Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 40 No.1 (2024): 80 -87

مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 40- عدد 2 (2024): 80-87

عزل طحلب *Haematococcus pluvialis* وتنقيته وإكثاره في المختبر باستعمال المفاعل الحيوي وتحديد أطوار نموه

عبير علي ديوب [1] أ.د عدنان أحمد علي نظام [2] د. حسام مصطفى عكو [3]

1- طالبة دكتوراه، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق.
abeer84.dayoub@damascusuniversity.edu.sy

2- أستاذ، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق.
a.nizam@damascusuniversity.edu.sy

3- باحث، قسم التنوع الحيوي، الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق.
hussam77.okkou@damascusuniversity.edu.sy

الملخص

جمعت عينات الطحالب من تجمع للمياه الراكدة على نهر بردى في منطقة الربوة في مدينة دمشق. عُزل طحلب *Haematococcus pluvialis*، ونُقي ضمن المختبر في شروط عقيمة. ثم نُميّ في الوسط المغذي BBM داخل المفاعل الحيوي photobioreactor بطريقة الدفعات، للحصول

على كتلة حيوية مناسبة، وحُددت شروط الاستزراع (درجة حرارة 25مْ، شدة إضاءة 10000 لوكس، بنظام ضوء12/12ظلام، وتهوية مستمرة 2 لتر/دقيقة، pH 5.5–6.5 مدة 18 يوماً، حُددت أطوار النمو ومعدل النمو للطحالب من قيم الامتصاصية الضوئية اليومية، عند طول الموجة 680 نانومتراً، إذ كانت بداية الطور اللوغاريتمي في اليوم الخامس ونهايته في اليوم الثاني عشر.

الكلمات المفتاحية: *Haematococcus pluvialis*، المفاعل الحيوي، الكتلة الحيوية، أطوار النمو.

تاريخ الإيداع: 2022/08/21
تاريخ الموافقة: 2022/11/16

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

Isolation, purification and in vitro multiplication of *Haematococcus pluvialis* using a photobioreactor and determination of its growth phases

Abeer dayoub[1] Adnan Ahmad Ali nizam[2] Hussaam Mostafa Okkou[3]

1-Postgraduate Student, Plant Biology Department, Faculty of Science, Damascus University. abeer84.dayoub@damascusuniversity.edu.sy
2-Professor, Plant Biology Department, Faculty of Science, Damascus University.
a.nizam@damascusuniversity.edu.sy
3- Research, department of biodiversity, NCBT, Damascus, Syria
hussam77.okkou@damascusuniversity.edu.sy

Abstract

Algae samples were collected from a pool of stagnant water belonging to Barada River in Al-Rabwa area in Damascus city. *Haematococcus pluvialis* was isolated and purified in vitro under sterile conditions. This alga was then grown in BBM in the photobioreactor in batches, to obtain a suitable biomass, and the culture conditions were determined (temperature 25°C, illumination intensity 10,000 lux, 12light/12dark system, continuous aeration 2 L/min, pH 5.5 - 6.5 for 18 days, the growth phases and growth rate of this alga were determined from the daily optical absorbance values, at wavelength 680 nm, as the logarithmic phase started on the fifth day and its end on the twelfth day.

Received :2022/08/21
Accepted:2022/11/16

Copyright:Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Keywords*:* *Haematococcus pluvialis*, Photobioreactor, Biomass, Growth phases.

مقدمة

تتّصف الطحالب الدقيقة بأنها أحياء مفردة الخلية ذاتية التغذية الضوئية، يتراوح حجمها من بضعة ميكرونات إلى مئات الميكرونات، تنمو في بيئات متنوعة، إذ تنتشر أنواعها في المياه العذبة والمالحة، وتشغل أقاليم واسعة على سطح الكرة الأرضية من المناطق الباردة جداً في القطب الجنوبي إلى المناطق الحارة جداً في الصحارى (Shetty *et al*., 2019)، تعد الطحالب الدقيقة أكثر كفاءة من النباتات الأرضية في تحويل الطاقة الشمسية إلى طاقة كيميائية، بسبب تركيبها الخلوي البسيط، وغناها بالدهون ومعدل التكاثر السريع، إضافة إلى مقدرة بعض أنواع الطحالب الدقيقة على النمو في المياه المالحة وتحمل الشروط البيئية القاسية الأخرى (Singh *et al*., 2021; Ronga *et al*., 2019).

كان الصينيون أول من استعمل الطحالب الدقيقة منذ نحو 2000 عام، فلقد اعتمدوا على الجراثيم الزرقاء مثل النوستوك *Nostoc* للبقاء على قيد الحياة في أثناء المجاعة، ومع ذلك لم تبدأ التقانات الحيوية للطحالب الدقيقة في التطور إلا في منتصف القرن العشرين (Priyadarshani and Rath, 2012). إذ ازدادت الأبحاث القائمة على الطحالب الدقيقة على مر العقود بسبب سرعة نموها واحتوائها على العديد من المركبات الكيميائية الحيوية، فهي مصانع خلوية حقيقية للمركبات العضوية، مثل: البروتينات والليبيدات والكربوهيدرات والكاروتينويدات والفيتامينات، التي يمكن تسخيرها للاستعمال التجاري مثل تعزيز القيمة الغذائية للأغذية (مكملات غذائية)، والأعلاف الحيوانية، ومستحضرات التجميل كعامل مرطب، ومضاد للتأكسد وللحماية من الأشعة فوق البنفسجية ومكافحة الشيخوخة، وإنتاج الطاقة بسبب تركيبها الكيميائي، وتستعمل في مزارع الأحياء المائية والدواجن والصناعات الدوائية ومعالجة السرطان (Bhalamurugan *et al*., 2018).

طحلب *Haematococcus pluvialis* هدف البحث من الطحالب الدقيقة الخضراء، يعيش في المياه العذبة، وينتشر في مناطق مختلفة من العالم ذات درجة الحرارة المعتدلة، ويمكن أن يوجد في شروط بيئية ومناخية مختلفة، لأنه قادر على تحمل التقلبات السريعة والمتطرفة في درجة الحرارة وشدة الإضاءة وتركيز الأملاح التي تكون ضارة بالكثير من الطحالب الدقيقة الأخرى، ولمقدرته السريعة على التحوصل (Buchheim *et al*., 2013).

وصف جيرو–شانترانس Girod-Chantrans جنس *Haematococcus* أول مرة في عام 1797، وصنّف فلوتو Flotow النوع *Haematococcus pluvialis* في عام 1844، من فصيلة Haematococcaceae ورتبة Volvocales، وأضاف إليوت Elliot في عام 1934 تفاصيل عن الشكل والمظهر لهذا الجنس، إذ أشار إلى أن دورة حياة هذا الطحلب تتضمن 4 مراحل مميزة شكلياً: المرحلة الخضراء haematocysts (aplanospores) – microzooids-macrozooids-palmella، وهي عملياً ثلاث مراحل، أما المرحلة الأخيرة فتسمى بالمرحلة الحمراء (الشكل 4)، Microzooids هي خلايا متحركة بسرعة وصغيرة الحجم (< 10 µm)، وMacrozooids (zoospores) هي خلايا كروية، بيضوية، أو لها شكل إجاصي (طولها 8–20 µm)، لها سوطان متساويان في الطول في النهاية الأمامية، وصانعة لها شكل الفنجان مع عدد كبير من جُسيمات البيرنويدات المبعثرة، تحاط الخلايا من الخارج بمادة هلامية لها سماكة متغيرة. ويتوزع عدد كبير من الفجوات الانقباضية على نحو غير منتظم قرب سطح بروتوبلاسما الخلية، تنمو هذه الخلايا الخضرية بسرعة وتسود في ظل الشروط المناسبة، يمكن أن تنقسم انقساماً خيطياً وتعطي 2–32 خلية من الخلايا الفتية (Wayama *et al*., 2013)، وفي ظل الشروط البيئية غير المناسبة تبدأ خلايا Macrozooids بفقدان السياط ويتمدد حجم الخلايا، وتشكل بنية متعددة الطبقات وتصبح خلايا خضرية غير متحركة palmella (Hagen *et al*., 2002)، ومع استمرار الشروط البيئية السيئة مثل نقص المغذيات، والإشعاع الضوئي القوي، والملوحة الزائدة، يتوقف انقسام الخلايا وتتحول إلى أبواغ aplanospores، التي تعود وتعطي خلايا جديدة متحركة عند عودة الشروط المناسبة، وتبدأ دورة حياة جديدة. يُعرف هذا الطحلب بأنه أغنى مصدر طبيعي لصبغة الأستازنتين إذ تصل كميته إلى 4% من الوزن الجاف للخلية (Wayama *et al*., 2013).

أهمية البحث وأهدافه

يُعد هذا البحث من جملة الأبحاث الحديثة القليلة الناشئة في سورية، إذ إن الطحالب الدقيقة تستأثر بأهمية بيئية واقتصادية كبيرة لجميع الأحياء بما فيها الإنسان؛ ولذلك فإن عزل هذا الطحلب مسألة جديرة بالاهتمام، إضافة إلى تحديد الشروط الأنسب لاستزراعه في المختبر، وتحديد أطوار نموه ومعدل نموه، فتحديد أطوار النمو أمر مهم لمعرفة أفضل وقت لحصاد المزرعة الطحلبية، والبحث عن النمو الأمثل لإنتاج مستقلب معين له قيمة اقتصادية.

التحليل الإحصائي

أُجري تحليل النتائج باستعمال برنامج Microsoft Excel 2010 وبرنامج SPSS Statistics17 من خلال طريقة One-Way ANOVA متبوعة باختبار Tukey للمقارنة بين المتوسطات عند مستوى ثقة 95%.

طرائق البحث

عزل الطحالب الدقيقة وتنقيتها Isolation and Purification of Microalgae

جُمعت عينات الطحالب في شهر آذار من مياه راكدة على مجرى نهر بردى في منطقة الربوة بدمشق، ونقلت بعد الجمع إلى المختبر مباشرة، وفُحصت مجهرياً (بالتكبير x40 – x60) بهدف تحديد أجناس الطحالب وأنواعها الموجودة في المياه من أجل عزل طحلب *Haematococcus*. أمكن بعد الفحص المجهري وتعرف صفات الجنس، اعتماداً على المعايير المورفولوجية المرجعية (Elliot, 1934, Ettl, 1983)، عزل طحلب *Haematococcus*، وأُجريت جميع مراحل العزل في شروط عقيمة (Andersen, 2005)، وكان عزل طحلب *Haematococcus* عن الطحالب الدقيقة الأخرى على الوسط المغذي الصلب Bold's Basal Medium BBM المحضر والمصلّب بالآغار. خُففت العينة الأساسية بالسائل المغذي المعقم (نُقل ملء عقدة إبرة الزرع من العينة الأساسية إلى أنبوب يحوي 5مل سائل مغذٍ معقم) وزرع منها 0.5 مل في طبق بتري يحتوي وسط مغذٍ مصلّب بالآغار. حُضنت الأطباق المزروعة في حاضنة خاصة بتنمية الطحالب ضمن المختبر في الشروط المناسبة (درجة حرارة28مْ، شدة ضوئية3000 لوكس)، وتُركت مدة 7–20 يوماً، حتى بداية ظهور المستعمرات.

نُقل بإبرة زرع معقمة باللهب جزء من المستعمرات النامية المعزولة عن غيرها (فرادى) في الطبق الأساسي إلى طبق جديد، وفُرشت بالإبرة المعقمة بالتخطيط على كامل سطح الطبق، وحُضنت في الشروط السابقة نفسها مدة 15 يوماً، وأُعيد الطبق الأساسي إلى الحاضنة لاحتمال ظهور الأنواع بطيئة النمو بعد فترة. نُقل برأس الإبرة كمية قليلة من المستعمرات النامية إلى شرائح زجاجية، وفُحصت تحت المجهر وأمكن التأكد من الأنواع، ففي حال كان النوع المطلوب موجوداً كانت تُنقل المستعمرة إلى طبق يحتوي على الوسط المغذي الجديد وتُزرع على كامل الطبق. كُررت عملية النقل إلى أوساط جديدة بهدف الحصول على نوع نقي ومعزول عن باقي الأنواع الطحلبية الدقيقة الأخرى.

نُقلت المستعمرات المعزولة النقية من طحلب *Haematococcus* في المرحلة الأخيرة من الوسط الصلب إلى الوسط السائل المعقم BBM(حوجلات سعتها 250 مل) بهدف الإكثار وحُضنت في الشروط السابقة نفسها بوجود التهوية، واستعملت كلقاح لتنميتها ضمن المفاعل الحيوي للحصول على كمية أكبر من الكتلة الحيوية.

تنمية طحلب *Haematococus* ضمن المفاعل الحيوي

أُجريت تنمية الطحلب وإكثاره في الوسط المغذي Bold's Basal Medium BBM (ابتكره Bischoff and Bold, 1963) وأُضيف إليه محلول التربة 1مل/لتر، بطريقة الدفعات ضمن المفاعل الحيوي الضوئي Photobioreactor ، الذي يتحكم في جميع شروط النمو ويضبطها، صُمم هذا المفاعل وصُنع في الهيئة العامة للتقانة الحيوية بالاستعانة بالنموذج ABioflo 3000 fermentor (Eppendorf) الذي استعمله أيضاً الباحثSacasa-Castellanos (2013) بطريقة مشابهة لهذه الدراسة في تنمية الطحالب الخضراء الدقيقة ودراسة العوامل المؤثرة في نموها.(الشكل 1)، وتبلغ سعته النظرية 14 لتراً، ، تمت التنمية في شروط ثابتة

(درجة حرارة 25 مْ وشدة إضاءة 10000لوكس بنظام 12 ضوء: 12ظلام ساعة، pH 5.5-6.5، سرعة دوران 150- 200 دورة/د، تدفق غازات 2 لتر/د) بمدة زمنية 18 يوماً للدفعة الواحدة، وبواقع 3 مكررات، وحُددت أطوار النمو اعتماداً على رسم المنحنى البياني الممثل للعلاقة بين لوغاريتم الامتصاصية الضوئية عند طول الموجة 680 نانومتراً لمزرعة الطحلب مع الزمن، فقد أُخذت عينة يومية من المفاعل الحيوي وقُيست الامتصاصية الضوئية للعينة باستعمال المطيافية الضوئية Spectrophotometer عند طول الموجة 680 نانومتراً. وحُسب معدل النمو الذي يعرف بأنه عدد مرات تضاعف الكتلة الحيوية في اليوم الواحد خلال طور النمو اللوغاريتمي من المعادلة التالية (Guillard and Ryther,1962):

$$GR = \{(\ln(OD680)t - \ln(OD680)t0\}/ t - t0$$

حيث إن: GR: معدل النمو اليومي (OD680)t0 الامتصاصية الضوئية في بداية الطور اللوغاريتمي

t_0: اليوم الأول في الطور اللوغاريتمي

(OD680)t: الامتصاصية الضوئية في نهاية الطور اللوغاريتمي t: اليوم الأخير في الطور اللوغاريتمي

مكان تنفيذ البحث

أُجري هذا البحث في مختبرات الدراسات العليا في قسم علم الحياة النباتية من كلية العلوم بجامعة دمشق، وفي مختبرات الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق.

الشكل 1: المفاعل الحيوي وتنمية طحالب *Haematococcus* الخضراء.

النتائج والمناقشة

التركيب النوعي للطحالب في العينات المدروسة

أُجري تعريف أجناس الطحالب الموجودة في العينات المدروسة باستعمال المجهر الضوئي، إذ تبين وجود العديد من أجناس الطحالب التي تنتمي إلى شعب مختلفة (الطحالب الخضراء، المشطورات، الجراثيم الزرقاء). وقد صنفت هذه الأجناس بالاعتماد على الصفات الشكلية للخلايا والمستعمرات والخيوط والصانعات (الجدول1).

الجدول 1. أجناس الطحالب الموجودة في العينات.

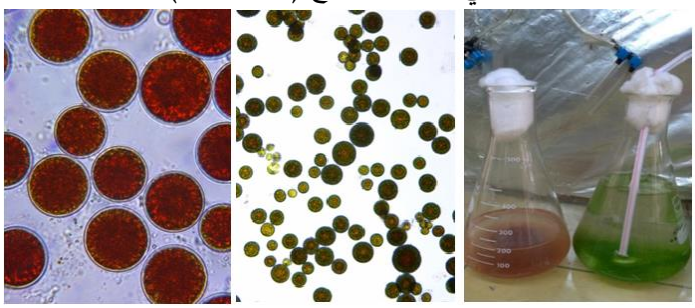
الطحالب الخضراء Chlorophyta	المشطورات Bacillariophyta	الجراثيم الزرقاء Cyanobacteria
Chlorella	*Pinularia*	*Oscillatoria*
Closterium	*Navicula*	*Phormidium*
Cosmarium	*Cymbella*	
Haematococcus	*Tabellaria*	
Chlorococcum		
Scenedesmus مستعمرة		
*Pediastrum*مستعمرة		

أمكن العزل بطريقة التخطيط على الآغار الحصول على خلايا مفردة نقية تعود لنوع الطحلب المطلوب *Haematococcus pluvialis*، وتم تصنيفه بالاعتماد على على المعايير المورفولوجية المرجعية (Droop, 1956 ; Ettl, 1983; Buchheim *et al*., 2013). ظهر

هذا النوع تحت المجهر على هيئة خلايا بيضوية أو كروية، بلون أخضر ويتخلله لون أحمر في منتصفه وتحتوي عدد كبير من البيرنويدات المبعثرة، ويحيط بهذه الخلايا من الخارج جدار خلوي سميك، (الشكل 2).

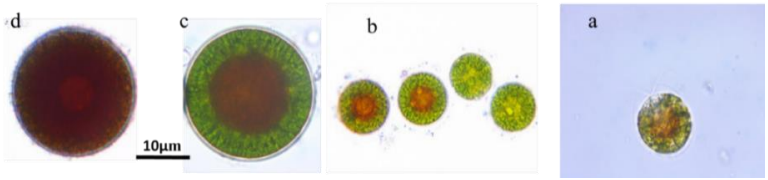
الشكل 2: النوع *Haematococcus pluvialis* قبل العزل، تحت المجهر الضوئي ×40

جرى التأكّد من نقاوة الطحلب *Haematococcus pluvialis* بعد تنقيته قبل عملية الاستزراع وبعدها، إذ تُركت عينة خضراء من هذا الطحلب بدون تهوية وفي درجة حرارة الغرفة مدة 15 يوماً، فتحوّلت خلايا الطحلب الخضراء المتحركة إلى خلايا حمراء غير متحركة تحتوي صبغة الأستازنتين Astaxanthin الحمراء التي تميز هذا النوع (الشكل3، 4).



b a

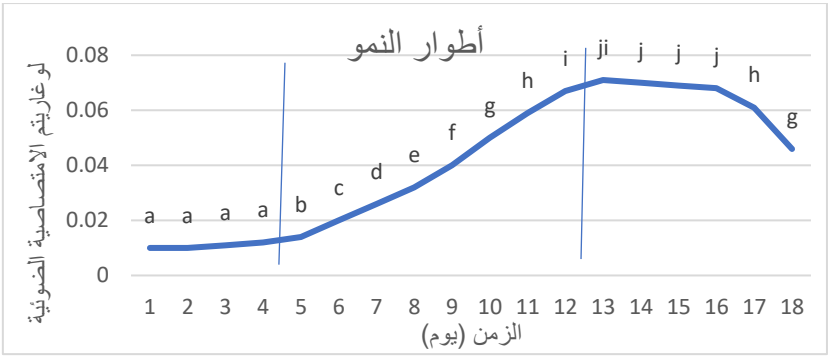
الشكل 3: طحلب *Haematococcus pluvialis* بالمرحلة الخضراءبتكبير×10(a) والمرحلة الحمراءبتكبير×40(b) بعد العزل.



الشكل 4: المراحل الشكلية الأربع لعينة معزولة من طحلب *Haematococcus pluvialis* (a, b, c, d).

بلغ معدل نمو طحلب *Haematococcus pluvialis* في المرحلة الخضراء (شروط مثلى للنمو) 0.22 يوم$^{-1}$، وبذلك تفوق على معدل النمو للنوع نفسه في دراسة أجراها Wang وآخرون (2013) بشروط (شدة الضوء 1500لوكس، ووسط مغذٍ تجاري) إذ بلغ معدل النمو 0.16 يوم $^{-1}$، وتوافقت هذه النتيجة نسبياً مع نتيجة دراسة أجرتهاImamoglu وآخرون (2007) على هذا النوع بشروط (شدة الضوء 3000 لوكس، ووسط مغذRudic's (RM)medium)، إذ بلغ معدل النمو 0.195 يوم $^{-1}$، ويُعزى ذلك إلى اختلاف شروط النمو بين التجارب، إذ إن شدة الضوء وتوفر النتروجين في وسط الاستزراع من أهم العوامل المؤثرة في نمو *Haematococcus pluvialis* ودعم إنتاجية أكبر للخلايا (Orosa *et al.*, 2005).

وأمكن تحديد أطوار النمو لطحلب *Haematococcus pluvialis* من المنحنى البياني الذي يمثل العلاقة بين لوغاريتم الامتصاصية الضوئية عند طول الموجة 680 نانومتراً والزمن (الشكل 5).



الشكل 5: أطوار نمو طحلب *Haematococcus pluvialis*: الأحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فرق معنوي عند مستوى الثقة 95%.

يبين الشكل 5 أنه في الأيام الأربعة الأولى كان الفرق بين متوسطات قيم لوغاريتم الامتصاصية الضوئية غير معنوياً($P>0.05$)، وكانت زيادة عدد الخلايا الطحلبية طفيفة إذ بقي لون السائل المغذي شفاف، بسبب النمو البطيء للطحلب، وهذا ما يُفسر بأن طحلب *Haematococcus pluvialis* يحتاج إلى وقت للتكيف والتأقلم مع البيئة الجديدة، وبدأت الفروق معنوية ($p<0.05$) بين متوسطات لوغاريتم الامتصاصية الضوئية اليومية من اليوم الخامس إلى اليوم الثاني عشر، وهذه المرحلة تمثل الطور اللوغاريتمي، إذ ازدادت الاختلافات في كثافة الخلايا تدريجياً وأصبح لون المزرعة الطحلبية عاتماً أكثر في اليوم الثاني عشر، بسبب تراكم اليخضور a في الخلايا الخضراء، وهذه الصبغة تزداد مع تقدم النمو، أما في الأيام(13، 14، 15، 16) فلم يكن هناك فرق معنوي في المتوسطات، أي أنها تمثل مرحلة الثبات، ليبدأ الطحلب في اليومين 17 و 18 بالتراجع وأصبح لون المزرعة الطحلبية يميل إلى الأصفر ثم إلى اللون البني، وانخفض النمو على نحو ملحوظ، ويُعزى ذلك لأن العناصر المغذية استهلكت وأصبحت محددة للنمو، فبدأت المزرعة الطحلبية بالتراجع والموت مالم تزود بوسط مغذٍ جديد. وهذا يتفق مع نتائج دراسة Wang وآخرون (2013) إذ نُمي هذا الطحلب مدة 19 يوماً في ثلاثة أوساط زرع مختلفة مع شدة ضوئية 1500 لوكس، فكان هناك فروق معنوية في هذه الأوساط الثلاثة فيما يتعلق بنمو الخلايا بدءاً من اليوم الخامس حتى اليوم الثالث عشر، أي إن الطور اللوغاريتمي استمر 7 أيام، وهذا يتفق نسبياً أيضاً مع دراسة أجراها Muzaki، وآخرون (2008) على النوع نفسه، إذ أظهر أن ذروة نمو *Haematococcus pluvialis* كانت في اليوم 13 وبدأ في دخول مرحلة الموت منذ اليوم 15.

الاستنتاجات Conclusions

يتميز طحلب *Haematococcus pluvialis* بضعف معدل نموه، استمرت دورة حياته 18 يوماً، وكان الطور اللوغاريتمي من اليوم الخامس حتى اليوم الثاني عشر أي إن ذروة نمو هذا الطحلب كانت في اليوم الثاني عشر وبعدها بدأت مرحلة الثبات؛ لذلك، اعتماداً على منحني النمو، يُنصح بحصاد المزرعة الطحلبية في نهاية الطور اللوغاريتمي أي في اليوم الثالث عشر، إذا كان الهدف من البحث إنتاج المزيد من الكتلة الحيوية، أما إذا كان الهدف من البحث هو إنتاج الأستازنتين (مضاد التأكسد الطبيعي) فيجب تعريض الطحلب بعد اليوم الثاني عشر للإجهاد (الإضاءة القوية وتزويد المزرعة الطحلبية بكمية إضافية من غاز CO_2، ونقص في المغذيات لاسيما النتروجين)؛ وذلك لدعم إنتاج عدد أكبر من الخلايا الخضراء، ثم تعريضها للإجهاد في نهاية الطور اللوغاريتمي، لأن هذه الشروط تحفزه على إنتاج وتكديس مركب الأستازنتين ضمن خلاياه. كتكيف مع الشروط البيئية الجديدة للبقاء على قيد الحياة.

التوصيات Recommendation

زيادة الاهتمام بالأبحاث التطبيقية على الطحالب الخضراء الدقيقة المنتشرة في المياه السورية بوجه عام، لاسيما بطحلب *Haematococcus* لما له من أهمية غذائية وطبية كبيرة.

إجراء المزيد من الأبحاث على طحلب *Haematococcus* المدروس أول مرة في سورية.

دراسة العوامل المؤثرة في نمو وإنتاجية طحلب *Haematococcus* كالإضاءة ونسبة CO_2 في وسط الزرع.

دراسة إمكانات استعمال طحلب *Haematococcus* في التطبيقات الصناعية والصحية.

المراجع References

1. Andersen, R. A. (2005). Algal culturing techniques, Elsevier/Academic Press, Burlington, Mass., 578.
2. Bhalamurugan, G. L., Valerie, O., Mark, L. (2018). Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. Environmental Engineering Research, 23(3), 229–241.
3. Bischoff, H. W. and Bold, H. C. 1963. Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. University of Texas Publications, Vol. 6318, 1- 95.
4. Buchheim M. A., Sutherland D. M., Buchheim J. A., Wolf M. (2013). The blood alga: phylogeny of *Haematococcus* (Chlorophyceae) inferred from ribosomal RNA gene sequence data. Eur. J. Phycol. 48: 318-329.
5. Droop, M.R. 1956. Haematococcus pluvialis and its allies. I. The Sphaerellaceae. Revue Algologique, 2: 53–71.
6. Elliot A.M. 1934. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. Arch. Protistenk. 82:250-272.
7. Ettl, H. (1983). Süsswasserflora von Mitteleuropa Band 9, Teil 1. 1983. Chlorophyta I: Phytomonadina, Stuttgart, Cramer Verlag.
8. Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms I.Cyclotella nana Hustedt and Detonula confervacea (Cleve) Gran. Can. J. Micro., Vol. 8, No. 2. 229 - 239.
9. Hagen C., Siegmund S., Braune W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. Eur. J. Phycol. 37: 217-226.
10. Imamoglu, E., Sukan, F. V., and Dalay, M. C. (2007). Effect of different culture media and light intensities on growth of Haematococcus pluvialis. International Journal of Natural & Engineering Sciences, 1(3).
11. Muzaki, A., Fahrudin, F., Wardana, I. K., Haryanti, H. (2008). Kultur Microalga *Haematococcus pluvialis* Untuk Menghasilkan Astaxantin. Jurnal Riset Akuakultur.
12. Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A. and Abalde, J. (2005). Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in Haematococcus pluvialis. Bioresource Technol., 96: 373–378.
13. Priyadarshani I., Biswajit R. (2012). Commercial and industrial applications of microalgae – A review. J. Algal Biomass Utln. 3 (4): 89–100.
14. Ronga D, Biazzi E, Parati K, Carminati D, Carminati E, et al. (2019) Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions 9(4): 192.
15. Sacasa-Castellanos, C. Batch and continuous studies of Chlorella vulgaris in photo-bioreactors. MSc. thesis, University of Western Ontario, Ontario, Canada, 2013.
16. Shetty P, Gitau MM, Maroti G. (2019). Salinity stress responses and adaptation mechanisms in eukaryotic green microalgae. Cells 8: cells 8121657
17. Singh V, R Tiwari, VK Chaturvedi, N Singh, V Mishra. 2021. Microbiological Aspects of Bioenergy Production: Recent Update and Future Directions. Bioenergy Research: Revisiting Latest Development, 29-52
18. Wang J, Han D, Sommerfeld MR, Lu C, Hu Q (2013) Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of Haematococcus pluvialis in an outdoor photobioreactor. Journal of Applied Phycology 25 : 253-260.
19. Wayama M., Ota S., Matsuura H., Nango N., Hirata A., Kawano S. (2013). Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. PLoS ONE 8:e53618.