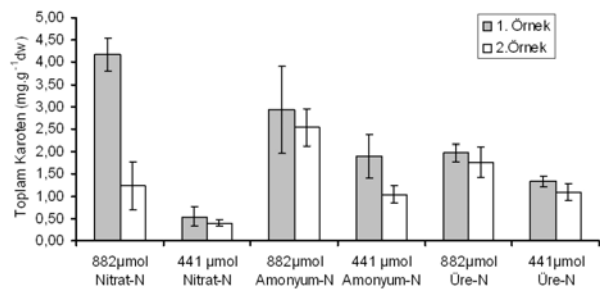
Üre-N konsantrasyonunda gerçekleştirilen denemelerde maksimum hücre sayıları 882 ve $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyonlarda sırasıyla 0.50 ve 0.33×10^7 hücre ml^{-1} tespit edildi (Şekil 3). 21 gün devam eden denemeler boyunca hücre sayısı artış ve azalışlar şeklinde devam ettiği görüldü. İlk örnek alım işlemi $12.$ günde, 2. örnek alım işlemi ise $21.$ günde alındı. Spesifik büyüme hızları bakımdan ise en çok bölünme $2.$ günde 882 ve $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ üre-N konsantrasyonlarında hazırlanan besin ortamlarında sırasıyla 0.31 ± 0.01 ve 0.17 ± 0.04 bölünme gün⁻¹ değerler kayıt edildi.



Şekil 3. Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (882 ve $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder) Ok işaretleri örnek alım zamanlarını belirtir.

$\text{NO}_3^-\text{-N}$ $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyonda kullanılan besin ortamında ilk alınan örneklerde toplam karoten miktarı $4.17 \pm 0.37 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$ elde edildi (Şekil 4). Aynı denemede 2.

örneklerde toplam karoten miktarında istatistikî önemde azalış oldu ($P < 0.05$). $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyonda $\text{NO}_3^-\text{-N}$ kullanılan besin ortamında en düşük toplam karoten miktarı $0.26 \pm 0.02 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$ kayıt edildi. $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{NO}_3^-\text{-N}$ kullanılan besin ortamındaki değerlere göre azot kaynağı olarak üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamlarında toplam karoten miktarlarında istatistikî önemde azalış tespit edildi ($P < 0.05$). $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ve üre-N ile hazırlanan besin ortamları kendi aralarında istatistikî bir değişim olmadı ($P > 0.05$). $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyonda üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamında ilk alınan örneklerde en yüksek değer $1.97 \pm 0.20 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$ elde edilirken, en düşük değer, $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyondaki 2. örneklerde elde edildi.



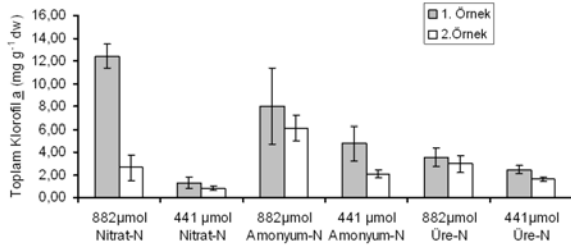
Şekil 4. $\text{NO}_3^-\text{-N}$, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki ($882 \mu\text{mol}$ ve $441 \mu\text{mol L}^{-1}$) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki toplam karoten değerleri.

$441 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyonlarında $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ile hazırlanan besin ortamlarında 1. ve 2. alınan örneklerde azot sınırlamasının olduğu kültürde toplam karoten miktarında azalış oldu ($P > 0.05$). 882 ve $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyonlar arasında istatistikî önemde farklılık kayıt edildi ($P < 0.05$). En yüksek değer $\text{NH}_4^+\text{-N}$ kullanılarak hazırlanan besin ortamında $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyondaki ilk örneklerde ($2.93 \pm 0.98 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$), en düşük değer $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyondaki 2. örneklerde ($1.04 \pm 0.20 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$) elde edildi. Üre-N ile hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamlarında yapılan kültürlerdeki toplam karoten sonuçları arasında istatistikî önemde bir değişiklik olmadığı tespit edildi ($P > 0.05$).

En yüksek klorofil- a miktarı $\text{NO}_3^-\text{-N}$ $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyonda kullanılan besin ortamında 1. alınan örneklerde $12.42 \pm 1.08 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$ elde edildi (Şekil 5). 2. örneklerde toplam karoten miktarında istatistikî önemde azalış oldu ($P < 0.05$). En düşük klorofil- a miktarı $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{NO}_3^-\text{-N}$ kullanılan besin ortamında $0.82 \pm 0.21 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$ kayıt edildi. $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{NO}_3^-\text{-N}$ kullanılan besin ortamındaki değerlere göre azot kaynağı olarak üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamlarında klorofil- a miktarlarında istatistikî önemde azalış tespit edildi ($P < 0.05$). $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ve üre-N ile hazırlanan besin ortamları arasında klorofil- a miktarlarında istatistikî önemde bir değişim olmadı ($P > 0.05$). 882 ve $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyonlarında, $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ile hazırlanan besin ortamlarında ilk örneklerde klorofil- a miktarında azalma gözlemlendi ($P > 0.05$). İlk ve son örneklerin klorofil a değerleri arasında istatistikî önemde farklılık tesbit edildi ($P < 0.05$).

Bununla birlikte üre-N ile hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamlarında yapılan kültürlerdeki klorofil *a* değerleri arasında istatistikî önemde farklılık olmadığı tespit edildi ($P>0.05$).

En yüksek klorofil-*a* değeri, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ kullanılarak hazırlanan besin ortamında $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyondaki ilk örneklerde ($8.04 \pm 3.32 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$), en düşük klorofil-*a* değeri $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyondaki 2. örneklerde ($2.06 \pm 0.36 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$) tespit edilen değer dört kat daha düşüktür. Fakat üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamında $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyondaki 1. örneklerde ($3.56 \pm 0.84 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$), en düşük klorofil-*a* değeri $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyondaki 2. örneklerde ($1.61 \pm 0.20 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$) tespit edilen değer iki kat daha düşüktür.



Şekil 5. NO_3^- -N, NH_4^+ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki ($882 \mu\text{mol}$ ve $441 \mu\text{mol L}^{-1}$) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki klorofil-*a* değerleri.

TLC plakalarında *N. oculata* farklı azot kaynaklarında ve farklı konsantrasyonlardaki örneklerin pigment kompozisyonları çıkarıldı. Pigment tespitlerinde renk ve Rf oranları temel alındı (Tablo 2). Rf oranları pigment türlerinin TLC plaka üzerinde taşıdığı mesafenin yüzde değerlerinin hesaplanması sonucunda elde edilmektedir.

Tablo 2. Farklı azot kaynaklarında ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan besin ortamlarında *N. oculata* türünün pigment kompozisyonunun taşınım zamanları ve pigmentlerin renkleri.

	Rf	renk
B-Karoten	0.93-0.95	sarı-turuncu
Klorofil- <i>a</i>	0.63	mavi-yeşil
Klorofil- <i>b</i>	0.59	sarı-yeşil
Violaksantin	0.54	sarı
Kantaksantin	0.36	sarı
Zeaksantin	0.39-0.42	sarı-turuncu
Astaksantin	0.40	turuncu
Vaucheriyaksantin	0.54	sarı

Ayrıca TLC analizinde *N. oculata*'nın ekstraksiyon metodunun ve kullanılan çözügen maddenin başarılı olduğu tespit edildi. β -Karoten, klorofil-*a*, klorofil-*b*, violaksantin, kantaksantin, astaksantin, vokeriyaksantin ve zeaksantin pigmentleri tespit edildi. *N. oculata*'nın farklı azot kaynaklarında ve konsantrasyonlarda yapılan kültürlerinde azot kaynağına ve sınırlandırmasına bağlı olarak tüm deney gruplarında temel olan pigment sınıfları aynı olduğu tespit edildi.

Tartışma ve Sonuç

Çevresel koşullar ile birlikte kültür ortamında kullanılan nutrientler ve konsantrasyonları mikroalgal büyüme ve mikroalgin biyokimyasal yapısı üzerinde değişikliklere neden olabilir. Büyüme, besin ortamlarında kullanılan nutrient türünün yanısıra konsantrasyonlarında etkilemektedir (Brown ve diğ., 1989). Azot kaynağı ve konsantrasyonlarının farklılığı mikroalgin büyüme ve biyokimyasal yapılarında etkili olduğu bilinmektedir. (Gökçınar, 1991; Fidalgo ve diğ., 1995; Valenzuela-Espinoza ve diğ., 1999; Xu ve diğ., 2001). İnorganik azot kaynaklarından NO_3^- -N, NH_4^+ -N ve üre-N formları, akuakültürde besin ortamlarında yaygın bir şekilde kullanılan formlardır. Bir çok araştırmacı, amino grup asitlerin özümsemesinde hücre tarafından ilk alınacak azot kaynağı NH_4^+ -N olduğunu bildirmişlerdir (Fidalgo ve diğ., 1995; Valenzuela-Espinoza ve diğ., 1999; Xu ve diğ., 2001). Çünkü hücrelerin ihtiyacı olan azot için NO_3^- -N'nun NH_4^+ -N'a indirgenmesi gerekmektedir. Aynı araştırmacılar, NO_3^- -N ile NH_4^+ -N arasında benzer büyüme oranları kayıt edildiği bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki büyüme sonuçları gösteriyor ki; *N. oculata* NO_3^- -N kaynağını en iyi kullanmıştır. NO_3^- -N ve NH_4^+ -N ile hazırlanan besin ortamlarındaki spesifik büyüme oranları arasında farklılık görülmemiştir. Fakat üre-N ile hazırlanan besin ortamlarında *N. oculata*'nın büyüme oranı düşük kayıt edilmiştir. Besin ortamına konulan azot kaynaklarının konsantrasyonlarının azaltılması sonucunda, büyüme oranlarında aynı oranda azaldığı tespit edilmiştir.

Bir çok araştırmacı karotenoidleri, insanları hastalıklara karşı koruyucu olarak önermiş ve β karoten, lutein, zeaksantin gibi karotenler halen kanser tedavisinde uygulanmaktadır (Richmond, 2000; Ziegler ve diğ., 1996). *N. oculata* türünde klorofil-*a*, β karoten, viyolaksantin ve vokeriyaksantin ana pigmentlerdir. Ayrıca bu alg türü kantaksantin ve astaksantin gibi sekonder karoten gruplarını ihtiva etmektedir. Sekonder karotenoidler yüksek ışık şiddeti ve azot yetersizliği gibi normal olmayan koşullar altında üretilir. Özellikle besin sınırlaması sonucunda, algin renginin yeşilden kırmızı-turuncuya dönüşü, sekonder karotenlerin artışı ile ilişkilendirilmiştir (Lubián ve diğ., 2000). Marin ve diğ., (1998) *D. salina* türünde NO_3^- -N konsantrasyonunun (882 , 435 ve $212 \mu\text{mol L}^{-1}$) klorofil-*a* ve karoten miktarlarına etkisini araştırmışlar. En yüksek klorofil-*a* ve karoten değerlerini $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ NO_3^- -N konsantrasyonunda büyüme fazlarından durgunluk fazında tespit etmişlerdir. Lubián ve diğ., (2000) *N. oculata*'nın ticari pigmentlerini viyolaksantin (%48.9) ve vokeriyaksantin (%45.3) olarak tespit etmişlerdir. Örnek zamanını 10. günden 20. güne çıkartıldığında viyolaksantin değerinde azalış olur iken, vokeriyaksantin değerinde artış olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada en yüksek klorofil-*a* değeri $168.6 \mu\text{g} (10^6 \text{ hücre})^{-1}$ olarak 20. günde tespit etmişlerdir. Erken örnek döneminde *N. oculata* da bu değer $116.4 \mu\text{g} (10^6 \text{ hücre})^{-1}$ olarak rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda NO_3^- -N ve NH_4^+ -N ile hazırlanan besin ortamlarında erken örnek alma dönemlerinde en yüksek toplam karoten değerleri elde edilirken, azot sınırlamasında

azalma olduğu tespit edilmiştir. Azot kaynağına ve sınırlandırmasına bağlı olarak tüm deney gruplarında temel olan pigment sınıfları değişim olmadığı tespit edildi. Üre-N ile hazırlanan besin ortamında kültürü yapılan *N. oculata* türünün büyüme ve biyokimyasal yapısında tüm değerleri düştüğü böylece, besin ortamının sadece Üre-N ile hazırlamak bu tür için uygun değildir.

Büyüme, toplam karoten ve klorofil-a değerleri açısından *N. oculata* türü için NO_3^- -N ve NH_4^+ -N uygun azot kaynağı ve $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ uygun konsantrasyon olarak tespit edilmiştir. *N. oculata*'nın karoten ve klorofil a gibi ana pigmentlerin birbirine olan oranlarını değiştirdiği ve bu değişikliğe çeşitli azot kaynaklarının neden olduğu gözlemlendi. Sekonder karotenoidlerin miktarlarını ve azot kaynak ve konsantrasyonlarının etkisinin tespit etmek için detaylı araştırma yapılmalıdır. Böylelikle bu türün biyokimyasal yapısını değiştiren etkenlerden bir bölümü açıklığa çıkarılarak, gerek bilimsel gerekse ticari amaçlı uygulamalardaki başarıyı arttıracaktır.

Teşekkür

Doktora tezimin bir bölümü olan bu çalışma IPIMAR'da (Portekiz) yapıldı. Sağladığı imkânlar ve teknik hizmetlerden dolayı IPIMAR'a ve çalışmalarında desteğini esirgemeyen danışmanlarım Prof. Dr. Şevket GÖKPINAR ve Dr. Narcisca BANDARRA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Kaynakça

- Brown, M.R., S.W. Jeffrey, C.D. Garland, (1989), Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. CSIRO Mar. Lab. Rep. 205, 44.
- Fidalgo, J.P., A. Cid, J. Abalde, C. Herrero, (1995), Culture of the marine diatom *Phaeodactylum tricomutum* with different nitrogen sources: growth, nutrient conversion and biochemical composition. Cah. Biol. Mar. 36, 165–173.
- Gladu, P.K., G.W. Patterson, G.H. Wikfors, B.C. Smith, (1995), Sterol, fatty acid, and pigment characteristics of UTEX 2341, a marine eustigmatophyte identified previously as *Chlorella minutissima* (Chlorophyceae). J. Phycol. 31, 774–777.
- Gouveia, L., E. Gomes, J. Empis, (1997), Use of *Chlorella vulgaris* in diets for rainbow trout to enhance pigmentation of muscle. J. Appl. Aquaculture 7: 61-70.
- Gökpınar, Ş., (1991), Effect of change of temperature on inorganic nitrogen assimilation of five important sea flagellat in aquaculture. (Doktora Tezi). Dokuz Eylül Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, sayfa,88 (in Turkish).
- Grobbelaar, J.U., (2000), Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. J Appl Phycol 12:201–206.
- Guillard, R.R.L., (1975), Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. In: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), Culture of Marine Invertebrates Animals. Plenum, New York, pp. 296–360.
- Hu, Qiang., (2004), Environmental effects on cell composition, in Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology, Richmond, A. (Eds) Blackwell publishing company, pp. 83-93.

- Levasseur, M., P.A. Thompson, P.J. Harrison, (1993), Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. J. Phycol. 29, 587–595.
- Lourenco, S., E. Barbarino, J. Mancini-Filho, K. Schinke, E. Aidar, (2002), Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: An evaluation for aquaculture. Phycologia, 41: 158-168.
- Lubián, LM, O. Montero, I. Moreno-Garrido, I.E. Huertas, C. Sobrino, M. Gonzales-del Valle, G. Pares, (2000), *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. J. Appl. Phycol. 12: 249–255.
- Lubzens, E., O. Gibson, O. Zmora, A. Sukenik, (1995), Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. Aquaculture 133, 295–309.
- Marín, N., F. Morales, C. Lodeiros, E. Tamigneaux, (1998), Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. J. Appl. Phycol. 10: 405–411.
- Maruyama, I., T. Nakamura, T. Matsubayashi, Y. Ando, T. Naeda, (1986), Identification of the alga known as 'marine chlorella' as a member of the Eustigmatophyceae. Jap. J. Phyco. 34: 319-325.
- Richmond, A., (2000), Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. J. Appl. Phycol. 12: 441–451.
- Rodolfi, L., G.C. Zittelli, L. Barsanti, G. Rosati, M.R. Tredici, (2003), Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. Biomol. Eng. 20: 243-248.
- Sánchez M.D., C. Mantell, M. Rodríguez, E. Martínez de la Ossa, L.M. Lubián, O. Montero, (2005), Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. J. Food Eng. 66: 245–251.
- Shifrin, N.S., S.W. Chisholm, (1981), Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and lightdark cycles. J. Phycol. 17:372–84.
- Sukenik, A., Y. Carmeli, T. Berner, (1989), Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. J. Phycol. 25: 686–692.
- Valenzuela-Espinoza, E., R. Millán-Núñez, F. Núñez-Cabrero, (1999), Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) culture with a low cost alternative to the f/2 medium. Aquacult. Eng. 20, 135–147.
- Volkman, J.K., M.R. Brown, G.A. Dunstan, S.W. Jeffrey, (1993), The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae. J. Phycol. 29: 69–78.
- Xu, N., X. Zhang, X. Fan, L. Han, C. Zeng, (2001), Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (Eustigmatophyta). J. Appl. Phycol. 13: 463–469.
- Zar, J.H., (1999), Biostatistical Analysis. Upper Saddle River, Prentice Hall, New Jersey. 4th Edition. cap 12, USA. 231-272.
- Ziegler, R.G., E.A. Colavito, P. Hartge, M.J. McAdams, J.B. Schoenberg, T.J. Mason, J.F.J. Fraumeni, (1996), Importance of a-carotene, b-carotene and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. J. Natl. Cancer Inst. 88, 612–615.
- Zittelli G., L. Rodolfi M.R. Tredici, (2004), Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products- species of high potential, in Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology, Richmond, A. (Eds) Blackwell publishing company, pp. 298-303.
- Zou, N. A. Richmond, (2000), Light-path length and population density in photoacclimation of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). J. Appl. Phycol. 12: 349–354.