






## Marine diatom isolation, identification and investigation of nutrient effects on the diatom growth

Sait Çınar<sup>1</sup> , Didem Özçimen<sup>1\*</sup> , Mete Yılmaz<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Department of Bioengineering, Yildiz Technical University, Istanbul, 34210, Turkey

<sup>2</sup>Department of Bioengineering, Bursa Technical University, Bursa, 16310, Turkey

### Highlights:

- Marine diatom isolation
- Diatom characterization
- Effect of nutrients on diatom growth

### Keywords:

- Microalga
- Diatom
- *Pleurosigma* sp.
- Isolation

### Article Info:

Research Article  
Received: 17.11.2017  
Accepted: 11.05.2018

### DOI:

10.17341/gazimmfd.460509

### Correspondence:

Author: Didem Özçimen  
e-mail:  
ozcimen@yildiz.edu.tr  
phone: +90 212 383 4635

### Graphical/Tabular Abstract

Microalgae are new generation raw material resources that have been attracting much attention in recent years and have utilization potential in health, food, cosmetics, environment and biofuel production areas. In this study, targeting the isolation of diatoms, a major microalga species both in terms of quantities and functions, isolation studies were carried out on the water samples collected from the Mudanya shores of Marmara Sea and isolated diatom was identified as *Pleurosigma* sp. by DNA sequencing. Diatom's cell density showed statistically positive correlation with increase in silicon and nitrogen when isolated *Pleurosigma* sp. was cultivated in nutrient solutions containing nitrogen, phosphorus and silicon at different concentrations, but cell density was observed to reach a maximum level at 0.0096 mM phosphate concentration. In the characterization studies, it was observed that the diatom contained significant amounts of ash and silica and diatom's fatty acid profile overlapped with the fatty acid profiles of the frequently studied diatoms in literature.



Figure A. Microscope image of the isolated species (*Pleurosigma* sp.) (40X)

**Purpose:** To isolate and genetically identify a local diatom species from Mudanya shores in the Marmara Sea and to investigate the effects of nutrients on this diatom species.




**Theory and Methods:** Diatom was isolated using a combination of centrifugation, dilution culture and single cell isolation by a micropipette. Genetic characterization was performed using the strain's 18S rRNA gene sequence. Cells were incubated based on a 2<sup>3</sup> factorial design matrix and statistically analyzed to investigate the effects of nitrogen, phosphorus and silica on diatom growth. Moisture, volatile matter, fixed carbon, ash and functional group contents, fatty acid composition, total carbohydrate and lipid analyses of the diatom were performed.

**Results:** The isolated strain was genetically identified as *Pleurosigma* sp. Based on the nutrient experiments, the diatom biomass showed positive correlations with increase in nitrogen and silica, while the correlation was negative with increases in phosphorus. The strain was sensitive to changes in phosphorus content.

**Conclusion:** Isolated *Pleurosigma* sp. can be used in material science applications such as filtration, biosensors, biomedical implants due to its high absorption of silica in its frustules and also in environmental pollution studies due to its phosphorus sensitivity. In this sense Turkish waters provide important opportunities to scientists with their rich biodiversity.



## Denizel diatom izolasyonu, tanımlanması ve besin maddelerinin diatom büyümesi üzerine etkisinin incelenmesi

Sait Çınar<sup>1</sup> , Didem Özçimen<sup>1\*</sup> , Mete Yılmaz<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Davutpaşa, Esenler, İstanbul,34210, Türkiye

<sup>2</sup>Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Yıldırım, Bursa, 16330, Türkiye

### Ö N E Ç I K A N L A R

- Denizel diatom izolasyonu
- Diatom karakterizasyonu
- Besin maddelerinin diatom büyümesi üzerine etkileri

#### Makale Bilgileri

Araştırma Makalesi

Geliş: 17.11.2017

Kabul: 11.05.2018

DOI:

10.17341/gazimmfd.460509

#### Anahtar Kelimeler:

Mikroalg,  
diatom,  
*pleurosigma* sp.,  
izolasyon

#### ÖZET

Son yıllarda oldukça dikkat çeken mikroalgler sağlık, gıda, kozmetik, çevre ve biyoyakıt üretimi alanlarında kullanım potansiyeli bulunan yeni nesil hammadde kaynaklarıdır. Bu çalışmada, hem bulunma miktarı hem de fonksiyonları bakımından önemli bir mikroalg sınıfı olan diatomların eldesi hedeflenerek, Marmara Denizi Mudanya kıyılarından toplanan su örnekleri üzerinde izolasyon çalışması gerçekleştirilmiş ve elde edilen izolataın moleküler analizi yapılarak *Pleurosigma* sp. olduğu tespit edilmiştir. İzole *Pleurosigma* sp. farklı konsantrasyonlarda azot, fosfor ve silisyum içeren besin solüsyonlarında yetiştirilip istatistiksel olarak yorumlandığında, diatomun hücre yoğunluğunun, silisyum ve azot artışı ile belirgin şekilde pozitif korelasyon gösterdiği, ancak hücre yoğunluğunun 0,0096 mM fosfat konsantrasyonunda maksimum seviyeye ulaştığı gözlenmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmalarında, diatomun önemli miktarda silisyumlu yapılar içerdiği ve kül içeriğinin yüksek olduğu, yağ asidi profilinin literatürde diatomlarda sıklıkla karşılaşılan yağ asitleriyle örtüştüğü görülmüştür.

## Marine diatom isolation, identification and investigation of nutrient effects on the diatom growth

### H I G H L I G H T S

- Marine diatom isolation
- Diatom characterization
- Effect of nutrients on diatom growth

#### Article Info

Research Article

Received: 17.11.2017

Accepted: 11.05.2018

DOI:

10.17341/gazimmfd.460509

#### Keywords:

Microalga,  
diatom,  
*pleurosigma* sp.,  
isolation

#### ABSTRACT

Microalgae are new generation raw material resources that have been attracting much attention in recent years and have utilization potential in health, food, cosmetics, environment and biofuel production areas. In this study, diatoms, an important microalgal group both due to their abundance and functions, were targeted and an isolation study was carried out with the water samples collected from the Mudanya shores of the Marmara Sea. Isolated diatom was identified as *Pleurosigma* sp. by DNA sequencing. Diatom's cell density showed statistically positive correlation with increase in silicon and nitrogen when isolated *Pleurosigma* sp. was cultivated in nutrient solutions containing nitrogen, phosphorus and silicon at different concentrations, but cell density was observed to reach a maximum level at 0.0096 mM phosphate concentration. In the characterization studies, it was observed that the diatom contained significant amounts of ash and silica and diatom's fatty acid profile overlapped with the fatty acid profiles of the frequently studied diatoms in literature.

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: saitcinar16@gmail.com, ozcimen@yildiz.edu.tr, mete.yilmaz@gmail.com / Tel: +90 212 383 4635  
1144

## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Yeryüzünün en eski yaşam formlarından biri [1] olan mikroalgler, genetik ve fenotipik çeşitlilikleriyle biyosferin hemen hemen her yerinde bulunabilen [2], fototrofik, heterotrofik ya da mikсотrofik olarak yaşayan [3], genellikle basit morfolojide [4] organizmalardır. Prokaryotik ya da ökaryotik olabilen mikroalgler [2], basit yapılarıyla dinamik ve kompleks rekabetçi çevrede, yüksek derecede tuzluluk ve yüksek sıcaklık gibi sert iklim koşullarında, ışık ve besin yoksunluğu durumlarında hayatta kalabilirler [5]. Prokaryotik (Siyanobakter) hücreler membrana bağlı organellerden yoksun olarak alglerden ziyade bakterilere daha çok benzerken, pek çok yaygın alg türünü içeren ökaryotik olanlar ise hücresel fonksiyonları kontrol eden organellere sahiptirler [1]. Diatomlar (*Bacillariophyceae*), yeşil algler (*Chlorophyceae*), ve altın sarısı algler (*Chrysophyceae*) doğada bulunma miktarı bakımından en önemli mikroalg gruplarıdır [6].

Hem doğada bulunma miktarı hem de fonksiyonları bakımından önemli bir mikroalg sınıfı olan diatomlar, okyanuslarda üretilen birincil karbonun en az %30'unun [7] üretiminden sorumludurlar. Yapılarına göre radyal simetri gösteren sentral diatomlar ve bilateral simetri gösteren pennat diatomlar olmak üzere iki gruba ayrılan diatomlar [8], önemli oranda mekanik dayanıma sahip, früstül olarak isimlendirilen silisyum içerikli hücre duvarı ile karakterizedirler. Früstül formları ışığın hücre içindeki kloroplasta ulaşmasına izin veren saydam yapıda, gaz ve eriyiklerin hücreye taşınmasına izin veren delikli yapıdadır [9]. Epiteka ve hipoteka adında iki adet yarım yapının oluşturduğu früstül hücre duvarı ilaç kutusu veya petri kabı benzeri şekildedir. Teka yapılarının uçlarında türe morfolojik özgünlük kazandıran kapakçıklar (*valve*) yer alır [10]. Mikroalgler, farklı ürünlere hammadde olabilecek şekilde yüksek miktarda protein, lipit ve karbonhidrat içeriğine sahip olabilirler [11] ancak hücresel içerik türden türe ve yetiştirilme şartlarına göre değişiklik göstermektedir. [5, 12]. Gıda, sağlık, kozmetik, çevre, yakıt, materyal bilimi gibi pek çok alanda kullanım alanı bulunan mikrofabrikalar olarak adlandırılan mikroalgler, yüksek lipit içerikleriyle biyodizel hammaddesi [13], anaerobik çürüme ile biyogaz hammaddesi olarak [14] yakıt alanında, karotenoid, klorofil, fikobiliprotein gibi pigment [11, 15], esansiyel vitamin [12], protein ve sağlık açısından pek çok faydası olduğu bilinen omega-3 ve omega-6 yağ asitleri başta olmak üzere uzun zincirli yağ asidi içerikleriyle [16-18] gıda ve kozmetik alanlarında kullanım alanı bulmaktadır. Özellikle diatomlar özgün hücresel yapılarıyla ağır metal absorpsiyonu gerektiren biyoremediasyon uygulamalarında, biyomedikal implantlarda [19], su saflaştırma ya da kromatografik ayırmada kullanılan filtrasyon prosesleri ve biyosensör [20] gibi alanlarda kullanım potansiyeline sahiptirler.

Biyosferin her tarafına yayılmış mikroalgal çeşitlilik araştırmacılara, hedeflenen ürünü üretebilmek için; yetiştirme ortamlarının ya da üretim şekillerinin

esnetilmesine olanak sağlayacak şekilde potansiyel birçok uygun suş sunar [21]. Bu anlamda tatlı su kaynaklarından, tuzlu sulara, çöllerden, buzullara çok farklı coğrafik şartlarda varlık gösterebilen mikroalgler sahip oldukları çeşitlilikle değerli ürünler eldesinde bilim insanları için önemli araştırma konusudur.

Son yıllarda mikroalglerle ürün hedefli yapılan çalışmalarda, mikroalglerin farklı yetiştirme şartları altındaki büyüme parametrelerinin ve değerli ürün açısından hücresel kompozisyonlarının incelendiği ve endüstriyel üretime uygulanabilirliklerinin araştırıldığı görülmektedir. Araştırmalarda ulusal/uluslararası kültür koleksiyonlarından temin edilen ya da yerel olarak izole edilen alg türleri kullanılmaktadır. Yerel olarak izole türlerin bölgesel adaptasyonunun daha kolay olması, bilinen potansiyelden fazlasını vaat etmesi vb. sebepler araştırmacıları yerel türleri keşfetmeye iten sebeplerdir [12, 22]. Yerel izole türler elde etmek amacıyla, mikropipet ile izolasyon, dilüsyon [23], yerçekimi ile izolasyon [24], fototaksis ile izolasyon [25] gibi geleneksel izolasyon teknikleri ve mikromanipülasyon [26], flow sitometri [27] gibi ileri izolasyon teknikleri kullanılmakta, bu tekniklere ilaveten antibiyotik [28] ve filtrasyon [29] gibi teknikler ile türler aksenik hale getirilmektedir. En iyi sonucu almak amacıyla, hedeflenen mikroalg türüne ve mevcut şartlara göre izolasyon ve temizleme teknikleri birbirleriyle kombine edilerek uygulanır.

Ticari ürün elde edilmesinde mikroalglerin yetiştirme koşulları büyük önem arz etmektedir. Azot [30-32], fosfor [33-35] ve diatomlar için silisyum [36-38] gibi besin maddeleri [39, 40], ışık [41], sıcaklık [42, 43], pH [44, 45], tuzluluk [46], karıştırma miktarı [47] vb. parametreler mikroalgal büyümeyi etkileyen ve türe, çevre şartlarına, hedef ürüne göre optimize edilmesi gereken parametrelerdir. Literatürde diatomlar ile yapılan çalışmalarda diatomların, azot [48-50], fosfor [51-53] gibi elementlere ve diğer türlerden farklı olarak früstül yapılarıyla ilişkili silisyuma [54-56] ihtiyaçlarının olduğu ve bu besin maddeleriyle büyümenin korelasyon gösterdiği görülmektedir [57, 58]. Diatom çalışmalarında her bir türün optimal besin konsantrasyonu değerinin farklı olduğu [49, 51] ve hücresel içeriklerin de türler arasında [22, 59], büyük farklılık gösterdiği ortaya konmaktadır [60-62].

Bu çalışmada yerel olarak Marmara Denizi Mudanya kıyılarından diatom türü izole edilmiş, izole edilen tür tanımlanmış ve besin elementlerinin diatom büyümesi üzerine etkileri incelenmiştir.

## 2. DENEYSEL METOT (EXPERIMENTAL METHOD)

### 2.1. Diatom İzolasyonu (*Diatom Isolation*)

İzolasyon çalışması Marmara Denizi Mudanya kıyılarından 11 Aralık 2016 tarihinde alınan örnek ile yapılmıştır. Örneklerin bazıları doğrudan bazıları ön santrifüjleme yapılarak yoğunlaştırıldıktan sonra -alınan bölgedeki

tuzluluk değerlerine yakın olması amacıyla- 27 ppt ve 37 ppt tuzlulukta iki farklı silisyumlu L1 ortamıyla- 1:10 seyreltme oranıyla seyreltilerek plakaya ekimleri yapılmış ve ardından inkübatöre koyulmuştur. Dilüye edilen örnekler çoğalma gösterdiğinde ters faz ışık mikroskobu altında mikropipet ile tek hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Tek hücre izolasyonu yapılan türlerde çoğalma gösterenlere hacim artışı yapılmış ve kültür devam ettirilmiştir. İzolasyon ve büyüme deneyi çalışmalarında inkübatör koşulları 12:12 aydınlık karanlık rejimi, 60 µmol foton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ışık ortamı ve yaklaşık 23°C ortam sıcaklığı şeklinde uygulanmıştır.

## 2.2. Tür Karakterizasyonu (Species Characterization)

İzole edilen türün tanımlanması için 18S RNA gen bölgesi D512F/D978R primerleri (Tablo 1) ile koloni PCR yapılarak BioRad T100 marka/model termal döngü cihazında çoğaltılmıştır.

**Tablo 1.** Koloni PCR'da kullanılan primerler [63,64]  
(Primers used in colony PCR [63, 64])

Primer Adı	Dizi
D512F	ATT CCA GCT CCA ATA GCG
D978R	GAC TAC GAT GGTATC TAATC

Koloni PCR için reaksiyon Tablo 2'de belirtilen şekilde New England Biolabs markalı reaktifler ile 50 µl hacminde kurulmuştur. Kalıp DNA olarak santrifüjlenen diatom peleti kullanılmıştır. PCR ürünleri elektroforez jelinde yürütülerek doğru noktada konumlanan DNA bandı geri alınmış ve ABI 3130 XL 16 capillary cihazıyla sanger dizileme yapılmıştır. Dizileme sonuçları SnapGeneViewer programı ile düzenlenmiş ve NCBI (National Center for Biotechnology Information-<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) internet sitesinde nükleotit veri bankası aracılığıyla BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) [65, 66] analizine tabi tutulmuştur.

**Tablo 2.** PCR reaksiyonu (PCR reaction)

İçerik	Kullanılan Miktar
5X Reaksiyon Tamponu	10 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
D512F Primeri (10 uM)	2,5 µl
D978R Primeri (10 uM)	2,5 µl
HF DNA Polimeraz	0,5 µl
Saf Su	33,5 µl
Kalıp DNA	Diatom Pellet

Karakterizasyon amacıyla diatom örneğinin nem, uçucu madde, sabit karbon ve kül içeriğinin belirlenmesi için TA Instrument marka, SDT Q600 model TGA cihazıyla termogravimetrik kısa analiz gerçekleştirilmiştir. Örneğin içerdiği fonksiyonel grupların tespit edilmesi 400-6000 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında Bruker marka cihaz ile FTIR analizi ile sağlanmıştır. Toplam karbonhidrat analizi fenol-sülfürik asit metoduyla, toplam yağ analizi Soxhlet ekstraksiyon metoduyla yapılmıştır. Yağ asidi kompozisyonu YL

Instruments 6100 GC marka gaz kromatografisi FID dedektörü ile 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm ZB-FFAP kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## 2.3. Besin Maddelerinin Büyüme Üzerine Etkisi (Effects of Nutrients on Growth)

Azot, fosfor ve silisyumun diatom büyümesi üzerine etkilerini incelemek için, kültür ortamındaki NO<sub>3</sub>, PO<sub>4</sub>, ve SiO<sub>3</sub> konsantrasyon değerleri (Tablo 3) normalize edilmiş ve temel seviye ticari L1 besin solüsyonundaki gerçek konsantrasyon değerlerini ifade edecek şekilde 2<sup>3</sup> faktöriyel tasarım uygulanmıştır. Tablo 4'te gösterilen faktöriyel tasarım matrisine uygun olarak 19 gün boyunca inkübe edilen hücrelerin sayısı MiniTab programıyla istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

**Tablo 3.** PO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub> ve SiO<sub>3</sub> konsantrasyonlarının faktöriyel seviyeleri (Factorial levels of PO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub> and SiO<sub>3</sub> concentrations)

Bileşen	Alt seviye	Temel seviye	Üst seviye
PO <sub>4</sub>	0,007 mM	0,036 mM	0,064 mM
NO <sub>3</sub>	0,17 mM	0,88 mM	1,58 mM
SiO <sub>3</sub>	0,021 mM	0,106 mM	0,189 mM

**Tablo 4.** Seçilen parametreler için faktöriyel tasarım matrisi (Factorial design matrix for selected parameters)

Deney No	NO <sub>3</sub>	PO <sub>4</sub>	SiO <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0

Fosfor besin bileşeninin ayrıntılı incelemesi yapılmak üzere, ayrıca diatom L1 ortamındaki nitrat, silikat, iz element ve vitamin değerleri sabit tutularak, farklı fosfat konsantrasyonlarında (0,0076, 0,0096, 0,016, 0,036, 0,056, 0,076, 0,096 mM PO<sub>4</sub>) 19 gün boyunca inkübe edilmiştir. Çalışmalarda hücre yoğunluğu mikroskopik yöntemle termol ve hemositometre kullanılarak hesaplanmıştır.

## 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR (RESULTS AND DISCUSSIONS)

### 3.1. Diatom İzolasyonu (Diatom Isolation)

Marmara Denizi Mudanya kıyılarından izole edilen diatomun 40X yaklaştırmayla mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 1' de görülmektedir. Moleküler olarak tür tanımlama için diatomlarda yaygın olarak kullanılan ve 1800 bp büyüklüğündeki 18S rRNA (SSU rRNA) gen bölgesinin, yaklaşık 400 bp uzunluğundaki (V4 barkod bölgesi) bölgesi Sanger dizileme metodu ile dizilendiğinde aşağıda belirtilen kısmi dizi elde edilmiştir.

*Pleurosigma sp.*'nin 18S rDNA kısmi dizisi

```
>TGCCATCCTTGGGTGGAATCTGTGTGGCATTAGG
TTGTCGTGCAGGGGATGCCCATCGTTTACTGTGAA
AAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTATGCCGTTG
AATATGTTAGCATGGAATAATAAGATAGGACATTG
GTACTATTTTGTGGTTTGCACCAATGTAATGGT
TAAAAGGAACGGATAGGGGTATTCGTATTCAGCTG
TCAGAGGTGAAATCTTGGATTTTCTGAAGACGAA
CTACTGCGAAAGCATTACCAAGGATGTTTTTCATT
AATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGAT
TAGATACCATCGTAGTCA
```

Dizileme sonuçları NCBI internet sitesinde BLAST analizine tabi tutularak hizalandığında Şekil 2'deki skor değerleri ortaya çıkmıştır. BLAST analizine göre izolatan %99 benzerlikle *Pleurosigma sp.* olduğu belirlenmiştir. Mikroskopik hücre sayımı yapılarak elde edilen spesifik büyüme hızı 0,173 gün<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur [67].



**Şekil 1.** İzole edilen türün mikroskop görüntüsü (40X)  
(Microscope image of isolated species (*Pleurosigma sp.*) (40X))

3.2. Tür Karakterizasyonu (*Species Characterization*)

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında nem içeriği %8,6, uçucu madde içeriği %8,37, sabit karbon içeriği %1,82 ve kül içeriği %81,66 olarak bulunmuştur. Yüksek kül içeriği birçok diatom türü için tipik bir durumdur [68]. İzole edilen

*Pleurosigma sp.*'nin kül içeriğinin literatürde yapılan çalışmalara göre yüksek olduğu görülmektedir [22], ancak bazı diatom türlerinde kül içeriği kuru ağırlıkça %55-60 gibi değerlere çıkabilmektedir [59, 69]. Silisyumlu früstül yapılarıyla karakterize diatomların yüksek miktarda silisyum ihtiyacı olduğu göz önünde bulundurulduğunda kül içeriğinin büyük oranda silisyumdan kaynaklandığı görülmektedir.

Şekil 3 diatomun FTIR spektrumunu göstermektedir. FTIR analizinde 930 cm<sup>-1</sup> ve 1100 cm<sup>-1</sup> dalga sayısındaki pikler sırasıyla diatoma spesifik Si-O-Si gerilmesi ve Si-O-CH<sub>3</sub> [70, 71], 1240 cm<sup>-1</sup> dalga sayısındaki pik P=O bağımlı [72], 1416 cm<sup>-1</sup> dalga sayısındaki pik CH<sub>3</sub> bükülmesini [70], 1554 cm<sup>-1</sup> dalga sayısındaki pik NH<sub>2</sub> grubunu [73], 1633 cm<sup>-1</sup> dalga sayısındaki pik amidlerdeki C-O gerilmesini [70], 2856 cm<sup>-1</sup> dalga sayısındaki pik alifatik CH<sub>3</sub> grubunu [72], 2929 cm<sup>-1</sup> dalga sayısındaki pik C-H bağımlı [74] göstermektedir. 3300 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı civarındaki geniş pik örnek içerisindeki nemden kaynaklanan O-H bağımlı [74] göstermektedir.

Toplam karbonhidrat miktarı kuru ağırlıkça %29,25 olarak bulunmuştur. Diatom türleriyle yapılan çalışmalarda karbonhidrat içeriğinin türe, kültür içeriğine ve yetiştirme koşullarına göre değiştiği görülmektedir. Scholz ve Liebezeit [22] kuru ağırlıkça karbonhidrat içeriğini *Pleurosigma angulatum* için %8,1, üç farklı *Gyrosigma* türü için %20,8 - 36,3 aralığında; Myklestad ve Haug [60] *Chaetoceros affinis var. willei* (Gran) Hustedt için %25 olarak, Brown vd. [75] *Thalassiosira pseudonana* için %13, Coombs vd. [76] *Navicula pelliculosa* için %21 olarak bulmuşlardır.

Toplam yağ miktarı kuru ağırlıkça %20 olarak bulunmuştur. Literatürde yapılan çalışmalarda Chen [77] *Pleurosigma elongatumun* da olduğu diatom konsorsiyumunun kuru ağırlıkça yağ içeriğinin %21,5 olduğunu, Karpenyuk vd. [78] *Pleurosigma attenuatum* için %20,58 [76], Scholz ve Liebezeit [22] *Pleurosigma angulatum* için %33,5 olduğunu ve üç farklı *Gyrosigma* türünün lipit içeriğinin %22,4- %30,1 arasında değiştiğini, Marella vd. [79] *Pleurosigma normanii*'nin yağ içeriğinin %9,1 olduğunu bildirmişlerdir.

**Descriptions**

Sequences producing significant alignments:  
Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Pleurosigma planktonicum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	606	606	99%	7e-170	99%	<a href="#">AY485514.1</a>
<a href="#">Pleurosigma sp. GGM-2004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	580	580	99%	4e-162	98%	<a href="#">AY485515.1</a>
<a href="#">Tryblionella apiculata strain TA-85 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	532	532	99%	1e-147	96%	<a href="#">KY320397.1</a>
<a href="#">Nitzschia ilgovskii strain TA426 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	532	532	99%	1e-147	96%	<a href="#">KY320392.1</a>
<a href="#">Tryblionella gaoana isolate SZCZCH97 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	532	532	99%	1e-147	96%	<a href="#">KT943638.1</a>
<a href="#">Bacillariophyta sp. 1 MAB-2013 isolate GSP108-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	532	532	99%	1e-147	96%	<a href="#">KF177695.1</a>

**Şekil 2.** İzole edilen türün BLAST analizi skor değerleri (BLAST analysis score values of isolated species)

Şekil 4'teki diatoma ait gaz kromatogramı incelendiğinde, izole edilen tür diatomlarda yaygın olarak gözlenen palmitik asit (16:0), oleik asit (18:1) gibi yağ asitlerini, eikosapentaenoik asit (20:5 ω-3) gibi önemli ω -3 yağ asidini, linoleik asit (18:2, ω-6), eikosatriyonik asit (20:3, ω-6) gibi omega-6 yağ asitlerini ve erüsik asidi (22:1) içermektedir. Yağ asidi profili genellikle diatomlarda karşılaşılan yağ asidi profiliyle örtüşmektedir [80, 81].

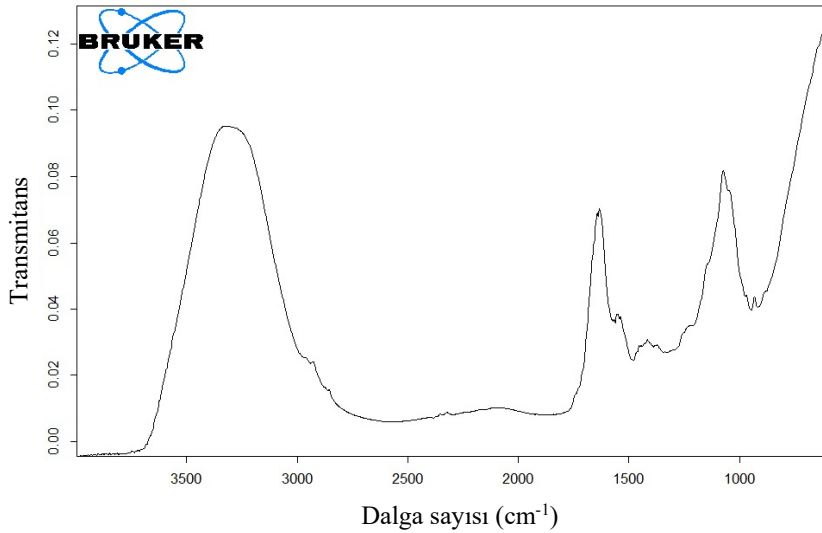
### 2.3. Besin Maddelerinin Büyüme Üzerine Etkisi (Effects of Nutrients on Growth)

Mikroalglerin yetiştirilmesinde kullanılan ortamların formülasyonları ve her bir besin elementinin ortam içeriğindeki miktarı mikroalgin türüne ve ihtiyacına göre değişiklik göstermektedir. Özellikle de büyük ölçekli üretim planlandığında ekonomik olarak uygulanabilirlik açısından her mikroalg türünün büyümesi için optimum koşulları belirlemek ve özellikle yerel olarak izole edilen türler için besin elementlerinin optimizasyonunu yapmak ayrı bir önem taşımaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmada, 2<sup>3</sup> faktöriyel

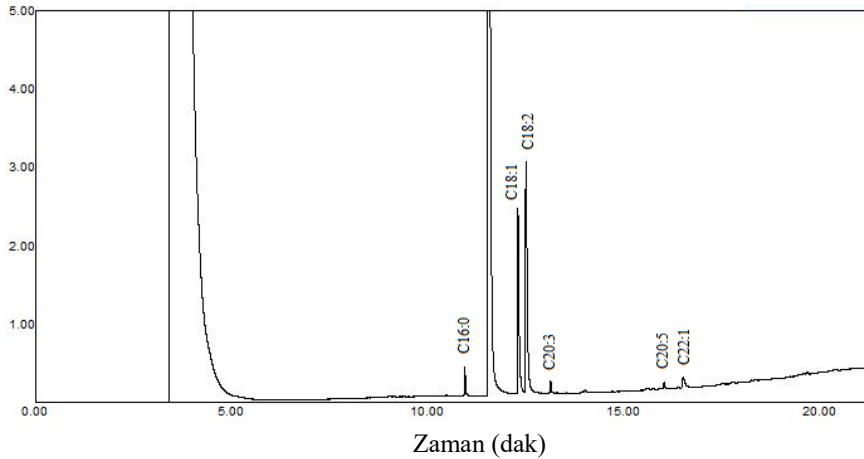
tasarıma göre seçilen 9 koşul altında gerçekleştirilen ve tekrarlı olarak yapılan deneylerden elde edilen hücre sayımı verilerine “çoklu lineer regresyon” yöntemi uygulandığında;

$$Y = 155 + 35,2 X_1 - 21,9 X_2 + 38,1 X_3 \quad (1)$$

normalize eşitliği elde edilmiş ve denklemin R<sup>2</sup> değeri %93,3 olarak bulunmuştur. Eş. 1'de X<sub>1</sub> ile ifade edilen NO<sub>3</sub> ve X<sub>3</sub> ile ifade edilen SiO<sub>3</sub> parametrelerinin hücre sayısı (Y) üzerine etkisi pozitif, X<sub>2</sub> ile ifade edilen PO<sub>4</sub> parametresinin etkisi negatif olarak bulunmuştur. Proteinleri oluşturan amino asitlerin, nükleik asitlerin, klorofil ve fikosiyanın gibi pigmentlerin yapısında yer alan, hücresel büyüme ve metabolizma için hayati öneme sahip azotun diatom büyümesini pozitif yönde etkilediği literatürde yapılan pek çok çalışmada gösterilmektedir [59, 60]. Hemalatha vd. [52] *Chaetoceros simplex* için optimum nitrat konsantrasyonunun 1764 µM olduğunu, Yang vd. [51] *Navicula patrickae*, *Nitzschia panduriformis*, *Navicula thienemannii*, *Nitzschia longissima* ve *Navicula atomus* ile yaptıkları çalışmada 0 – 74,16 mg/L azot konsantrasyonu aralığında azotun pozitif



Şekil 3. Diatomun FTIR spektrumu ( FTIR spectrum of diatom)



Şekil 4. Diatomun yağ asidi metil esterlerinin kromatogramı  
(Chromatogram of fatty acid methyl esters of diatom)

etki ettiğini, Khan vd. [49] *Skeletonema costatum* için optimum NO<sub>3</sub> konsantrasyonunun 3-10 mg/L olduğunu, Wang Qui-hua vd. [48] *Cocconeis scutellum* için optimal azot konsantrasyonunun 3,08 mg/L *Amphora coffeaeformis*, *Navicula corymbosa* ve *Navicula mollis* için 1,54 mg/L olduğunu bildirmişlerdir.

Früstül adı verilen diatom hücre duvarının ana maddesini oluşturan ve bu yüzden diatomların büyük miktarlarda ihtiyaç duyduğu, hücresel metabolizmada bazı proteinlerin sentezinde, klorofil sentezinde, sitrik asit döngüsünde rol alan [82] silisyumun [83,84], diatomların hücre büyümesine pozitif etkisi yapılan çalışmalarda gösterilmektedir [85], [66, 67].

Turpin vd. [85] diatom *Haslea ostrearia* için silisyumun büyüme sınırlandırıcı element olduğunu belirtmişlerdir. vd. [86] *Cocconeis scutellum var. parva* için suni deniz suyunda optimal silisyum konsantrasyonunu 2 mg/L, *Cocconeis scutellum var. parva*, *Amphora coffeaeformis* ve *Navicula mollis* türleri için doğal deniz suyunda 2,5 mg/L olarak, Yang vd. [51] *Navicula* türleri için optimum silisyum konsantrasyonu 69,03 mg/L olarak, *Nitzschia* türleri için 11,50 mg/L ve 34,51 mg/L olarak bulmuşlardır. Jorgensen vd. [87] *Nitzschia palea* için 0,1 mg/l silisyum konsantrasyonundan 5 mg/L'ye kadar büyüme ile silisyumun korele olduğunu yukarıda ise etkinin belirsizleştiğini bildirmişlerdir.

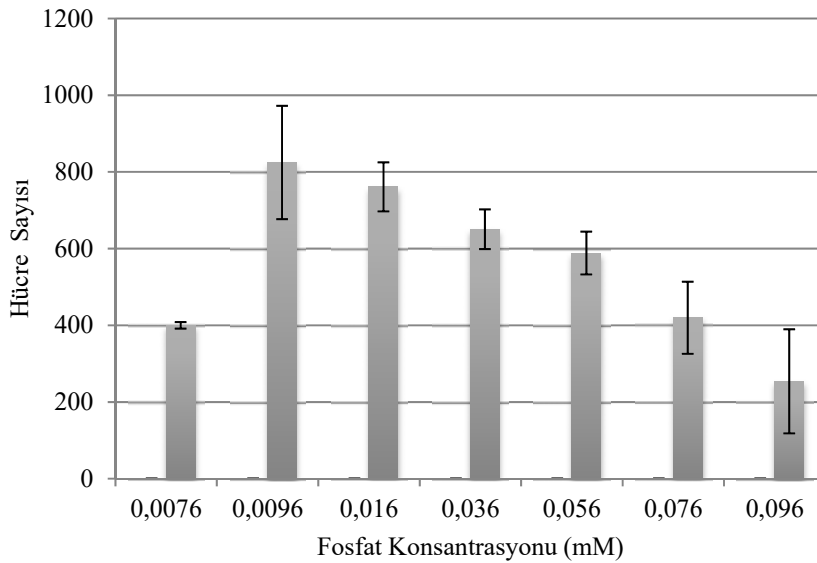
Nükleik asitlerin, membran fosfolipitlerinin ve ATP gibi önemli moleküllerin yapısına katılan fosforun literatürde diatomlar için büyüme etkisinin çoğunlukla pozitif olduğu bildirilmektedir. Çalışmada etkinin negatif görülmesi üzerine gerçekleştirilen detaylı fosfat konsantrasyonu denemesine göre optimal fosfat konsantrasyonu 0,0096 mM olarak (Şekil 5) bulunmuştur. Optimal değere kadar büyümenin arttığı bu değerden sonra azaldığı görülmektedir.

Optimum değer altında ve üstündeki konsantrasyonlarda hücre yoğunluğunun hızla değişmesi türün fosfor değişimine hassas olduğunu göstermektedir.

Fosfat konsantrasyonunun artmasıyla hücre sayısında meydana gelen azalmanın en önemli sebebinin aksenik olmayan kültürde başka mikroorganizmaların fosfor zenginliğinden daha fazla avantaj elde etmesi ve böylece baskın hale gelmesi olduğu düşünülmektedir. Genel olarak ortamda besin miktarları arttığında ötrofikasyon meydana geldiği bilirse de bazen bu durum türlerin kaybolmasıyla da sonuçlanabilmektedir. Yarışma, allelopati, habitat değişimi, viral ya da bakteriyel saldırılar bunu sağlayan mekanizmalar arasında olabilir [88].

Katiyar vd. [53] diatom topluluğunun 0,05 mM fosfat konsantrasyonuna kadar büyüme gösterdiğini bu konsantrasyondan sonra büyümede azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir. Wim Admiral [54] *Navicula* ve *Gyrosigma* türlerinin de olduğu 10 diatomda 0,9 mM fosfat konsantrasyonunda büyümenin inhibe olduğunu ve bu değerler arasında büyüme miktarlarında dalgalanma meydana geldiğini bildirmiştir.

Ketchum [56] *Asterionella formosa* diatomu için 0,002 mg/L fosfat konsantrasyonun optimum olduğunu ve 0,05 mg/L fosfor konsantrasyonu üzerinde büyümenin inhibe olduğunu, Hemalatha vd. [52] 72,4 µM PO<sub>4</sub> konsantrasyonunun *Chaetoceros simplex* için optimum olduğunu, Wang Qui-ha vd. [48] *Amphora coffeaeformis* için optimum fosfor konsantrasyonunu 1,13 mg/L *Cocconeis scutellum* için 0,283 mg/L, *Navicula corymbosa* için 0,565 mg/L, *Navicula mollis* için 0,141 mg/L olduğunu, Yang vd. [51] *Navicula* türleri için optimum fosfor konsantrasyonunun 2,84 mg/L ve 3,41 mg/L olduğu, *Nitzschia* türleri için 2,27 mg/L ve 3,41 mg/L olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 5. Farklı fosfat konsantrasyonlarında hücre sayısı (Number of cells at different phosphate concentrations)

#### 4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Marmara Denizi Mudanya kıyılarından mikropipet ile tek hücre izolasyonu, dilüsyon, yerçekimi ile izolasyon gibi yöntemler kombine edilerek diatom izolasyonu gerçekleştirilmiş ve diatom moleküler tekniklerle *Pleurosigma sp.* olarak tanımlanmıştır. Besin elementi optimizasyonu deneylerine göre, diatom büyümesinde azot ve silisyum ile pozitif, fosfor ile negatif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. Seçilen konsantrasyon değerleri detaylandırıldığında türün fosfor değişimine karşı hassas olduğu ve optimum fosfat konsantrasyonunun 0,0096 mM olduğu belirlenmiştir. Diatomlarla yapılan başka çalışmalarla da uyumlu olarak belirli konsantrasyondan sonra inhibisyon meydana gelmesinin, akselik olmayan kültürde yarışma, bakteriyel saldırı gibi durumların sebep olabileceği düşünülmektedir.

İzole edilen *Pleurosigma sp.*, silisyumu yüksek miktarda absorbe etmesi ve silisyumlu früstül yapısıyla filtrasyon prosesleri, biyosensör uygulamaları, biyomedikal implantlar vb. alanlarda genel olarak malzeme biliminde, fosfor hassasiyetiyle çevresel kirlilik kontrolü uygulamalarında kullanılabilir. Ticari açıdan potansiyel olabilecek diatom türlerinin yerel bölgelerden izole edilmesi ve hücresel içeriklerinin ortaya çıkarılması, gerçekçi ve uygulanabilir şartlarda yetiştirilerek besin vb. ihtiyaçlarının tespit edilmesi türlerin değerlendirilebilmesinin ilk adımudur. Bu anlamda Türkiye coğrafyası geniş bir biyoçeşitlilik potansiyeli ile bilim insanlarına önemli fırsatlar sunmaktadır.

#### KAYNAKLAR (REFERENCES)

- Brennan L., Owende P., Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2), 557-577, 2010.
- Kim S., *Handbook of Marine Microalgae*, First Edition, Elsevier Inc., San Diego, 2015.
- Baicha Z., Salar-Garcia M.J., Ortiz-Martínez V.M., Hernández-Fernández F.J., Ríos A.P., Labjar N., Lotfi E., Elmahi M., A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells, *Fuel Processing Technology* 154, 104-116, 2016.
- Tandon P., Jin Q., Microalgae culture enhancement through key microbial approaches, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 1089-1099, 2017.
- Ejike E. C. C., Collins S. A., Balasuriya N., Swanson A. K., Mason B., Udenigwe C. C., Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health, *Trends in Food Science & Technology*, 59, 30-36, 2017.
- Pina-Pérez M. C., Rivas A., Martínez A., Rodrigo D., Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food, *Food Chemistry*, 235, 34-44, 2017.
- Raven J.A., Waite A.M., The evolution of silicification in diatoms: inescapable sinking and sinking as escape, *New Phytologist*, 162, 45–61, 2004.
- Fuhrmann T., Lanwehr S., El Rharbi – Kucki M. ve Sumper, M., Diatoms as living photonic crystals, *Applied Physics*, 82, 909–965, 1997.
- Round F. R., Crawford R. M., Mann D.G., *The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*, Cambridge University Press, Cambridge, 1990.
- Dolatabadi J. E. N., Guardia M., Applications of diatoms and silica nanotechnology in biosensing, drug and gene delivery, and formation of complex metal nanostructures, *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (9), 1539-1548, 2011.
- Chew K. W., Yap J. Y., Show P. L., Suan N. H., Juan J. C., Ling T. C., Lee D., Chang J., Microalgae biorefinery: high value products perspectives, *Bioresource Technology*, 229, 53-62, 2017.
- Spolaore P., Cassan C. J., Duran E., Isambert A., Commercial applications of microalgae, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87-96, 2006.
- Chisti Y., Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, 25, 294-306, 2007.
- Oncel S. S., Microalgae for a macroenergy world, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26, 241-264, 2013.
- Gong M., Bassi A., Carotenoids from microalgae: A review of recent developments, *Biotechnology Advances*, 34(8):1396-1412, 2016.
- Crawford M. A., Costeloe K., Ghebremeskel K., Phylactos A., Skirvin L., Stacey F., Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of preterm babies, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 1032-44, 1997.
- Gupta A., Barrow C. J., Puri M., Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils, *Biotechnology Advances*, 30, 1733-1745, 2012.
- Rubio-Rodriguez N., Beltran S., Jaime I., Diego S. M., Sanz M. T., Carballido J. R., Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 1-12, 2010.
- Lebeau T., Robert J. M., Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 624–632, 2003.
- Parkinson J., Gordon R., Beyond micromachining: the potential of diatoms, *Tibtech*, 17:190-196, 1999.
- Rawat I., Kumar R.R., Mutanda T., Bux F., Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production, *Applied Energy*, 103, 444-467, 2013.
- Scholz B., Liebezeit G., Growth responses of 25 benthic marine Wadden Sea diatoms isolated from the Solthörn tidal flat (southern North Sea) in relation to varying culture conditions, *Diatom Research*, 27 (1), 65–73, 2012.
- Andersen R. A., *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press, Hong Kong, 2005.
- Mutanda T., Ramesh D., Karthikeyan S., Kumari S., Anandraj A., Bux F., Bioprospecting for hyper-lipid



- producing microalgal strains for sustainable biofuel production, *Bioresource Technology*, 102, 57–70, 2011.
25. Paasche E., A simple method for establishing bacteria free cultures of phototactic flagellates, *Conseil International pour l'Exploration de la Mer.*, 33, 509–511, 1971.
  26. Fröhlich J., Kornig H., New techniques for isolation of single prokaryotic cells, *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 24, 567-572, 2000.
  27. Jacobsen C., Nielsen N.S., Horn A. F., Sorensen A., M., Food Enrichment with omega-3 Fatty Acids, First Edition, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2013.
  28. Jones A. K., Rhodes M. E., Evans S. C., The use of antibiotics to obtain axenic cultures of algae, *British Phycological Journal*, 8, 2, 185-196, 1973.
  29. Heaney S. I., Jaworski, G. H. M., A simple separation technique for purifying micro-algae, *British Phycological Journal*, 12, 2, 171-174, 1977.
  30. Howarth R., Marino R., Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication in coastal marine ecosystems: evolving views over three decades, *Limnology and Oceanography*, 51, 364–376, 2006.
  31. Juneja A., Ceballos R.M., Murthy G.S., Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review, *Energies*, 6, 4607-4638, 2013.
  32. Gordillo F. J. L., Jiménez C., Figueroa F. L., Niell F. X., Effects of increased atmospheric CO<sub>2</sub> and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis (Arthrospira)*, *Journal of Applied Phycology*, 10, 461–469, 1998.
  33. Schindler D. W., Evolution of phosphorus limitation in lakes, *Science*, 195, 260–262, 1977.
  34. Geider R.J., La Roche J., Redfield revisited: variability of C: N:P in marine microalgae and its biochemical basis, *European Journal of Phycology*, 37 (01), 1-17, 2002.
  35. Powell N., Shilton A., Chisti Y., Pratt S., Towards a luxury uptake process via microalgae – Defining the polyphosphate Dynamics, *Water Research*, 43, 4207–4213, 2009.
  36. Thamatrakoln K., Hildebrand M., Silicon uptake in diatoms revisited, a model for saturable and nonsaturable uptake kinetics and the role of silicon transporters, *Plant Physiology*, 146, 1397–1407, 2008.
  37. Javaheri N., Dries R., Burson A., Stal L. J., Sloot P. M. A., Kaandorp J. A., Temperature affects the silicate morphology in a diatom, *Nature*, 5, 11652-11661, 2015.
  38. Taguchi S., Hirata J.A., Laws E.A., Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms, *Journal of Phycology*, 23, 260–267, 1987.
  39. Wen Z.Y., Chen F., Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, 218–224, 2000.
  40. Coombs J., Halicki P. J., Holm-Hansen O., Volcani B. E., Studies on the biochemistry and fine structure of silicate shell formation in diatoms: II. Changes in concentration of nucleoside triphosphates in silicon-starvation synchrony of *Navicula pelliculosa* (Breb.) Hilde, *Experimental Cell Research*, 47, 315– 28, 1967.
  41. Ramanna L., Rawat I., Bux F., Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 80, 765–773, 2017.
  42. Ras M., Steyer J., Bernard O., Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, Springer, 12 (2), 153-164, 2013.
  43. Morris I., Glover H., Yentsch C., Products of photosynthesis by marine phytoplankton: The effect of environmental factors on the relative rates of protein synthesis, *Marine Biology*, 27, 1–9, 1974.
  44. Razzak S., Hossain M. M., Lucky R. A., Bassi A. S., de Lasa H., Integrated CO<sub>2</sub> capture, waste water treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 622–653, 2013.
  45. Hinga K.R., Co-occurrence of dinoflagellate blooms and high pH in marine enclosures, *Marine Ecology Progress Series*, 86, 181–187, 1992.
  46. Kumar K., Mishra S. K., Shrivastav A., Park M. S., Yang J., Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 875–885, 2015.
  47. Richmond A., Biological Principles of Mass Cultivation, In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (Ed. A. Richmond), CRC Press, Inc., Boca Raton, 125-178, 2004.
  48. Qi-hua W., Mei L., Shu-hong W., Ming-jin D., Ya-juan L., Ai-hua C., Studies on culture conditions of benthic diatoms for feeding abalone II. Effects of salinity, Ph, nitrogenous and phosphate nutrients on growth rate, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 16 (1), 78-83, 1998.
  49. Khan S., Haque M. M., Arakawa O., Onoue Y., The influence of nitrogen and phosphorus on the growth of a diatom *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, *Journal Profile: Bangladesh Journal of Fisheries Research*, 2 (1), 23-29, 1998.
  50. Yodsuan N., Sawayama S., Sirisansaneeyakul S., Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum*, *Agriculture and Natural Resources*, 51, 190-197, 2017.
  51. Yang M., Zhao W., Xie X., Effects of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth of five species of marine benthic diatoms, *Acta Ecologica Sinica*, 34, 311–319, 2014.
  52. Hemalatha A., Karthikeyan K. P., Girija K., Saranya C., Anantharaman P., Sampathkumar P., Effect of nutrients on the growth and biochemical composition of the marine diatom, *Chaetoceros Simplex* (Ostenfeld, 1901), 5 (1), 30-35, 2014.
  53. Katiyar D., Lall A. M., Singh B., Effect of phosphate on growth of diatoms, *Indian Journal of Scientific Research*, 1 (2), 103-106, 2010.

54. Admiral W., Tolerance of estuarine benthic diatoms to high concentrations of ammonia, nitrite ion, nitrate ion and orthophosphate, 43, 307-315, 1977.
55. Venkataraman G. S., The cultivation of algae, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, 1964.
56. Ketchum B. H., Mineral nutrition of phytoplankton, Annual Review Phytoplankton Physiology, 5, 55-74, 1954.
57. Hillebrand H., Sommer U., Effect of continuous nutrient enrichment on microalgae colonizing hard substrates”, Hydrobiologia, 426, 185–192, 2000.
58. Ke Z., Tan Y., Ma Y., Huang L., Wang S., Effects of surface current patterns on spatial variations of phytoplankton community and environmental factors in Sunda shelf, Continental Shelf Research, 82, 119-127, 2014.
59. Parsons T. R., Stephens K., Strickland J.D. H., On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankton, Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 18, 1001-16, 1961.
60. Mykkestad S., Haug A., Production of Carbohydrates by marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I.Effect of the concentration of nutrients in the culture medium, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 9, 125-136, 1972.
61. Brown M. R., Dunstan G. A., Norwood S. J., Miller, K. A., Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*, Journal of Phycology, 32, 64-73, 1996.
62. Karpenyuk T. A., Orazova S. B., Dzhokebaeva S. A., Goncharova A. V., Tzurkan Y. S., Analysis of Microalgae Lipids Isolated from Basin of Kazakhstan, to Assess the Prospects of Practical Use, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 7 (7), 746-748, 2013.
63. Zimmerman J., Jahn R., Gemeinholzer B., Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols, Organisms Diversity&Evolution, 11, 173-192, 2011.
64. Luddington A., Kaczmarek I., Lovejoy, C., Distance and Character-Based Evaluation of the V4Region of the 18S rRNA Gene for the Identification of Diatoms (Bacillariophyceae), Public Library of Science ONE, 7 (9), 1-11, 2012 .
65. Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller, W., A greedy algorithm for aligning DNA sequences, Journal of Computational Biology 7 (1-2), 203-14, 2000.
66. Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T. L., Agarwala R., Schäffer A. A., Database Indexing for Production MegaBLAST Searches, Bioinformatics 24, 1757-1764, 2008.
67. Çinar, S., Denizel Diatom İzolasyonu, Tanımlanması ve Besin Maddelerinin Diatom Büyümesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ, Kasım 2017.
68. Pahl S. L., Lewis D. M., Chen F., King K. D., Growth dynamics and the proximate biochemical composition and fatty acid profile of the heterotrophically grown diatom *Cyclotella cryptica*, Journal of Applied Phycology, 22, 165–171, 2010.
69. Simental-Trinidad J. A., Sanchez-Saavedra M. P., Correa- Reyes J. G., Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture medium agricultural fertilizer, Journal of Shellfish Research, 2, 611-617, 2001.
70. De Angelis R., Melino S., Proposito P., Casaboni M., Lamastra F. R., Nanni F., Bruno L., Congestri R., The diatom *Staurosirella pinnata* for photoactive material production, Public Library of Science ONE, 1-17, 2016.
71. De Stefano, L., Rendina I., De Stefano M., Bismuto A., Maddalena P., Marine diatoms as optical chemical sensors, Applied Physics Letters, 87, 233902-3, 2005.
72. Lambert J. B., Shurvell H. F., Cooks G., Introduction to organic spectroscopy, Macmillan, New York, 174-177, 1987.
73. Zhang J., Ding T., Zhang Z., Xu L., Zhang C., Enhanced adsorption of trivalent arsenic from water by functionalized diatom silica shells, Public Library of Science ONE, 1-18, 2015.
74. Xia S., Gao B., Li A., Xiong J., Ao Z., Zhang, C., Preliminary characterization, antioxidant properties and production of chrysolaminarin from marine diatom *Odontella aurita*, Marine Drugs, 12:4883-4897, 2014.
75. Brown M. R., Dunstan G. A., Norwood S. J., Miller K. A., Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*, Journal of Phycology, 32:64-73, 1996.
76. Coombs J., Halicki P. J., Holm-Hansen O., Volcani B. E., Studies on the biochemistry and fine structure of silicate shell formation in diatoms: II. Changes in concentration of nucleoside triphosphates in silicon-starvation synchrony of *Navicula pelliculosa* (Breb.) Hilse, Experimental Cell Research, 47:315– 28, 1967.
77. Chen Y., Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone *Haliotis diversicolor*, Aquaculture, 263:97-106, 2006.
78. Karpenyuk T. A., Orazova S. B., Dzhokebaeva S. A., Goncharova A. V., Tzurkan Y. S., Analysis of Microalgae Lipids Isolated from Basin of Kazakhstan, to Assess the Prospects of Practical Use, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 7 (7):746-748, 2013.
79. Marella T. K., Parine B. R., Tiwari A., Potential of diatom consortium developed by nutrient enrichment for biodiesel production and simultaneous nutrient removal from waste water, Saudi Journal of Biological Sciences, 25(4):704-709, 2018.
80. Volkman J. K., Jeffrey S. W., Nichols P. D., Rogers G. I., Garland C. D., Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 128:219-240, 1989.
81. Tzurkan Y., Karpenyuk T., Guschina I., Orazova S., Goncharova A., Beisembaeva R., Identification of newly-isolated microorganisms containing valuable

- polyunsaturated fatty acids, *Journal of Biotech Research*, 6:14-20, 2015.
82. Hoffmann L. J., Peeken I., Lochte K., Co-limitation by iron, silicate, and light of three Southern Ocean diatom species, *Biogeosciences Discuss*, 4: 209–247, 2007.
  83. Bowler C., Martino A., Falciatore A., Diatom cell division in an environmental context, *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 623–630, 2010.
  84. Burnett J. H., Baker H. G., Beevers H., Whatley F. R., *The Biology of Diatoms* (Ed. Werner, D.), University of California Press, California, 111,142, 1977.
  85. Turpin V., Robert J., Gouletquer P., Limiting nutrients of oyster pond seawaters in the Marennes-Oléron region for *Haslea ostrearia*: applications to the mass production of the diatom in mesocosm experiments, *Aquatic Living Resources* 12 (5), 335–342, 1999.
  86. Qi-hua W., Ya-juan L., Mei L., Studies on culture conditions of benthic diatoms for feeding abalone III. Effects of iron and silicon nutrients and of orthogonal combinations of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth rate, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 17 (2), 105-111, 1999.
  87. Jorgensen E., Effects of different silicon concentrations on the growth of diatoms, *Physiologia Plantarum*, 5:161-170, 1952.
  88. Stevenson R. J., Hill B. H., Herlihy A. T., Algae-P relationships, thresholds, and frequency distributions guide nutrient criterion development, *Journal of the North American Benthological Society*, 27 (3):783–799, 2008.

