

ORIGINAL ARTICLE

**Peculiarities of the Growth and Photosynthetic
Pigments Content in Algaeculture of
Acutodesmus dimorphus (Turpin) P.M.
Tsarenko under Salt and Acetate Stresses**

K.O. Romanenko^{1*}, P.O. Romanenko², L.M. Babenko¹,
I.V. Kosakivska¹

¹ M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2 Tereshchenkivska str., 01601, Kyiv-1, Ukraine

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre "Institute of Biology and Medicine", Volodymyrska str., 64/13, 03022, Kyiv, Ukraine

*E-Mail: k_romanenko@ukr.net

Received March 29, 2017

The objective of this research was to investigate the effect of salt (NaCl) and acetate (NaC₂H₃O₂) stresses on the pattern of biomass accumulation and photosynthetic pigments content in algae culture of the freshwater green alga *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) P.M. Tsarenko IBASU-A 251. We demonstrated that sodium chloride introduced in a culture medium at various concentrations caused a gradual reduction of the microalga biomass whose maximum was recorded at the salt concentration of 1.5%. Addition of sodium acetate at the same concentrations led, on the contrary, to a sharp (more than two times) decrease of *A. dimorphus* biomass. On the 18th day of culturing under salt stress conditions the chlorophyll *a* content decreased 1.5-2.5 times, the chlorophyll *b* content – 1.3-1.7 times, while the carotenoids quantity increased 1.2-1.6 times. Under acetate stress conditions the chlorophyll *a* content decreased 2-3 times, that of chlorophyll *b* – 1.7 – 1.8 times whereas the carotenoids quantity increased within the range of 1.4-1.8 times. Increase in chemical stressors concentrations involved some reduction of the chlorophylls *a/b* ratio and total chlorophylls *a+b* content, and at the same time, the ratio carotenoids/*a+b* increased. Sodium acetate appeared to be a more powerful inducer of carotenogenesis than sodium chloride. The highest quantity of carotenoids was registered at 1% and 1.5% concentrations of NaC₂H₃O₂ in the culture medium and 0.75% concentration of NaCl. The results obtained enable to regard *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) P.M. Tsarenko IBASU-A 251 as an active carotenoids producer to be later applied in studies of hypersynthesis of individual classes of this pigment.

Key words: *Acutodesmus dimorphus*, carotenoids, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, sodium acetate, sodium chloride

Acutodesmus dimorphus (Turpin) P.M. Tsarenko – пресноводная ценобиальная зеленая водоросль (Chlorophyta) из семейства Scenedesmaceae, представители которого, благодаря способности накапливать значительное количество липидов и углеводов в стрессовых условиях, рассматриваются как перспективные продуценты для производства биотоплива (Chokshi *et al.*, 2015; La *et al.*, 2016). Выявлено, что вид способен к интенсивному росту в различных типах сточных вод (Doria *et al.*, 2012; Mata *et al.*, 2012). Применение клеточного экстракта и биомассы *A. dimorphus* в качестве биоудобрения положительно влияло на прорастание семян томата (Garcia-Gonzalez, Sommerfeld, 2016). Полученные на сегодня данные свидетельствуют о значительном биотехнологическом потенциале микроводоросли (Tsarenko, Borisova, 2014). Известно, что водоросли под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды формируют клеточные и молекулярные механизмы адаптации, включающие, среди прочего, синтез физиологически активных веществ (каротиноидов, витаминов, фитогормонов), ценных для промышленной биотехнологии (Hu, 2004; Cardozo *et al.*, 2007; Romanenko *et al.*, 2015, 2016). Лабильность химического состава водорослей позволяет осуществлять управляемый биосинтез таких ценных соединений, как каротиноиды. На сегодняшний день, производство каротиноидов принадлежит к перспективным направлениям современной биотехнологии. Каротиноиды используются в качестве кормовых добавок при выращивании лососевых рыб, они являются провитаминами и эффективными антиоксидантами, препятствуют возникновению и развитию возрастных дегенеративных и онкологических заболеваний (Nishino *et al.*, 2009). Сообщалось, что такие химические соединения, как перекись водорода (Ma, Chen, 2001; Ip, Chen, 2005), хлориды аммония и натрия (Solovchenko, 2013; Masojídek *et al.*, 2000; Ranga Rao *et al.*, 2010; Sibi, 2015; Zhang *et al.*, 1997), а также ацетат натрия (Kobayashi *et al.*, 1993; Orosa *et al.*, 2001; Pirastru *et al.*, 2012) способны индуцировать синтез каротиноидов у микроводорослей. В связи с вышеизложенным,

целью данной работы было выявить влияние хлорида натрия (NaCl) и ацетата натрия (NaC₂H₃O₂, далее в тексте AcNa) на способность *A. dimorphus* к накоплению каротиноидов, определить характер действия различных концентраций химических стрессоров на содержание и соотношение фотосинтетических пигментов в альгокультуре *A. dimorphus*.

MATERIALS AND METHODS

Исследования проводились с альгологически чистой культурой *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) P.M. Tsarenko, штамм IBASU-A 251, который в 2011 году был отнесен к перспективным продуцентам биомассы (Tsarenko *et al.*, 2011). Штамм характеризуется устойчивостью к контаминации другими видами и способностью к накоплению липидов (Tsarenko, Borisova, 2014). Для определения воздействия NaCl и AcNa на аккумуляцию фотосинтетических пигментов был применен метод двустадийной накопительной культуры (Kobayashi *et al.*, 1991). Первоначально культивирование осуществляли при максимально благоприятных для деления клеток и накопления биомассы условиях, после чего в среду культивирования вносили NaCl и AcNa различной концентрации. Было установлено, что при полном минеральном обеспечении переход в стационарную фазу у штамма IBASU-A 251 происходил на 28-32 сутки. Продолжительность первого этапа составила 14 суток и соответствовала стадии активного роста, тогда как второй этап пребывания культуры под влиянием стрессоров NaCl и AcNa занял 18 суток и был использован для данного исследования.

Водоросли выращивали в конических колбах объемом 1000 мл на среде Буррелли (Borysova *et al.*, 2014). Объем культивируемой среды составлял 500 мл, начальная численность клеток 1,8-2,3·10⁵/мл. Культивирование проводили при температуре +25-26°C, двустороннем освещении (2 клк) с чередованием фотопериода 16:8 (день: ночь). Осуществлялась постоянная продувка культуры стерильным воздухом. На 15 сутки культивирования культуру (численность клеток 2,7-2,9·10⁶/мл) подвергали воздействию химических стрессоров. В

колбы с плотной биомассой вносили растворы NaCl и AcNa пяти различных концентраций (0,25%; 0,5%; 0,75%; 1%; 1,5%), после чего альгокультуру переводили на круглосуточное освещение, которое использовали в качестве дополнительного фактора для стимуляции каротиногенеза (Masojidek et al., 2000; Solovchenko, 2013). Контроль роста численности клеток в культуре производили путем подсчета в камере Горяева, биомассу определяли по накоплению сухого вещества (Metody, 1975).

Содержание фотосинтетических пигментов в биомассе определяли на 18 сутки после внесения в среду культивирования различных концентраций химических стрессоров. Биомассу отделяли от питательной среды, отмывали дистиллированной водой от остатков солей и концентрировали центрифугированием в течение 20 мин. при 3000 об/мин. Для анализа фотосинтетических пигментов биомассу фиксировали в жидком азоте и хранили при температуре -40°C . Фотосинтетические пигменты экстрагировали ацетоном и определяли по методу (Wellburn, 1994). Измерение экстинкции растворов осуществляли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония). опыты проводили в двукратной биологической и трехкратной аналитической повторности. Полученные результаты статистически обрабатывали в программе Excel стандартного пакета Microsoft Office 2013. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента, используя 5% уровень значимости ($p \leq 0,05$). На графиках и таблице представлены средние арифметические и их стандартные ошибки.

RESULTS AND DISCUSSION

Нами был выявлен значительный потенциал микроводоросли к накоплению каротиноидов под действием химических стрессоров. Внесение NaCl и AcNa в культуральную среду на стадии активного роста биомассы *A. dimorphus* оказало существенное влияние на содержание и соотношение фотосинтетических пигментов. Показателем реакции фотосинтетического аппарата на воздействие неблагоприятных факторов является содержание и соотношение хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов (Babenko et al., 2014; Fu, Bell, 2003; Haubner et al.,

2014; Liang et al., 2014; Sudhir, Murthy, 2004; Vonshak, Torzillo, 2004). Проведенные нами исследования показали, что на восемнадцатые сутки культивирования *A. dimorphus* в условиях солевого стресса происходило постепенное уменьшение содержания хлорофиллов *a* и *b*, интенсивность которого зависела от концентрации NaCl (Рис. 1, а, б). Так, содержание хлорофилла *a* с увеличением концентрации NaCl в среде культивирования уменьшилось в 1,5-2,5 раза, содержание хлорофилла *b* в 1,3-1,7 раза. При этом количество каротиноидов возросло в 1,2-1,6 раза. При концентрации хлорида натрия 0,75% количество каротиноидов увеличилось вдвое и достигло максимума (Рис. 1, в). Увеличения синтеза каротиноидов под действием солевого стресса отмечено также у других микроводорослей. Так, при 30% концентрации NaCl, дефиците азота и избыточном освещении наблюдалось накопление β -каротина в клетках *Dunaliella salina* (El Baz et. al., 2002). У *Haematococcus pluvialis* накоплению каротиноидов, главным образом, астаксантина, способствовало внесение в среду 2% NaCl (Boussiba et. al., 1992). Увеличение общего содержания каротиноидов отмечалось у *Chlorella zofingiensis* при внесении в культуральную среду 0,2 М NaCl, при этом основным каротиноидом был астаксантин. Увеличение концентрации NaCl в среде до 0,4 М ингибировало рост и уменьшало количество фотосинтетических пигментов (Del Campo et al., 2004). В условиях высокой инсоляции и в присутствии 2% NaCl в среде содержание астаксантина у *Ch. zofingiensis* возрастало вдвое по сравнению с кантаксантином, тогда как при низком освещении и той же концентрации соли, содержание этих двух каротиноидов было иным: кантаксантина синтезировалось в 8 раз больше, чем астаксантина (Pelah et al., 2004). Дефицит азота, повышенная соленость (0,3 М NaCl) и избыток света ингибировали фотосинтетическую активность у *Chlorococcum* sp., одновременно стимулируя накопление каротиноидов. Показано, что в первые сутки стресса в клетках *Chlorococcum* sp. накапливался лютеин, тогда как на третьи и четвертые сутки происходило увеличение

содержания кантаксантина и астаксантина, а уровень лютеина существенно снижался (Masojídek *et al.*, 2000). Добавление в среду культивирования 0,1% NaCl способствовало аккумуляции лютеина в клетках *Botryococcus braunii*, тогда как содержание других каротиноидов – астаксантина, виолаксантина, зеаксантина, β -каротина – было незначительным (Ranga Rao *et al.*, 2010). Внесение в среду культивирования *Scenedesmus sp.* 2% NaCl в сочетании с отходами от производства лимонной кислоты приводило к полной деградации хлорофиллов и аккумуляции каротиноидов (El-Sayed, 2010).

В условиях ацетатного стресса наблюдалась резкая деградация обоих хлорофиллов. Содержание хлорофилла *a* уменьшилось в 2-3 раза (Рис.1, а), хлорофилла *b* - в 1,7-1,8 раза (Рис. 1, б), тогда как содержание каротиноидов увеличилось в 1,4-1,8 раза (Рис. 1, в), при этом наибольшие значения зафиксированы для концентраций 1% и 1,5% AcNa. В работах других исследователей сообщалось, что под действием ацетата натрия в культуре *Haematococcus pluvialis* (Orosa *et al.*, 2001), *Scenedesmus sp.* (Pirastru *et al.*, 2012), *Bracteacoccus minor* (Minyuk *et al.*, 2015) содержание хлорофиллов *a* и *b* уменьшилось более чем в 10 раз, тогда как количество каротиноидов возросло более чем в 9 раз. Так, внесение AcNa в среду культивирования *Haematococcus pluvialis* способствовала значительному увеличению образования астаксантина, в меньшей степени – кантаксантина и β -каротина (Orosa *et al.*, 2001). При культивировании *Scenedesmus sp.* с внесением повышенных концентраций AcNa (60 мМ и 120 мМ) отмечено увеличение содержания астаксантина и кантаксантина, тогда как низкие концентрации AcNa (4,5 мМ) этому не способствовали (Pirastru *et al.*, 2012). У *Bracteacoccus minor* отмечено высокое содержание интермедиантов астаксантина, который запасался в форме диацильных эфиров (Minyuk *et al.*, 2015)

В ходе эксперимента нами было зафиксировано снижение темпов образования биомассы в зависимости от увеличения концентрации NaCl и AcNa (Рис. 2). Следует отметить, что все

концентрации ацетата натрия более чем в два раза сократили образование биомассы водоросли (Рис. 2, красная линия), тогда как в опыте с хлоридом натрия наблюдалось постепенное снижение биомассы, максимум которого зафиксирован при концентрации 1,5 % (Рис. 2, синяя линия). Значительные потери биомассы при внесении AcNa в питательную среду были также зафиксированы при двустадийном выращивании *Haematococcus pluvialis* (Dantsyuk, 2010). Для таксономически близких к *A. dimorphus* водорослей *A. obliquus* и *Scenedesmus almeriensis* (Sánchez *et al.*, 2008; Kaewkannetra *et al.*, 2012) показано, что низкие концентрации NaCl (0,5%) в среде культивирования не тормозят увеличение биомассы, тогда как с повышением концентрации NaCl (до 3%) накопление биомассы сокращается более чем в 2 раза.

В ацетатной альгокультуре нами отмечена агрегация клеток с образованием хлопьев, тогда как в солевом эксперименте это не наблюдалось. С повышением концентрации AcNa увеличивалось количество мертвых бесцветных клеток, особенно массово они были отмечены при концентрациях равных 1% и 1,5 %. В солевом опыте, вне зависимости от концентрации NaCl в среде, мертвые клетки нами не обнаружены. Ранее сообщалось, что ацетат (0,05 М) в сочетании с NaCl (0,17 М) вызывал массовое отмирание молодых клеток *B. minor* (Chubchikova *et al.*, 2011).

С увеличением концентрации NaCl и AcNa соотношение хлорофиллов *a/b*, а также сумма хлорофиллов *a+b* уменьшались, что косвенно свидетельствует о снижении фотохимической активности в клетках микроводоросли. В то же время происходил рост соотношения каротиноиды/*a+b*. Показатель соотношения каротиноиды/*a+b* в опыте с AcNa был значительно выше, чем в опыте с NaCl. При концентрации NaCl равной 0,75% и концентрациях AcNa равных 1% и 1,5% зафиксированы самые высокие показатели в образовании каротиноидов в культуре *A. dimorphus* IBASU-A-251: для хлорида натрия – 0,487 мг/г сырого веса и для ацетата натрия – 0,476 мг/г и 0,465 мг/г сырого веса (табл. 1).

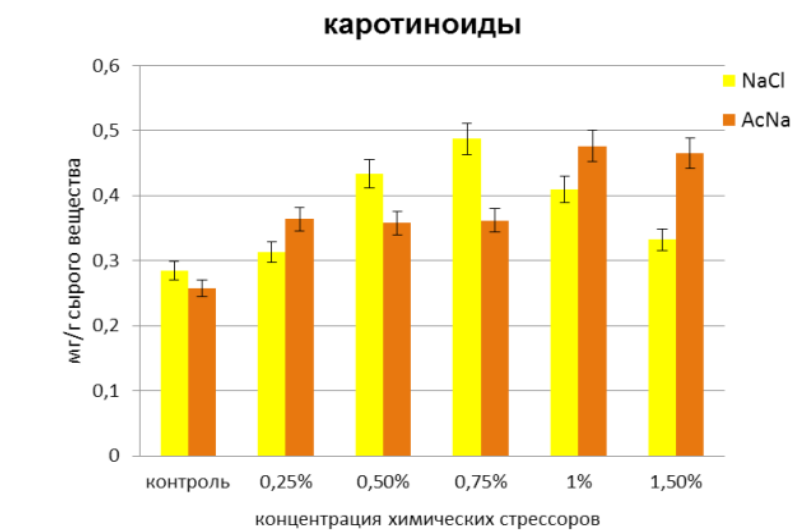
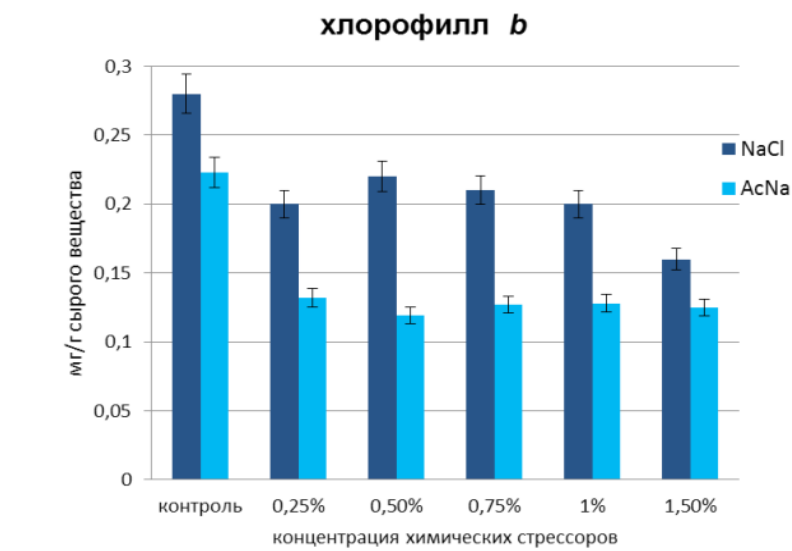
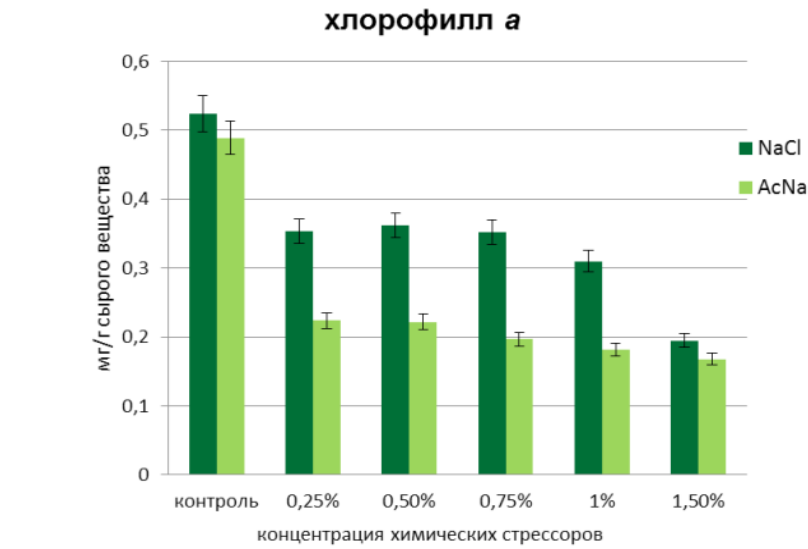


Figure 1. Содержание фотосинтетических пигментов (а – хлорофилл а; б – хлорофилл b; в – каротиноиды) в альгокультуре *A. dimorphus* под воздействием NaCl и AcNa различной концентрации.

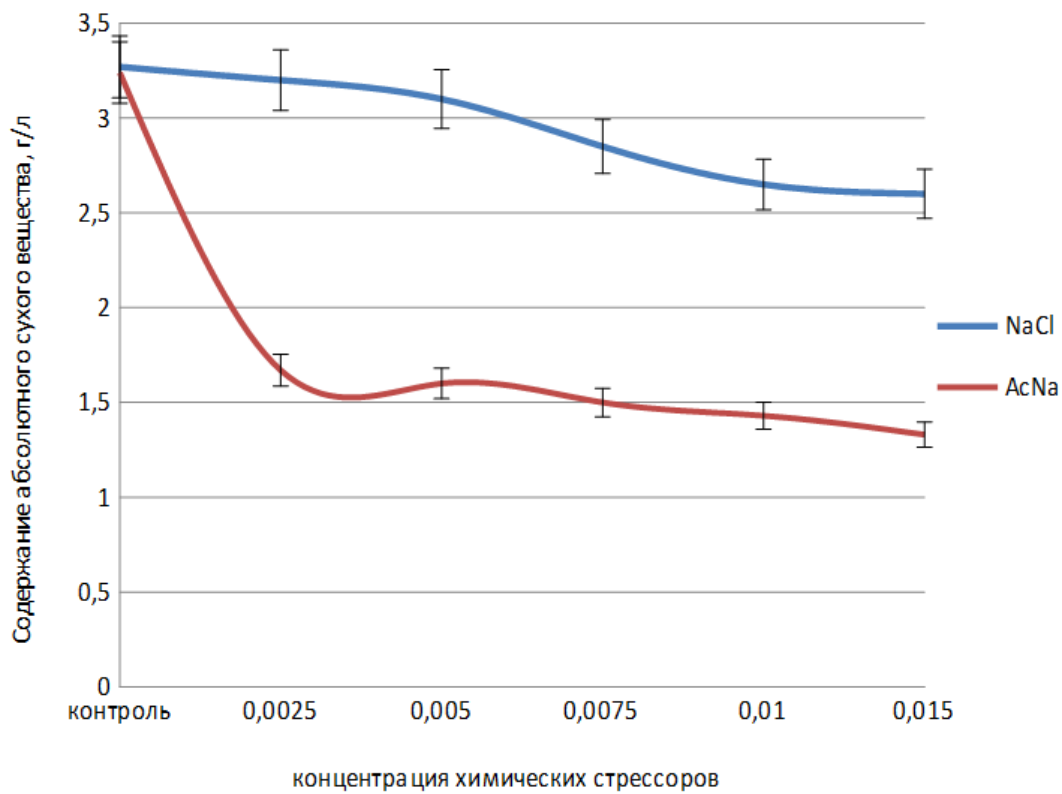
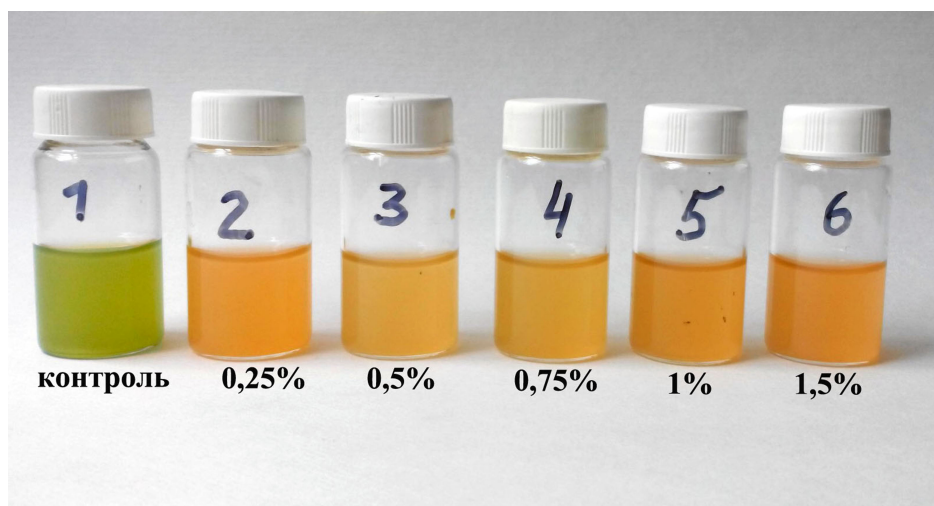


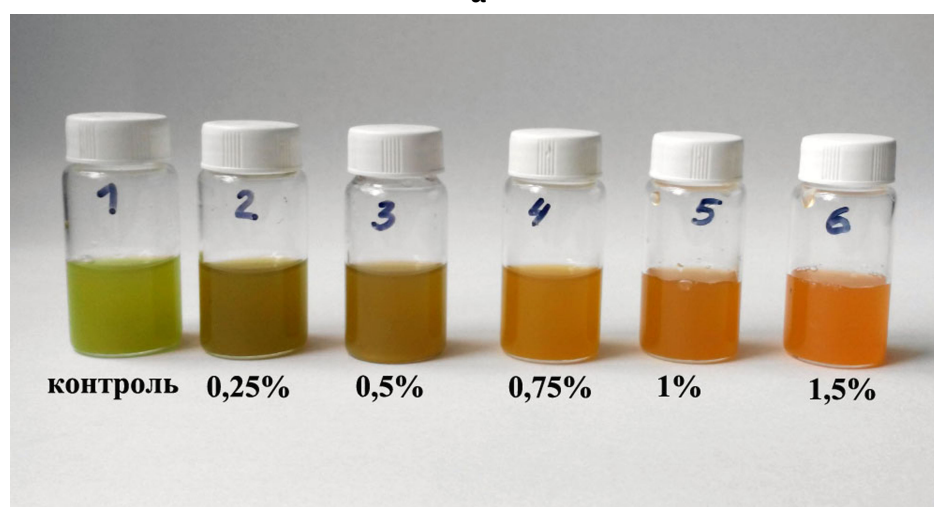
Figure 2. Влияние хлорида натрия и ацетата натрия различной концентрации на накопление биомассы *A. dimorphus*.

Table 1. Влияние хлорида натрия и ацетата натрия на соотношение фотосинтетических пигментов в альгокультуре *A. dimorphus*.

Концентрация химического стрессора, %	Хлорофиллы a/b		Хлорофиллы a+b, мг/г сырого вещества		Каротиноиды / хлорофиллы a+b	
	NaCl	AcNa	NaCl	AcNa	NaCl	AcNa
контроль	1,87	2,19	0,804±0,03	0,712±0,01	0,35	0,36
0,25%	1,76	1,69	0,553±0,05	0,356±0,04	0,57	1,02
0,50%	1,64	1,68	0,582±0,02	0,354±0,03	0,74	1,01
0,75%	1,67	1,55	0,562±0,03	0,324±0,04	0,87	1,12
1%	1,55	1,42	0,510±0,04	0,310±0,05	0,83	1,55
1,50%	1,22	1,34	0,355±0,03	0,293±0,02	0,81	1,59



а



б

Figure 3. Внешний вид культуры *A. dimorphus* IBASU-A-251 на 18 сутки культивирования в условиях действия химических стрессоров различной концентрации: а - ацетат натрия, б - хлорид натрия.

С момента начала стрессового этапа эксперимента цвет культивируемой водоросли постепенно менялся. На 18 сутки действия химических стрессоров контрольный вариант имел зеленую окраску, что объясняется высоким содержанием зеленых пигментов - хлорофиллов. Под влиянием ацетата различной концентрации альгокультура приобрела яркий оранжевый цвет (рис. 3 а), тогда как при воздействии хлорида натрия цвет водоросли менялся от буро-зеленого до оранжевого и ярко-оранжевого (рис. 3, б).

CONCLUSION

Внесение в среду культивирования микроводоросли *A. dimorphus* IBASU-A 251 в фазу ее

активного роста химических стрессоров хлорида натрия и ацетата натрия снижали темпы накопления биомассы. Добавление соли вызвало постепенное уменьшение биомассы микроводоросли, тогда как ацетат приводил к резкому сокращению биомассы. Увеличение концентрации химических стрессоров сопровождалось ростом количества каротиноидов и уменьшением – хлорофиллов *a* и *b*. Максимальный уровень каротиноидов наблюдался при концентрации в среде культивирования NaCl равной 0,75%, и концентрации AcNa равной 1% и 1,5%. Показано, что ацетат натрия является более агрессивным индуктором каротиногенеза. Наименьшие концентрации AcNa вызывали резкую деградацию хлорофиллов. Полученные результаты

позволяют рассматривать *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) P.M. Tsarenko IBASU-A 251 как активный продуцент каротиноидов, перспективный для последующих исследований на предмет гиперсинтеза отдельных классов этих пигментов.

REFERENCES

- Babenko L.M., Kosakivska I.V., Akimov Yu.A., Klymchuk D.O., Skaternya T.D. (2014). Effect of temperature stresses on pigment content, lipoxygenase activity and cell ultrastructure of winter wheat seedlings. *Genet. Plant Physiol.*, **4(1-2)**, 117-125.
- Borysova O.V., Tsarenko P.M., Konishchuk M.O. (2014). Microalgae culture collection IBASU-A. Kyiv, 110 p.
- Boussiba S., Fan L., Vonshak A. (1992). Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods Enzymol. Part A: Carotenoids*, **213**, 386-391.
- Cardozo K.H., Guaratini T., Barros M.P., Falcão V.R., Tonon A.P., Lopes N.P., Campos ., Torres M.A., Souza A.O., Colepicolo P., Pinto E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, **146(1-2)**, 60-78.
- Chokshi K., Pancha I., Trivedi K., George B., Maurya R., Ghosh A., Mishra S. (2015). Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. *Bioresour. Technol.*, **180**, 162-171.
- Chubchikova I.N., Drobetskaya I.V., Minyuk G.S., Dantsyuk N.V., Chelebiyeva E.S. (2011). Screening of green microalgae as a potential source of natural ketocarotenoids 2. Features of growth and secondary carotenogenesis in the representatives of the genus *Bacteaococcus* (Clorophyceae). *Mor. ekol. zhurn.*, **10(1)**, 91-97. (in Russian).
- Dantsyuk N.V. (2010). Effect of sodium acetate on intensity of secondary carotenogenesis of green microalgae *Haematococcus pluvialis*. *Ekol. morya*, **80**, 44-50. (in Russian).
- Del Campo J.A., Rodríguez H., Moreno J., Vargas M.Á., Rivas J., Guerrero M.G. (2004). Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 848-854.
- Doria E., Longoni P., Scibilia L., Iazzi N., Cella R., Nielsen E. (2012). Isolation and characterization of a *Scenedesmus acutus* strain to be used for bioremediation of urban wastewater. *J. Appl. Phycol.*, **24**, 375-383.
- El Baz F.K., Aboul-Enein A.M., El-Baroty G.S., Youssef A.M., Abdel-Baky H.H. (2002). Accumulation of antioxidant vitamins in *Dunaliella salina*. *J. Biol. Sci.*, **2(4)**, 220- 223.
- El-Sayed A.B. (2010). Carotenoids accumulation in the green alga *Scenedesmus* sp. incubated with industrial citrate waste and different induction stresses. *Nature Sci.*, **8(10)**, 34-40.
- Fu F.-X., Bell P.R.F. (2003). Effect of salinity on growth, pigmentation, N₂ fixation and alkaline phosphatase activity of cultured *Trichodesmium* sp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **257**, 69-76.
- Garcia-Gonzalez J., Sommerfeld M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *J. Appl. Phycol.*, **28(2)**, 1051-1061.
- Haubner N., Sylvander P., Vuori K., Snoeijs P. (2014). Abiotic stress modified the synthesis of alphotocopherol and beta-carotene in phytoplankton species. *J. Phycol.*, **50**, 753-759.
- Hu Q. (2004). Environmental Effects on Cell Composition. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Ed. by A. Richmond, Blackwell Science Ltd.: Oxford, UK, 83-93.
- Ip P.-F., Chen F. (2005). Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. *Process Biochem.*, **40**, 3491-3496.
- Kaewkannetra P., Enmak P., Chiu T.Y. (2012). The effect of CO₂ and salinity on the cultivation of *Scenedesmus obliquus* for biodiesel production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **17**, 591-597.
- Kobayashi M., Kakizono T., Nagai S. (1991). Astaxanthin production by a green alga *Haematococcus pluvialis* accompanied with

- morphological changes in acetate media. *J. Ferment. Bioeng.*, **71(5)**, 335-339.
- Kobayashi M., Kakizono T., Nagai S. (1993). Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59(3)**, 867-873.
- La H.-J., Choi G.-G., Cho C., Seo S.-H., Srivastava A., Jo B.-H., Lee J.-Y., Jin Y.-S., Oh H.-M. (2016). Increased lipid productivity of *Acutodesmus dimorphus* using optimized pulsed electric field. *J. Appl. Phycol.*, **28(2)**, 931-938.
- Liang Y., Cao C., Tian C., Sun M. (2014). Changes in cell density and chlorophyll fluorescence with salinity stress in two *Isochrysis galbana* strains (Prymnesiophyceae). *Algol. Stud.*, **145-146**, 81-98.
- Ma R. Y.-N., Chen F. (2001). Induction of astaxanthin formation by reactive oxygen species in mixotrophic culture of *Chlorococcum* sp. *Biotechnol. Lett.*, **23(7)**, 519-523
- Masojídek J., Torzillo G., Kopecký J., Koblížek M., Nidiaci L., Komenda J., Lukavská A., Sacchi A. (2000). Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress. *J. Appl. Phycol.*, **12**, 417-426.
- Mata T.M., Melo A.C., Simões M., Caetano N.S. (2012). Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour Technol.*, **107**, 151-158.
- Metody fiziologo-biokhimičeskogo issledovaniya vodorosley v gidrobiologičeskoy praktike. (1975). Otv. red. Topachevskiy A.V. Kyiv: Naukova dumka, 247 s. (in Russian).
- Minyuk G.S., Chelebieva E.S., Chubchikova I.N. (2015). Secondary carotenogenesis of the green microalga *Bracteacoccus minor* (Chlorophyta) in a two-stage culture. *Algologia*, **25(1)**, 21-34. (in Russian).
- Nishino H., Murakoshi M., Tokuda H., Satomi Y. (2009). Cancer Prevention by Carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **483**, 165-168.
- Orosa M., Franqueira D., Cid A., Abalde J. (2001). Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. *Biotech. Lett.*, **23**, 373-378.
- Pelah D., Sintov A., Cohen E. (2004). The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 483-486.
- Pirastu L., Darwish M., Chu F. L., Perreault F., Sirois L., Sleno L., Popovic R. (2012). Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. *J. Appl. Phycol.*, **24**, 117-124.
- Ranga Rao A., Sarada R., Ravishankar G.A. (2010). Enhancement of carotenoids in green alga *Botryococcus braunii* in various autotrophic media under stress conditions. *Int. J. Biomed. Pharma Sci.*, **4(2)**, 87-92.
- Romanenko E.A., Kosakovskaya I.V., Romanenko P.A. (2015). Phytohormones of Microalgae: Biological Role and Involvement in the Regulation of Physiological Processes. Pt I. Auxins, Abscisic Acid, Ethylene. *IJA.*, **17(3)**, 275-289.
- Romanenko K.O., Kosakovskaya I.V., Romanenko P.O. (2016). Phytohormones of Microalgae: Biological Role and Involvement in the Regulation of Physiological Processes. *IJA.*, **18(2)**, 179-201.
- Sánchez J.F., Fernández J.M., Ación F.G., Rueda A., Pérez-Parra J., Molina E. (2008). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochem.*, **43**, 398-405.
- Sibi G., Shetty V., Mokashi K. (2015). Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels-A review. *J. Energy Inst.*, **89(3)**, 330-334.
- Solovchenko A.E. (2013). Physiology and Adaptive Significance of Secondary Carotenogenesis in Green Microalgae. *Russ. J. Plant Physiol.*, **60(1)**, 3-16.
- Sudhir P., Murthy S.D.S. (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, **42(4)**, 481-486.

- Tsarenko P.M., Borisova E.V. (2014). Microalgal Culture Collection IBASU-A — a potential resource of feedstock for biodiesel production. *Algologia*, **24(3)**, 409-412. (in Russian).
- Tsarenko P., Borysova O., Blium Ya. (2011). Microalgae as bioenergetics object IBASU-A collection species — perspective producers of biomass as the source of raw stuff for biofuel. *Visn. NAN Ukraine*, **5**, 49-54. (in Ukraine).
- Vonshak A., Torzillo G. (2004). Environmental Stress Physiology. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Ed. by A. Richmond, Blackwell Science Ltd.: Oxford, UK, 57-82.
- Wellburn A. (1994). The spectral determination of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.*, **144**, 307-313.
- Zhang D. H., Lee Y.K., Ng M.L., Phang S. M. (1997). Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.*, **9**, 147-155.