

## Pengaruh Pengurangan Konsentrasi Nutrien Fosfat dan Nitrat Terhadap Kandungan Lipid Total *Nannochloropsis oculata*

Widianingsih<sup>1\*</sup>, Retno Hartati<sup>1</sup>, H. Endrawati<sup>1</sup>, Ervia Yudiati<sup>1</sup>, Valentina R. Iriani<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup>) Jurusan Ilmu Kelautan, FPIK, Universitas Diponegoro Semarang,  
Telp./Fax. 0247474698, e-mail: widia2506@yahoo.com

<sup>2)</sup> Divisi Pembenihan Balai Besar Penelitian Budidaya Laut Lampung.

### Abstrak

Fosfat dan nitrat mempunyai peranan penting dalam pertumbuhan dan kandungan nutrisi *Nannochloropsis oculata*. Kandungan lipid total dalam *Nannochloropsis oculata* sangat dipengaruhi oleh nutrien yang terkandung dalam media kultur. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh perbedaan komposisi nutrien fosfat dan nitrat terhadap kandungan lipid total mikroalga *Nannochloropsis oculata*. Anova satu arah dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan diterapkan pada penelitian ini. Pelakuan perbedaan komposisi fosfat dan nitrat yaitu Kontrol (K, fosfat dalam  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 g dan nitrat dalam  $\text{NaNO}_3$  100 g), fosfat dan nitrat 75 % dari kontrol (A), fosfat dan nitrat 50 % dari kontrol (B), serta fosfat dan nitrat 25 % dari kontrol (C). Pemanenan mikroalga untuk analisa total lipid dilakukan pada fase eksponensial dan stasioner. Duaratus limapuluh milliliter media bersalinitas 35 ‰ digunakan dalam penelitian ini dengan sistem aerasi dan pencahayaan 3000 lux yang kontinyu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perbedaan komposisi nutrien (fosfat dan nitrat) pada media pemeliharaan berpengaruh terhadap kandungan lipid total pada fase stasioner namun tidak pada fase eksponensial. Kandungan total lipid terbesar 67,7 % dw ditemukan pada *N. oculata* yang dikultur pada media dengan fosfat dan nitrat 25 % dari kontrol dan yang terkecil 39,3 %-dw pada *N. oculata* yang dikultur pada nutrien Kontrol. Pembatasan nutrien pada media pemeliharaan dapat meningkatkan kandungan lipid total pada kultur *N. oculata*

**Kata kunci:** *Nannochloropsis oculata*, Total Lipid, fosfat, nitrat

### Abstract

Phosphate and nitrate play important role on growth and nutrition value of *Nannochloropsis oculata*. Total lipid content of microalgae *Nannochloropsis oculata* is influenced by nutrient content in the culture medium. This research was aimed to examine the effect of different depletion phosphate and nitrate composition on the total lipid of *Nannochloropsis oculata*. Anova One Way with 4 treatments and 3 replicates has been applied in this research. The treatment of differences phosphate and Nitrate composition as follows Nutrient control (Conway medium having Phosphate in  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 g and Nitrate in  $\text{NaNO}_3$  100 g), Nutrient A (phosphate and nitrate 75 % nutrient control); Nutrient B (phosphate and nitrate 50 % nutrient control), Nutrient C (phosphate and nitrate 25% nutrient control) The volume of culture medium was 250 mL with salinity 35‰, continuous aeration and illumination 3000 lux. The present work revealed that the nutrient composition on culture medium affected the total lipid content of *N. oculata* at the stationary and but not in exponential phase. The highest total lipid content (67,7%-dw) was found in *N. oculata* cultured in media with the lowest phosphate and nitrate concentration, in the contrary the lowest total lipid content (39,3%-dw) was happened in Control medium. Nutrient limitation in medium culture was able to increase total lipid content in the culture of *N. oculata*.

**Key words:** *Nannochloropsis oculata*; Total Lipid, phosphate, nitrate

### Pendahuluan

*Nannochloropsis oculata* merupakan mikroalga yang termasuk dalam kelas Eustigmatophyceae dengan ukuran 2–5 mikron, memiliki 2 flagella dimana salah satu flagela berambut tipis serta memiliki dinding sel yang

tersusun dari selulosa (Hoek et al., 1995). Media kultur yang baik bagi *Nannochloropsis oculata* bersalinitas 25–35 ppt, suhu 25–30 °C, pH 8-9,5 dengan intensitas cahaya 100–10.000 lux (Vazquez-Duhalt dan Arredondo-Vega, 1991; Robert, 2005)

*Nannochloropsis* sp memiliki kandungan lipid total yang cukup tinggi, yaitu berkisar 31–68 % *dw* (Hu & Gao 2006). Kandungan lipid total yang besar sangat berguna bukan hanya sebagai pakan alami namun sebagai salah satu kandidat sumber bahan biodiesel (Hu dan Gao, 2006; Schenk *et al.*, 2008), sehingga perlu dilakukan penelitian tentang kandungan lipid total pada mikroalga ini.

Mikroalga *Nannochloropsis oculata* merupakan salah satu yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi biodiesel. Keunggulan pengembangan *Nannochloropsis oculata* sebagai sumber biodiesel ini adalah mempunyai kecepatan pertumbuhan yang tinggi sehingga masa panennya cepat (Andersen, 2005; Griffiths dan Harrison, 2009) dibandingkan dengan tanaman perkebunan lainnya seperti sawit dan Jarak, mempunyai kandungan lipid total yang tinggi hingga mencapai 40 %, mikroalga dapat menghasilkan biodiesel sampai 30 kali lipat dibandingkan palm oil, dan biodiesel yang berasal dari mikroalga bersifat ramah lingkungan dan bersifat *biodegradable* (Griffiths dan Harrison. 2009).

Lipid merupakan senyawa organik yang penting bagi tumbuhan (baik mikro maupun makro), hewan dan mikroba. Fungsi lipid adalah sebagai sumber energi metabolik dan asam lemak esensial yang berperan dalam struktur seluler, pemeliharaan dan integritas biomembran. Lemak juga merupakan sumber, fosfolipid dan vitamin yang larut dalam lemak (Volkman, 2003; Nur dan Arifin, 2004). Disamping itu lemak juga merupakan sumber energi yang lebih efektif dibandingkan karbohidrat dan protein. Winarno (1991) mengatakan bahwa 1 gram lemak dapat menghasilkan 9 kkal, dan karbohidrat dan protein menghasilkan 4 kkal.

Pemberian tekanan terhadap lingkungan yang meliputi salinitas, suhu, fotoperiod, intensitas cahaya dan nutrisi dapat mempengaruhi kandungan lipid total pada mikroalga (Qin, 2005). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh komposisi nutrisi fosfat dan nitrat pada media kultur terhadap kandungan lipid total *Nannochloropsis oculata*.

## Materi dan Metode

Mikroalga *Nannochloropsis oculata* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari kultur murni Balai Besar Penelitian Budidaya Laut Lampung dan telah dikembangkan di Laboratorium mikroalga Marine Field Station Teluk Awur, Jepara. Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli-Agustus 2010. Mikroalga dikultur dalam elemenyer dengan volume

250 mL media dengan kepadatan awal  $5 \times 10^6$  sel/mL, kadar salinitas 30-35‰, suhu ruangan 25–30 °C, pencahayaan 3000 lux, pH 7–8, sistem aerasi penuh. Pada penelitian ini digunakan media Conway yang mengandung EDTA 45 g, FeCl<sub>3</sub> 1,3 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 33,6 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 g, MnCl<sub>2</sub> 0,5 g, NaNO<sub>3</sub> 100 g, trace metal solution 1ml, vitamin 1 ml dan *Aquadest* 1 liter.

Rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan diterapkan pada penelitian ini dengan perlakuan perbedaan komposisi fosfat dan nitrat, yaitu Nutrien Kontrol (merupakan nutrisi dengan media Conway, fosfat dalam NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 g dan nitrat dalam NaNO<sub>3</sub> 100 g); Nutrient A (fosfat dan nitrat 75 % dari nutrisi kontrol); Nutrient B (fosfat dan nitrat 50 % dari nutrisi kontrol); dan Nutrient C ( fosfat dan nitrat 25 % dari nutrisi kontrol. Setiap hari dilakukan pemantauan terhadap kepadatan *N. Oculata* untuk melihat perkembangan pertumbuhannya. Pemanenan mikroalga untuk analisa lipid total dilakukan pada fase eksponensial dan stasioner. Analisa Lipid total pada mikroalga dilakukan dengan metode Bethien-Diemar (1963) dalam Hermawan (2004) dengan menggunakan pelarut non-polar petroleum ether.

Perhitungan prosentase berat kering total lipid sebagai berikut:

$$\% \text{ Total lipid} = \frac{(A - B)}{C} \times 100$$

Keterangan;

A = Berat labu + berat lipid setelah dilakukan ekstrasi (mg)

B = Berat labu sebelum dilakukan ekstrasi (mg)

C = Berat kering sampel.

## Hasil dan Pembahasan

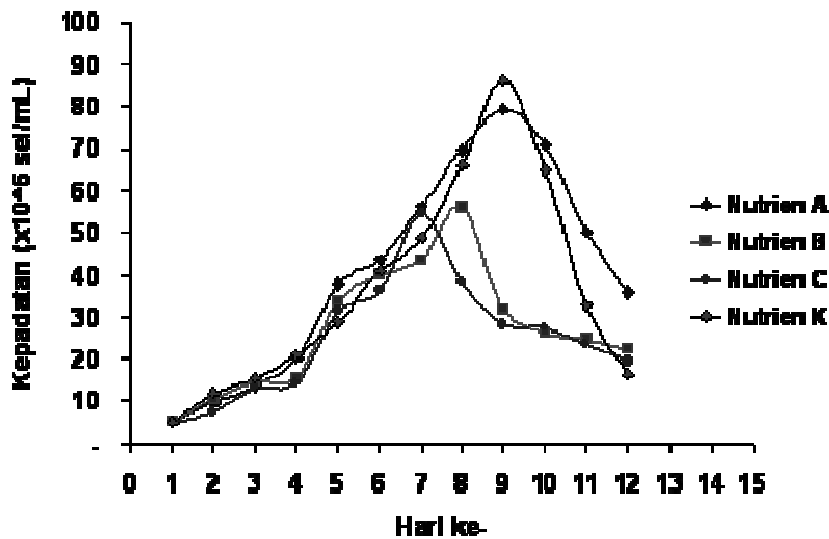
Nutrien pada media pemeliharaan merupakan komponen yang paling penting dalam pertumbuhan mikroalga. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perubahan pengurangan prosentase nutrisi fosfat dan nitrat berpengaruh terhadap proses fisiologi mikroalga dan berdampak pada pertumbuhan *N. Oculata* (Gambar 1). Pada perlakuan kontrol (K), nutrisi yang diberikan sesuai dengan formula Conway dan menghasilkan nilai kepadatan yang paling tinggi ( $86 \times 10^6$  sel/mL). Sedangkan nilai kepadatan *N. oculata* yang terendah ( $54 \times 10^6$  sel/mL) terdapat pada media pemeliharaan dengan komposisi nutrisi fosfat dan nitrat 25 % dari nutrisi kontrol (C). Nilai kepadatan puncak hasil penelitian ini lebih tinggi dari hasil penelitian Renaud *et al.* (1991) yaitu  $49-59 \times 10^6$

sel/mL. Ketersediaan nutrisi yang cukup akan menghasilkan pertumbuhan dan nilai kepadatan yang tinggi (Shiharan *et al.*, 1990; Hu dan Gao, 2006).

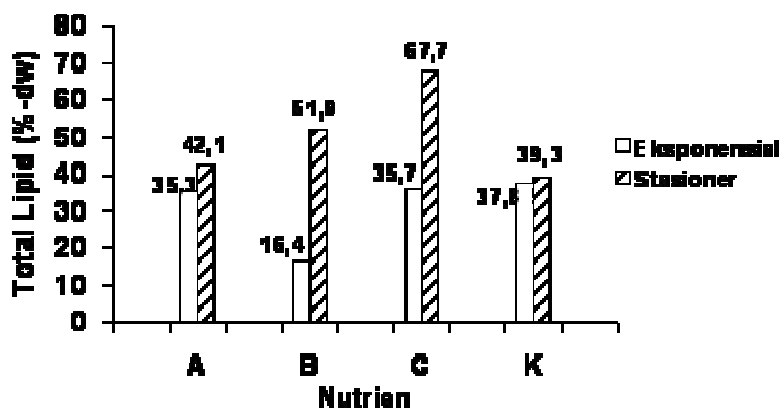
Berdasarkan pengamatan, kadar lipid total terbesar ditemukan pada *N. oculata* yang dikultur pada media dengan komposisi fosfat dan nitrat 25 % dari nutrisi kontrol yaitu sebesar 67,7 % dw (Gambar 2), artinya penurunan fosfat dan nitrat sebesar 75 % mampu meningkatkan kadar lipid total pada *N. oculata*. Semakin kecil komposisi prosentase nitrat dan fosfat yang diberikan pada media kultur maka semakin besar kandungan total lipidnya. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Hu dan Gao (2006) yang mengatakan bahwa semakin rendah konsentrasi nitrat yang berasal dari  $\text{NaNO}_3$  dan fosfat dari  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  maka kandungan lipid total pada *Nannochloropsis sp.* semakin besar dan dapat mencapai  $62 \pm 2,8$  % dw. Gouveia dan Oliveira (2009) mendapatkan bahwa *Nannochloropsis sp* yang dikultur pada media dengan nutrisi (nitrat) tercukupi mempunyai kandungan lipid total dengan nilai kisaran 28,7–29% dw. Griffiths dan Harrison (2009) mengatakan bahwa pada kondisi media dengan nutrisi N tercukupi, *Nannochloropsis sp* memiliki kandungan lipid total berkisar 27-31 % dw dan sebaliknya pada kondisi keterbatasan nutrisi N *Nannochloropsis sp* menghasilkan kandungan lipid total sebesar 35-46 % dw (Griffiths dan Harrison, 2009). Peningkatan  $\text{NaNO}_3$  dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pada media kultur akan meningkatkan kandungan protein dan polyunsaturated fatty acids (PUFAs) *Nannochloropsis*, tetapi akan menurunkan kandungan karbohidrat, lipid total dan Total Fatty Acids (Hu dan Gao, 2006).

Hasil analisa anova satu arah menunjukkan adanya pengaruh pengurangan nutrisi terhadap kadar lipid total *N. oculata* pada fase stasioner ( $P < 0,01$ ), namun tidak berpengaruh ( $P > 0,05$ ) pada eksponensial. Tidak terdapatnya pengaruh pengurangan komposisi nutrisi pada fase eksponensial karena pada fase ini kebutuhan nutrisi masih tercukupi sehingga mikroalga mengalami pertumbuhan yang cepat dan optimum (Cotteau, 1996).

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa pada fase stasioner *N. oculata* memiliki kadar lipid total yang lebih besar dibandingkan pada fase eksponensial (Gambar 2). Hal ini karena pada fase stasioner telah terjadi penurunan pembelahan sel secara bertahap dan sel mulai menyimpan produknya dalam bentuk lipid (Guzman *et al.*, 2010). Besarnya kandungan lipid total pada mikroalga *N. oculata* pada fase stasioner dibandingkan dengan fase eksponensial juga telah ditunjukkan oleh hasil penelitian Pratoomyot *et al.*, (2005) begitu pula pada spesies *Tetraselmis suecica* (Guzman *et al.*, 2010). Semakin menurunnya jumlah nutrisi pada fase stasioner mengakibatkan terjadinya penurunan pembelahan sel pada mikroalga kelas Eustigmatophyceae dan Bacillariophyceae (Pratoomyot *et al.*, 2005) secara bertahap dan mulai menyimpan produknya dalam bentuk lipid. Nilai lipid total pada penelitian ini lebih tinggi daripada hasil pengamatan Griffiths dan Harrison (2009) dan Converti *et al.*, (2009). Pada media kultur dengan konsentrasi nitrogen yang mencapai 75% dari media kultur F/2 menunjukkan adanya kenaikan lipid total *N. oculata* dari 7,9 % dw menjadi 15,31 % dw dengan kondisi pemeliharaan yang optimum (Converti *et al.*, 2009)



Gambar 1. Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* pada media pemeliharaan dengan komposisi pupuk yang berbeda. K adalah Nutrien kontrol (nutrien dengan media Conway); Nutrien A (fosfat dan nitrat 75 % dari kontrol); Nutrien B (fosfat dan nitrat 50 % dari kontrol); Nutrien C (fosfat dan nitrat 25 % kontrol).



Gambar 2. Kadar rata-rata Total lipid (%-dw) *Nannochloropsis oculata* pada media dengan Nutrien yang berbeda. K adalah Nutrien kontrol (merupakan nutrien dengan media Conway); Nutrien A (fosfat dan nitrat 75 dari kontrol); Nutrien B (fosfat dan nitrat 50 % kontrol); Nutrien C (fosfat dan nitrat 25 % kontrol).

hasil penelitian Griffiths dan Harrison (2009) menunjukkan bahwa pada kondisi keterbatasan nutrien, kandungan total lipid *Nannochloropsis* sp memiliki kisaran 35–46 % dw.

Perubahan kadar nutrien mempunyai pengaruh berbeda terhadap produktivitas biomas dan kadar lipid total *N. oculata*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa besarnya kepadatan sel mikroalga pada kontrol dan perlakuan nutrien A (fosfat dan nitrat 75 % dari nutrien kontrol), nutrien B (fosfat dan nitrat 50 % dari nutrien kontrol), serta nutrien C (fosfat dan nitrat 25 % dari nutrien kontrol) tidak diikuti oleh besarnya nilai kepadatan sel mikroalga. Pada penelitian Rodolfi et al. (2009) yang menggunakan media pemeliharaan dengan unsur N 10 % dan P 1 % dari nutrien kontrol (media f/2) mengakibatkan terjadinya peningkatan kandungan lipid total *N. oculata* sebesar 60%-dw dan penurunan produktivitas biomassa sebesar 15%. Pada penelitian ini dan beberapa penelitian, seperti Converte et al. (2009), Hu dan Gao (2006), Griffiths dan Harrison (2009) dan Rodolfi et al. (2009) menunjukkan bahwa mikroalga dari kelas Eustigmatophyceae menunjukkan respon pengurangan fosfat dan nitrat dari media dengan meningkatkan kandungan lipid dan menurunkan produktivitas biomassa. Selanjutnya pembatasan nutrien akan memberikan pengaruh terhadap peningkatan kandungan lipid total serta mengurangi pembentukan sintesa n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) pada mikroalga (Reitan et al., 2002; Hu dan Gao, 2006).

Prinsipnya nutrien merupakan sumber nitrogen dan fosfor yang memiliki peranan dalam mempengaruhi produktivitas lipid. Hal ini diduga ada kaitannya dengan proses biosintesa lipid seperti yang terjadi dalam sel *Chaetoceros gracilis* (Hu et al., 2008) dan dalam *Cyclotella cryptica* (Brown et al.,

menentukan dalam proses biosintesis lipid dalam sel mikroalga (Schenk et al., 2008). Biosintesis lipid pada mikroalga membutuhkan acetyl-CoA sebagai titik awal pembentukan lipid. Acetyl CoA carboxylase dan beberapa enzim sarana atau jalan biosintesis lipid telah digunakan sebagai target dalam peningkatan produksi lipid Schenk et al., (2008). Keterbatasan nutrien (nitrat dan fosfat) dalam media pemeliharaan kultur mikroalga akan meningkatkan aktivitas kerja dari enzim ACCase yang merupakan prekursor bagi pembentukan lipid pada mikroalga. Namun demikian masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang faktor-faktor lingkungan (salinitas, fotoperiod, intensitas cahaya, suhu dan CO<sub>2</sub>) yang mempengaruhi mekanisme kerja enzim Co-ACCase dalam mikroalga *Nannochloropsis oculata*.

### Kesimpulan

Perbedaan komposisi nutrien (fosfat dan nitrat) pada media kultur memberikan pengaruh yang nyata terhadap kandungan total lipid *Nannochloropsis oculata* pada fase stasioner, namun tidak pada fase eksponensial. Kandungan total lipid terbesar ditemukan pada *N. oculata* yang dikultur pada media dengan nutrien fosfat dan nitrat 25 % dari nutrien kontrol (perlakuan C) yaitu sebesar 67,7% dw. Komposisi nitrat dan fosfat dalam media kultur sangat mempengaruhi kandungan lipid total pada *Nannochloropsis oculata*. Keterbatasan kandungan nutrien fosfat dan nitrat menyebabkan tingginya kandungan total lipid *N. oculata*.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ditjen Dikti (melalui LPPM Undip) yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Kompetensi Batch 2

(Nomor: 234/SP2H/PP/DP2M/III/2010, tanggal 01 Maret 2010). Terima kasih juga disampaikan kepada Pengelola Field Station Marine Sciences, Jurusan Ilmu Kelautan UNIDIP, Jepara atas peminjaman sarana laboratorium serta Prof. Dr. Ir. M. Zainuri, DEA atas review dan sarannya demi perbaikan artikel ini.

## Daftar Pustaka

- Andersen R.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. UK. 578 pp.
- Brown, L.M., S. Sprague, E.E. Jarvis, T.G. Dunahay, P.G. Roessler & K.G. Zeiler. 1994. Biodiesel from aquatic species. Project Report: FY 1993 NREL/TP-422-5726. Nat.Renew Energy Lab-US Dept. of Energy pp: 10-14.
- Converti A., AA. Cassazza, E.Y.Ortiz, P. Perego & M.D. Borghi. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing Process Intensification*, 48(6): 1146-1151.
- Cotteau, P. 1996. Microalgae. In: Lavens, P & P. Sorgeloos (Eds.). *Manual on Production and Use of Live Food for Aquaculture*, FAO. Fisheries Technical Paper Edition. Rome, Italia pp: 8-87.
- Griffiths, M.J. & S.T.L. Harrison. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.*, 21: 493-507.
- Gouveia, L & A.N. Oliveira. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 269-274.
- Guzman, H.M., A de la Jara Valido, L.C. Duarte & K. F. Presmanes. 2010. Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. *Aquacult, Int.*, 18: 189-199.
- Hermawan, A. 2004. The Protein, Lipid, and Fatty Acids Content of *Tetraselmis* sp. With Various Culture Media. Thesis., Kasetsart University. Thailand. 71 p.
- Hoek, C.V.D., D.G. Mann & H.M. Jahns. 1995. *Algae, an introduction to phycology*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Hu, Q., M. Sommerfield, E. Jarvis., M. Posewitz, M Seibert & A. Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54: 621-639.
- Hu, H & K. Gao. 2006. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO2 concentration. *Biotechnol. Lett.*, 28: 987-992.
- Nur A., & Z. Arifin. 2004. Nutrisi dan formulasi pakan ikan. Departemen Kelautan dan Perikanan, Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau, Jepara
- Pratoomyot, J., P. Srivilas & T. Noiraksar. 2005. Fatty Acids Composition of 10 Microalgal Species. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 27(6): 1179-1187.
- Qin, J.G. 2005. Bio\_Hydrocarbon from algae: Impacts of temperature. Light and salinity on algae growth. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. RIRDC Publication No, 05/025.
- Reitan, K.I, J.R. Rainuzzo & Y. Olsen. 2002. Effect of Nutrient Limitation On Fatty Acid and Lipid Content of Marine Microalgae. *J. Phycology*, 30(6): 972-979.
- Renaud, S.M, D.L. Parryla, Luong-Van, Thinh , C. Kuo , A. Padovanla & N. Sammy. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. Applied Phycology*, 3: 43-53.
- Robert. A.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press USA pp. 25-26.
- Rodolfi L., G.C. Zittelli, N. Bassi., G. Padovani., N. Biondi., G. Bonini & M.R. Tredici. 2009. Microalga for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1):100-112.
- Schenk, PM., S.R. Thomas-Hall, E. Stephen, U.C. Marx, J.H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse & B. Hankamer. 2008. Second Generation Biofuel: High-Efficiency Microalgae for Biofuel Production.

- Sriharan, S., D. Bagga & T.P. Sriharan. 1990. Effects of Nutrients and Temperature on Lipid and Fatty Acids Production in the Diatom *Hantzshia* DI-60. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24(25): 309-316.
- Winarno, F.G. 1991. *Kimia Pangan dan Gizi* PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Vazquez-Duhalt, R. & B.Q. Arredondo-Vega. 1991. Oil production from microalgae under saline stress. *Biomass for energy and industry 5<sup>th</sup> E.C. conference. Policy, Environment, Production and Harvesting*, 1: 547-551.
- Volkman, J.K. 2003. Sterols in Microorganisms. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 60: 495-506.