

PENGARUH KONSENTRASI NITROGEN DAN FOSFOR TERHADAP
PERTUMBUHAN, KANDUNGAN PROTEIN, KARBOHIDRAT DAN FIKOSIANIN
PAD A KULTUR *Spirulina fusiformis*

[Effects of Nitrogen and Phosphorous Concentration on the Growth, Protein, Carbohydrate
and Phycocyanin Content of *Spirulina fusiformis* Culture]

Tjandra Chrismadha¹³, Lily M Panggabean dan Yayah Mardiaty
Pusat Penelitian Limnologi-LIPI, Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong, Bogor

ABSTRACT

An experiment was carried out to find out the optimum nitrogen and phosphorous concentration for growth and phycocyanin production in *Spirulina fusiformis* culture. The cultures were grown in Zarouk medium at various nitrogen and phosphorous concentrations, which were 0.0 mM N, 7.5 mM N, 15.0 mM N, 22.5 mM N, and 30.0 mM N, as well as 0 mM P, 90 mM P, 180 mM P, 270 mM P, and 360 mM P, with four replications each. The result shows that optimal growth of the alga, which is expressed in terms of the biomass yield, was achieved at nitrogen and phosphorous concentration of 7.5 mM and 270 mM, respectively. At the same time, the highest phycocyanin content was obtained at nitrogen concentration of 22.5 mM, which was 1.2% of the biomass, and phosphorous concentration of 360 mM, which was 1.1% of the biomass. According to this result, it is suggested the optimum concentration of nitrogen and phosphorous in the media of *Spirulina* culture for phycocyanin production is 22.5 mM and 360 mM, respectively.

Kata Kunci: Alga, fikosianin, fosfor, nitrogen, *Spirulina fusiformis*.

PENDAHULUAN

Spirulina adalah kelompok alga biru hijau yang merupakan salah satu sumber pangan dan pakan potensial dengan kandungan pigmen fikosianin yang tinggi yang mencapai 20% dari total protein selnya (Richmond, 1988). Kandungan pigmen fikosianin yang tinggi dapat menjadi daya tarik bagi pengembangan kultur alga tersebut secara ekonomis, karena fikosianin memiliki karakteristik antioksidan dan dapat berfungsi inflamatori, menghambat tumor nekrosis, dan melindungi sel-sel syaraf (Romay *et al.*, 1998,2003; Reddy *et al.*, 2000), sehingga dianggap memiliki pasar yang potensial dalam industri kesehatan. Potensi kandungan pigmen tersebut didukung oleh kemampuan jenis alga biru-hijau ini untuk tumbuh dominan pada media yang bersifat sangat basa, yaitu nilai pH hingga mencapai 11, sehingga lebih mudah dikelola sebagai kultur monoalga dalam waktu yang relatif panjang.

Goldman (1979) menyebut faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga sebagai faktor tumbuh (growth factors). Faktor tumbuh tersebut selanjutnya diklasifikasikan sebagai faktor sumber daya (resource factors) dan faktor pendukung (non resource factors). Faktor sumberdaya meliputi faktor-

faktor yang terdiri dari sumberdaya yang secara langsung dipergunakan oleh sel-sel alga untuk pertumbuhannya, seperti unsur hara, cahaya matahari dan CO₂. Sementara faktor pendukung terdiri dari faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi proses metabolisme dalam sel mikroalga, antara lain suhu dan pH. Pengaruh faktor sumberdaya terhadap pertumbuhan mikroalga pada umumnya digambarkan sebagai fungsi hiperbolik yang dicirikan oleh fenomena titik jenuh, dimana penambahan ketersediaan faktor sumberdaya tidak dapat lagi meningkatkan pertumbuhan mikroalga. Fenomena titik jenuh ini selanjutnya dimanfaatkan dalam kajian-kajian kultur mikroalga untuk menentukan kondisi optimum untuk mencapai tingkat produktivitas yang paling efisien.

Nitrogen dan fosfor merupakan sebagian dari faktor sumberdaya tersebut. Banyak penelitian telah dilakukan untuk mengkaji konsentrasi optimum kedua unsur tersebut untuk pertumbuhan *Spirulina*. Namun disamping itu juga masih perlu dilakukan upaya optimasi produksi bahan kimia unggul potensial dari jenis alga tersebut, yaitu fikosianin yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Hal ini sangat penting, karena produksi bahan kimia unggul tersebut dapat mendukung upaya pencapaian kelayakan ekonomi

kultur mikroalga (Vonshak & Richmond, 1985; Sukenik, 1991; Tedesco & Duerr, 1989). Beberapa penelitian tentang pengaruh nitrogen terhadap kandungan pigmen fikosianin juga telah dilaporkan (Boussiba & Richmond, 1980; Cortes *et al*, 1997). Namun kajian pengaruh fosfor terhadap kandungan fikosianin pada jenis mikroalga tersebut hingga saat ini masih belum dilakukan. Untuk itu pada penelitian ini dikaji pengaruh ketersediaan unsur hara secara lebih luas, meliputi nitrogen dan fosfor agar evaluasi pengaruh faktor unsur hara ini dapat dikaji secara terpadu, sehingga dapat memberikan tambahan informasi untuk upaya optimasi produksi kultur *Spirulina*, khususnya terkait dengan produksi pigmen fikosianin.

BAHENDAN METODE

Organisma dan Kondisi Kultur

Alga biru-hijau *Spirulina fusiformis* diperoleh dari koleksi kultur mikroalga Puslit Oseanografi LIPI. Selanjutnya sampel ditumbuhkan pada wadah plastik berbentuk persegi panjang ukuran 30 x 40 cm² dan tinggi 10 cm dengan tutup transparan, yang berisi 3 L media Zarouk (Borowitzka, 1988) termodifikasi. Perlakuan variasi konsentrasi nitrogen dan fosfor diberikan pada rentang konsentrasi lebih rendah dari konsentrasi media Zarouk normal. Hal ini dimaksudkan untuk mengkaji kemungkinan konsentrasi optimum kedua unsur tersebut pada konsentrasi yang lebih rendah, sehingga kulturnya dapat lebih efisien. Percobaan pertama dilakukan dengan perlakuan variasi konsentrasi nitrogen 0,0, 0,7, 5, 15, 0,22, 5 dan 30,0 mM yang dilakukan dengan pemberian sumber nitrogen dalam bentuk KNO₃ ke dalam media sebanyak 0,00 g/L, 0,25 g/L, 0,50 mg/l, 0,75 g/L, dan 1,00 g/L. Setelah itu dilakukan percobaan kedua dengan perlakuan variasi konsentrasi fosfor 0,90, 180, 270, dan 360 mM yang dicapai dengan pemberian larutan H₃PO₃ pekat ke dalam media sebanyak 0,00 ml/l, 1,6,25 ml/L, 12,5 ml/L, 18,75 ml/L, dan 25 ml/L. Masing-masing taraf perlakuan mempunyai empat ulangan. Inokulasi sampel dilakukan dengan kepadatan kultur awal sekitar 0,05 g/L dan selanjutnya kultur ditumbuhkan pada ruang semi-terbuka beratap polikarbonat yang mereduksi cahaya matahari hingga 60%. Pengurangan intensitas cahaya

matahari penting untuk menurunkan resiko fotoinhibition dan peningkatan suhu kultur pada intensitas cahaya tinggi di siang hari. Kisaran suhu harian pada media kultur berkisar antara 26 - 32 °C. Kultur *Spirulina* dibiarkan tumbuh selama 24 hari agar tumbuh hingga mencapai biomassa yang cukup padat. Pertumbuhan kultur diamati melalui parameter konsentrasi biomasannya 3 atau 4 hari sekali, sementara pengambilan sampel untuk pengamatan kandungan protein, karbohidrat, klorofil, dan fikosianin dilakukan pada hari ke 24.

Pengukuran Biomassa

Untuk pengukuran biomassa, 10 ml suspensi kultur dari tiap perlakuan disaring pada filter GF/A Whatman yang telah ditimbang sebelumnya, dan dikering anginkan sebelum dimasukkan kedalam oven 100 °C selama satu jam. Selanjutnya sample di timbang untuk menentukan berat kering sample. Berat kering sample merupakan selisih berat akhir yang dikurangi dengan berat kering filter.

Pengukuran Kandungan Klorofil-a

Sebanyak 10 ml suspensi kultur dari tiap perlakuan disaring pada filter GF/A Whatman dan disimpan di freezer hingga siap dianalisis. Sebelum analisis sampel dibiarkan pada suhu ruangan selama sekitar 15 menit, kemudian diekstrak dalam larutan 90% aseton menggunakan homogeniser. Setelah homogen sampel langsung dipindahkan ke tabung sentrifus 15 ml dan ditambah akuades hingga volume 10 ml, dan selanjutnya disentrifus pada 3000 rpm selama 10 menit. Absorbansi supernatan sampel diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 664 dan 647 nm. Penghitungan kadar klorofil-a didasarkan pada formula Jeffrey dan Humphrey(1975).

Pengukuran Kandungan Protein

Untuk pengukuran kandungan protein, 10 ml suspensi kultur disaring pada filter GF/A Whatman dan disimpan dalam freezer hingga siap untuk dianalisis. Saat melakukan pengukuran kandungan protein, sample yang di ambil dari ruang freezer di biarkan selama 15 menit sebelum dianalisis. Kadar protein kultur ditentukan menggunakan metode folin-fenol (Lowrey *etal*, 1951).

Pengukuran Kandungan Karbohidrat

Sebanyak 10 ml suspensi kultur disaring pada filter GF/A Whatman dan disimpan di freezer hingga siap dianalisis. Saat melakukan pengukuran kandungan protein, sample yang di ambil dari ruang freezer di biarkan selama 15 menit sebelum dianalisis. Penentuan kadar karbohidrat selanjutnya dilakukan menggunakan metode fenol-asam sulfat (Kochert, 1975).

Pengukuran Kandungan Fikosianin

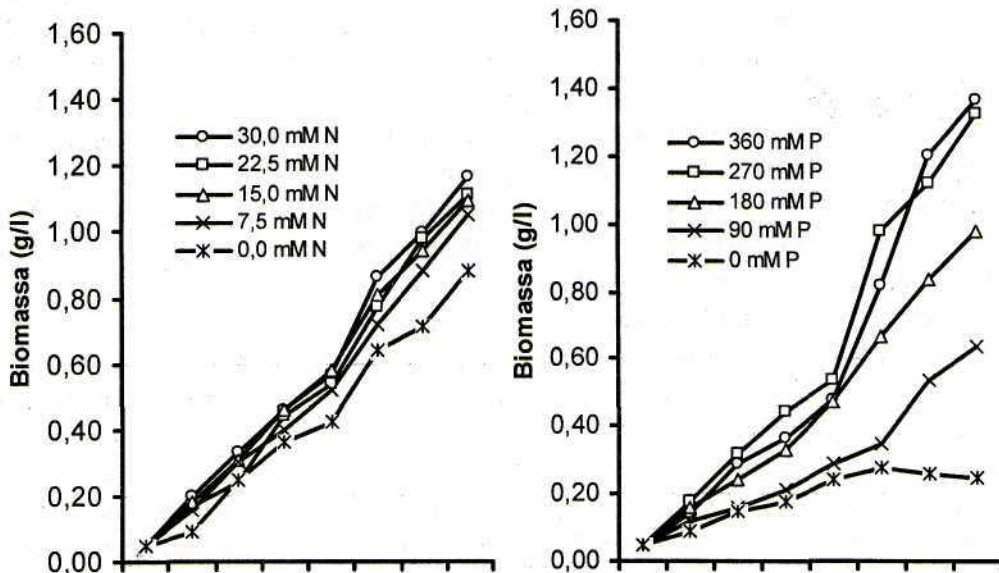
Antara 40- 100 ml kultur disaring pada filter GF/A Whatman sesuai dengan kepadatan biomassa kulturnya untuk mendapatkan biomassa kering sekitar 40 mg yang diperlukan untuk analisa fikosianin. Berat kering biomassa alga ditentukan sebelum analisis kandungan fikosianin dilakukan. Selanjutnya penentuan kadar fikosianin dilakukan menggunakan metode ekstraksi dalam larutan buffer pH 7 (10,64 g K_2HPO_4 dan 5,29 g KH_2PO_4 dalam satu liter akuades) berdasar Boussiba dan Richmond (1979).

HASIL

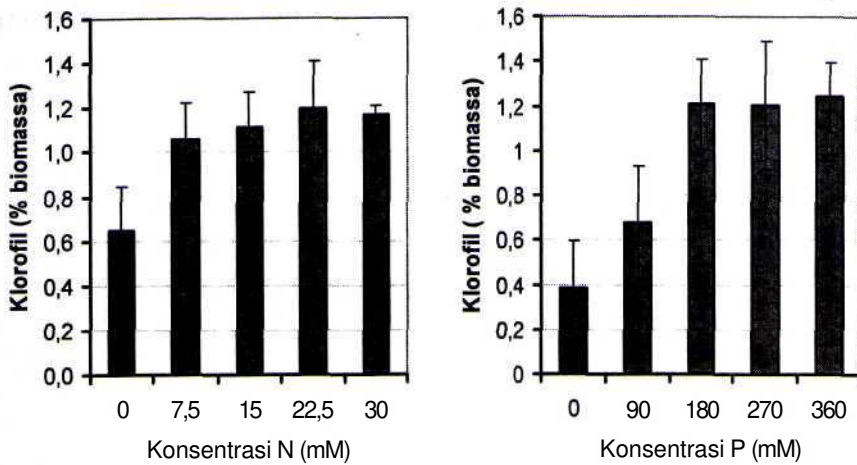
Pada media dengan konsentrasi N dan P tertinggi (30 mM N dan 360 mM P), kultur *S. fusiformis* menunjukkan tingkat pertumbuhan yang baik hingga

hari ke-24. Kekurangan nitrogen hanya memberikan sedikit penurunan laju pertumbuhan biomassa kultur, yaitu 5% pada media dengan 2,5 mM N, 6% pada media dengan 15,0 mM N, dan 10% pada media dengan 7,5 mM N. Bahkan pada media tanpa nitrogen-pun (0,0 mM N) masih tercatat adanya pertumbuhan yang relatif baik, meskipun produktivitas kultur berkurang hingga 25% (Gambar 1-A). Sementara itu pengaruh kekurangan unsur fosfor terhadap pertumbuhan *Spirulina* terlihat lebih nyata (Gambar 1-B). Pada konsentrasi fosfat 90 dan 180 mM tercatat penurunan konsentrasi biomassa kultur hingga 30% dan 55%. Kultur *S fusiformis* tidak dapat tumbuh tanpa fosfor dan hanya terlihat tumbuh hingga hari ke-17.

Gambar 2 memperlihatkan pengaruh konsentrasi nitrogen dan fosfor terhadap kandungan klorofil-a *S. fusiformis* yang digambarkan dalam persentasi berat kering biomassa. Pengaruh nitrogen maupun fosfor tersebut nampak lebih nyata pada kondisi defisiensi yang ekstrim. Kandungan klorofil-a turun hingga 0,65 % berat kering pada kultur dalam media tanpa nitrogen, sementara pada konsentrasi nitrogen di atas 7,5 mM relatif stabil antara 1,05-1,19% berat kering. Penurunan konsentrasi klorofil-a jugateramati pada kultur dengan



Gambar 1. Pertumbuhan biomassa kultur *S. fusiformis* pada variasi konsentrasi nitrogen (A) dan fosfor (B)



Gambar 2. Respon kandungan klorofil alga *Sfusiformis* terhadap variasi konsentrasi nitrogen dan fosfor

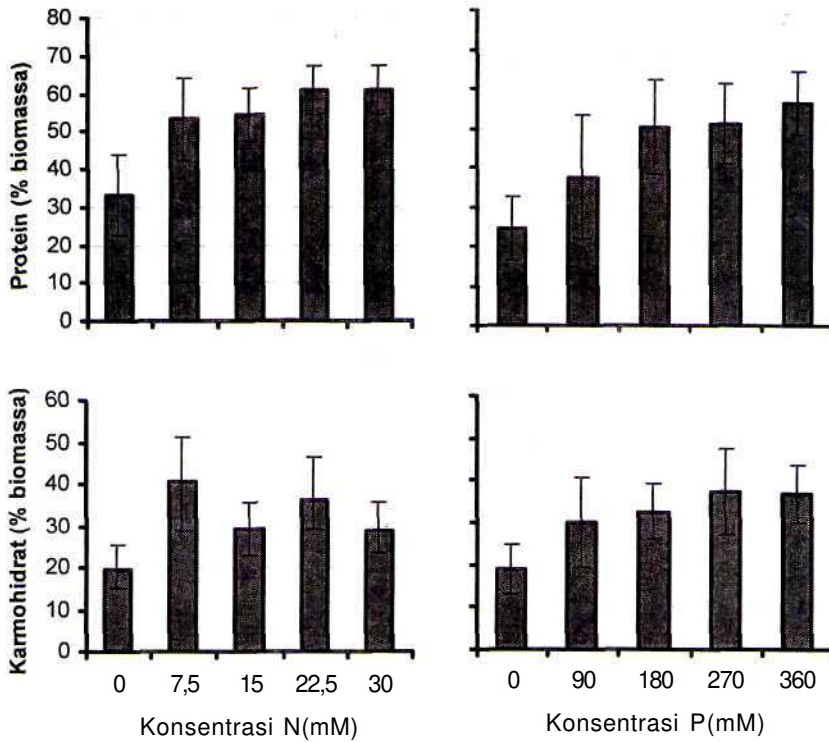
konsentrasi fosfor awal rendah hingga konsentrasi 90 mM P, sementara di atas konsentrasi tersebut kandungan klorofil-a relatif konstan.

Konsentrasi nitrogen dan fosfor yang rendah menghambat sintesis protein dan karbohidrat pada *Spirulina*. Hal ini terlihat dari lebih rendahnya kandungan protein dan karbohidrat pada kultur dengan konsentrasi awal N 0,0 mMn dan konsentrasi awal kurang dari 90 mM (Gambar 3). Pada kultur dengan konsentrasi awal nitrogen dan fosfor relatif tinggi (>7,5 mM N dan > 180 mM P) kandungan protein alga berkisar antara 50-60% dari biomasanya. Sementara pada konsentrasi nitrogen rendah (< 7,5 mM N) kandungan protein turun hingga sekitar 30% dari biomassa, bahkan pada kultur yang konsentrasinya fosfornya rendah (<180 mM P) kandungan protein turun hingga 24 % dari biomasanya. Demikian juga kandungan karbohidrat *Spirulina* pada konsentrasi nitrogen dan fosfor relatif tinggi berkisar antara 29-40% dari biomassa. Pada konsentrasi nitrogen dan fosfor rendah kandungan karbohidrat tersebut turun menjadi sekitar 8 - 19% dari biomasanya (Gambar 3). Sementara itu bila diperhatikan nilai proporsi kandungan protein terhadap karbohidrat (P/K) cenderung turun sejalan dengan berkurangnya ketersediaan unsur nitrogen dan fosfor, dari kisaran nilai 1,5-2,1 pada kultur dengan konsentrasi nitrogen >7,5 mM N dan fosfor > 180 mM P, menjadi antara 1,2-1,7 pada kultur dengan konsentrasi nitrogen <7,5 mM N dan fosfor <180 mM P.

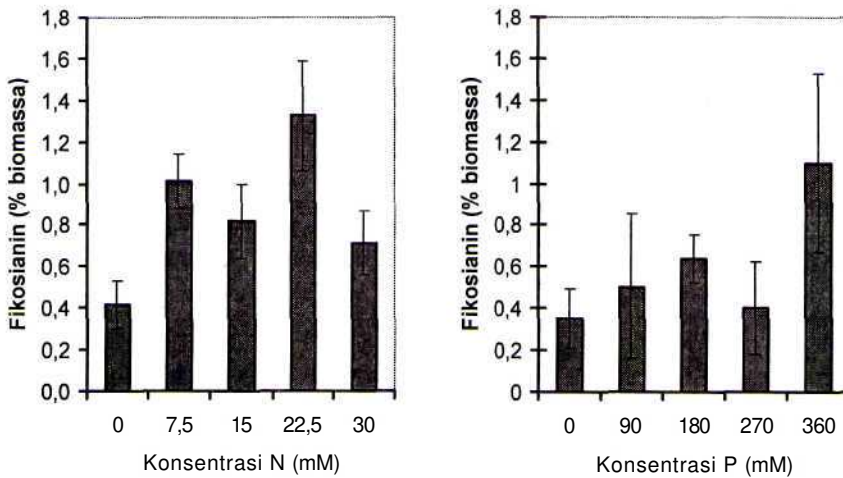
Gambar 4 memperlihatkan pengaruh unsur nitrogen dan fosfor terhadap kandungan fikosianin kultur *Spirulina*. Pola pengaruh nitrogen dan fosfor terhadap kandungan fikosianin relatif sama dengan pola pengaruh kedua unsur tersebut terhadap kandungan baik protein, karbohidrat, maupun klorofil *a* jenis alga tersebut (lihat Gambar 2 dan Gambar 3). terhadap perubahan konsentrasi kedua unsur hara makro tersebut. Kandungan fikosianin tertinggi didapat pada kultur dengan konsentrasi nitrogen 22,5 mM yang mencapai 1,2% berat kering, dan fosfor dengan konsentrasi 360 mM, mencapai 1,1 % berat kering. Kondisi defisiensi unsur nitrogen dan fosfor juga menghambat sintesis fikosianin sel, hingga kandungannya turun berturut-turut menjadi 0,42% dan 0,35% dari berat keringnya.

PEMBAHASAN

Secara umum respon tumbuh alga terhadap ketersediaan nutrien di dalam media digambarkan sebagai fungsi hiperbolik laju tumbuh alga terhadap konsentrasi unsur hara yang tersedia. Pola respon hiperbolik demikian nampak lebih nyata pada respon kultur *Sfusiformis* terhadap variasi konsentrasi unsur fosfor, sementara pada variasi konsentrasi unsur nitrogen respon kultur alga hanya terlihat pada kondisi kekurangan yang ekstrim, bahkan kultur masih terlihat tumbuh baik pada kondisi media tanpa nitrogen, meskipun mengalami sedikit penurunan laju



Gambar 3. Respon kandungan protein dan karbohidrat alga *S fusiformis* terhadap variasi konsentrasi nitrogen dan fosfor



Gambar 4. Respon kandungan fikosianin alga *Sfusiformis* terhadap variasi konsentrasi nitrogen dan fosfor

pertumbuhan, yaitu sekitar 25%. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang melaporkan masih berlangsungnya pertumbuhan biomassa kultur *Spirulina* hingga 40 jam setelah ditransfer ke media bebas nitrogen, dengan kompensasi peningkatan nilai

rasio C/N pada biomasnya (Tedesco & Duerr, 1989). Richmond (1988) mengaitkan kemampuan terus tumbuh dengan adanya kumpulan pigmen fikosianin yang berfungsi sebagai cadangan nitrogen pada sel-sel *Spirulina*. Namun kemampuan tumbuh hingga hari ke

24 pada media tanpa nitrogen pada percobaan ini dapat diinterpretasikan adanya kemampuan *Sfusiformis* untuk melakukan fiksasi unsur nitrogen dari udara, mengingat jenis alga ini merupakan bagian dari kelompok cyanobacteria yang banyak jenisnya memiliki kemampuan fiksasi nitrogen bebas.

Penelitian-penelitian sebelumnya telah banyak melaporkan berkurangnya vitalitas sel alga akibat defisiensi berbagai unsur hara. Hal tersebut terkait dengan hilangnya kemampuan sel untuk membangun struktur fungsional yang terkait dengan unsur hara yang jumlahnya terbatas tersebut. Nitrogen dan fosfor sangat berperan sebagai penyusun senyawa protein dalam sel, sehingga kekurangan kedua unsur tersebut menyebabkan sel-sel alga mengalami penurunan kandungan protein yang pada umumnya diikuti oleh degradasi berbagai komponen sel yang berkaitan dengan sintesa protein, termasuk klorofil *a* dan pigmen lainnya (Richardson *etal.*, 1969;Piorrect&Pohl 1984; Thomas *etal.*, 1984; Sukenik, 1991; Chrismadha, 1994; Chrismadha& Borowitzka, 1994). Fenomena menurunnya kandungan protein, klorofil *a*, dan fikosianin akibat defisiensi nitrogen dan fosfor juga teramati pada penelitian ini. Sementara penurunan kandungan karbohidrat yang terjadi sejalan dengan degradasi komponen-komponen fungsional sel tersebut memberikan indikasi berkurangnya kemampuan fotosintesis pada kondisi kekurangan unsur hara.

Vonshak & Richmond (1985) menekankan pentingnya produktivitas biomassa untuk menilai kelayakan ekonomi kultur alga. Sukenik (1991) melaporkan perlunya pencapaian produktivitas biomassa yang sejalan dengan produksi kandungan asam lemak tak jenuh pada kultur alga. Demikian juga pada upaya produksi pigmen fikosianin dari kultur *S fusiformis*. Upaya ini memerlukan kondisi tumbuh yang dapat mendukung pencapaian produktivitas biomassa yang tinggi serta menstimulasi kandungan fikosianin dalam sel alga yang tinggi pula. Pada penelitian ini terlihat produktivitas biomassa dapat dicapai pada konsentrasi nitrogen sekitar 7,5 mM, namun kandungan fikosianin maksimum ($1,32 \pm 0,26$ % dari biomassa) dicapai pada konsentrasi nitrogen 22,5 mM, sehingga untuk keperluan produksi fikosianin disarankan konsentrasi nitrogen optimum pada kisaran 22,5 mM.

Sejalan dengan hal tersebut konsentrasi fosfor optimum untuk produksi biomassa kultur *S fusiformis* adalah pada kisaran 270 mM, namun hingga konsentrasi fosfor tertinggi pada penelitian ini (360 mM) respon kandungan fikosianin sel alga masih memperlihatkan pola meningkat, yang berarti masih diperlukan peningkatan konsentrasi fosfor dalam media kultur untuk menstimulasi peningkatan produktivitas fikosianin tersebut.

KESMFULAN

Pertumbuhan optimal kultur *Spirulina fusiformis* yang digambarkan dengan perkembangan konsentrasi biomassanya dicapai pada konsentrasi nitrogen 7,5 mM dan fosfor 270 mM . Sedangkan kandungan fikosianin tertinggi dicapai pada konsentrasi nitrogen 22,5 mM, yaitu 1,2% berat kering, dan konsentrasi fosfor 360 mM, yaitu 1,1 % berat kering. Dengan demikian berdasar hasil penelitian ini konsentrasi nitrogen dan fosfor untuk produksi fikosianin dari kultur *Sfusiformis* adalah berturut-turut 22,5 mM dan 360 mM. Namun penelitian lanjutan masih diperlukan, khususnya terhadap pengaruh unsur fosfor terhadap kandungan fikosianin alga tersebut, karena pada penelitian ini masih belum memperlihatkan fenomena titik jenuhnya a.

DAFTARPUSTAKA

- Borowitzka MA. 1988.** Algal media and sources of algal culture. *In: Microalgal Biotechnology.* MA Borowitzka and LJ Borowitzka (Eds), 456-465. Cambridge University Press. Cambridge.
- Boussiba S and Richmond A. 1979.** Isolation and purification of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology* **120**,155-159.
- Boussiba S and Richmond A. 1980.** c-Phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology* **125**, 143 - 147.
- Chrismadha T. 1994.** Growth and lipid production of *Phaeodactylum tricornutum* in a tubular photobioreactor. Master Thesis, Murdoch University, Perth, Western Australia, **211** pp.
- Chrismadha T and Borowitzka MA. 1994.** Effect of cell density and irradiance on growth, proxymate

- composition and eicosapentanoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* grown in a tubular photobioreactor. *Journal of Phycology* 6, 67-74.
- Cortes MCC, Sly LI and Doelle HW. 1997.** The effect of nitrate concentration on phycocyanin production by *Spirulina platensis* UTEX 2340. *Proceeding of The 2nd Asia-Pacific Marine Biotechnology and 3rd Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology*, Phuket, Thailand, 7-10 May 1997, 261-264.
- Goldman JC. 1979.** Outdoor algal mass culture. II. Photosynthetic yield limitations. *Water Research* **13**,119—136.
- Jeffrey SW and Humprey GF. 1975.** New spectrophotometric equation for determining chlorophyll *a*, *b*, *c*₁, and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **1967**,191-194.
- Kochert G. 1978.** Carbohydrate determination by phenol-sulphuric acid method. In: *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods*. JA Hellebust and JS Craigie (Eds), 95-75. Cambridge University Press. Cambridge.
- Lowrey OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951.** Protein measurement with the folin-phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- Piorreck M and Pohl P. 1984.** Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids, and fatty acids in blue green algae during one growth phase. *Phytochemistry*, **23**,217-223.
- Reddy CM, Bhat VB, Kinarmay G, Redding MN, Reddana P and Mediastla KM. 2000.** Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by c-phycocyanin, a billiprotein from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **277**,597-603.
- Richardson B, Orcutt DM, Schwertner HA, Martinez CL and Wickline HE. 1969.** Effects of nitrogen-limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Applied Microbiology*, **18**,245-250.
- Richmond A. 1988.** *Spirulina*. In: *Microalgal Biotechnology*. MA Borowitzka and LJ Borowitzka (Eds), 85-121. Cambridge University Press. Cambridge.
- Roessler PG 1988.** Effect of silicon deficiency on lipid composition and metabolism in diatom *Cyclotella nana*. *Journal of Phycology*, **24**, 394-400
- Romay C, Armesto J, Ramirez D, Gonzalez R, Ledon N and Garcia I. 1998.** Antioxidant and anti-inflammatory properties of c-phycocyanin from blue-green algae. *Inflammatory Research*, **47**(1), 36-41.
- Romay C, Gonzalez R, Ledon N, Ramirez D and Rimbau V. 2003.** c-Phycocyanin: Abiliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*, **4**(3), 207-216.
- Sukenik A. 1991.** Ecophysiological consideration in optimization of eicosapentanoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Bioresource Technology* **35**,263-269.
- Taguchi S, Hirata JA, and Laws EA. 1987.** Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms. *Journal of Phycology* **23**, 260-267.
- Tedesco MA and Duerr EO. 1989.** Light, temperature, and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. *Journal of Applied Phycology* **1**,201-209.
- Thomas WH, Siebert DLR, Alden M, Neori A and Eldridge P. 1984.** Yield, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. I. Introduction and *Phaeodactylum tricornutum* experiments. *Biomass* **5**,181-209.
- Tornabene TG, Bourne TF, Raziuddin S and Ben-Am otz A. 1985.** Lipid and lipopolysaccharide constituents of cyanobacterium *Spirulina plantensis* (Cyanophyceae, Nostocales). *Marine Ecology Progress Series* **22**, 121-125.
- Vonshak A and Richmond A. 1985.** Problems in developing the biotechnology of algal mass production. *Plant and Soil* **89**, 129-135.