

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2017, 27(3): 231–245

doi: 10.15407/alg27.03.231

УДК 581.132.1:582

РОМАНЕНКО Е.А.<sup>1</sup>, РОМАНЕНКО П.А.<sup>2</sup>, БАБЕНКО Л.М.<sup>1</sup>, КОСАКОВСКАЯ И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,

ул. Терещенковская, 2, Киев 01004, Украина

<sup>2</sup>Кафедра биологии растений, Учебно-научный центр "Институт биологии и

медицины" Киевского национального университета им. Тараса Шевченко,

ул. Владимирская, 64/13, Киев 01601, Украина

*k\_romanenko@ukr.net; petrrom@ukr.net;*

*lilia.babenko@gmail.com; irynakosakivska@gmail.com*

### **ВЛИЯНИЕ СОЛЕВОГО СТРЕССА НА ХАРАКТЕР РОСТА И СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В АЛЬГОКУЛЬТУРЕ *ACUTODESMUS DIMORPHUS* (CHLOROPHYTA)**

Исследовано влияние солевого стресса на рост, накопление биомассы и содержание фотосинтетических пигментов в альгокультуре пресноводной зеленой водоросли *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) P.M. Tsarenko. Показано, что при внесении в культуральную среду хлорида натрия рост микроводоросли в фазе активного роста культуры замедлялся, количество хлорофиллов *a* и *b* уменьшалось. С увеличением концентрации соли и продолжительности культивирования содержание каротиноидов возрастало. Рост количества каротиноидов отмечен на 18-е сутки культивирования при всех исследованных концентрациях соли, а максимальные их значения наблюдали при содержании 0,75% NaCl в среде культивирования.

Ключевые слова: *Acutodesmus dimorphus*, солевой стресс, хлорофиллы *a* и *b*, каротиноиды

#### **Введение**

Одним из главных экологических факторов, лимитирующих рост и продуктивность большинства растений, является засоление. Высокое содержание солей в среде приводит к повреждению клеточных мембран, подавлению активности ферментов, нарушению таких жизненно важных функций, как клеточное деление, ассимиляция углерода, метаболизм белков и нуклеиновых кислот, снижению интенсивности дыхания, накоплению токсичных продуктов в клетках (Балнокин, Строганов, 1985; Sudhir, Murthy, 2004; Gupta, Huang, 2014). Водоросли под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды форми-

© Романенко Е.А., Романенко П.А., Бабенко Л.М., Косаковская И.В., 2017

руют клеточные и молекулярные механизмы адаптации, включающие также синтез физиологически активных веществ (каротиноидов, витаминов, фитогормонов), ценных для промышленной биотехнологии (Hu, 2004; Cardozo et al., 2007; Romanenko et al., 2015, 2016).

Галофильные водоросли, адаптированные к существованию в среде с высоким содержанием солей (> 40‰), а также галотолерантные, живущие в пресных водоёмах, для защиты от солевого повреждения и сохранения жизнеспособности синтезируют ряд вторичных метаболитов, обеспечивающих сбалансированность внутриклеточного осмотического давления по отношению к влиянию окружающей среды (Richmond, 1986). У пресноводных микроводорослей засоление является одним из индукторов, запускающих синтез биологически активных веществ (Sibi et al., 2015). Показано, что у галофильных зеленых водорослей рода *Dunaliella* Teod. солевой стресс способствует повышению внутриклеточного содержания липидов, глицерина, пролина, глицин-бетаина, сахаров, β-каротина, токоферолов и аскорбиновой кислоты, а также влияет на биосинтез отдельных стрессовых белков (Sadka et al., 1991; Fisher et al., 1994; El Baz et al., 2002; Jahnke, White 2003; Takagi et al., 2006; Goyal, 2007; Mishra et al., 2008). Установлено стимулирующее воздействие солевого стресса на биосинтез липидов у *Chlamydomonas nivalis* (F.A. Bauer) Wille, *Acutodesmus obliquus* (Turpin) E. Hegew. & Hanagata, *Botryococcus braunii* Kütz., *Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs и *Chlorella vulgaris* Beij. (Ranga Rao et al., 2007; Kalita et al., 2011; Duan et al., 2012; Kaewkannetra et al., 2012; Lu et al., 2012; Ruangsomboon, 2012). У зеленых водорослей *Chlorella zofingiensis* Dönnz, *Haematococcus pluvialis* Flot., *Chlorococcum* sp. и *B. braunii* солевой стресс индуцировал образование вторичных каротиноидов — астаксантина и кантаксантина (Kobayashi et al., 1997; Masojídek et al., 2000; Del Campo et al., 2004; Pelah et al., 2004; Ranga Rao et al., 2010). Гиперсинтез липидов и каротиноидов при солевом стрессе отмечен также у синезеленой водоросли *Arthrospira fusiformis* (Voronikhin) Komárek & J.W.G. Lund (Rafiqul et al., 2003).

*Acutodesmus dimorphus* — пресноводная ценобиальная зеленая водоросль из семейства *Scenedesmaceae*, представители которого из-за способности накапливать значительное количество липидов и углеводов в стрессовых условиях являются перспективными продуцентами для производства биотоплива (Chokshi et al., 2015; La et al., 2016). 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 влияет на прорастание семян томата (Garcia-Gonzalez, Sommerfeld, 2016). Полученные на сегодняшний день данные свидетельствуют о значительном биотехнологическом потенциале микроводоросли, при этом характер изменений пигментного комплекса на фоне экзогенного воздействия различных концентраций хлорида натрия в альгокультуре *A. dimorphus* остается неисследованным.

Получение каротиноидов является перспективным направлением современной биотехнологии. Они используются в качестве кормовых добавок при выращивании лососевых рыб, являются провитаминами и эффективными антиоксидантами, препятствуют возникновению и развитию возрастных дегенеративных и онкологических заболеваний (Nishino et al., 2009). Учитывая то, что солевой стресс способен индуцировать синтез каротиноидов у отдельных видов микроводорослей (Masojídek et al., 2000; Pelah et al., 2004; Ranga Rao et al., 2010), целью нашей работы стало изучение влияния различных концентраций NaCl на характер роста и особенности аккумуляции фотосинтетических пигментов в альгологической культуре *Acutodesmus dimorphus*.

### Материалы и методы

Для исследований мы использовали альгологически чистую культуру *Acutodesmus dimorphus* (штамм IBASU-A 251). Водоросли выращивали в конических колбах объемом 1000 мл на среде Буррелли (Борисова и др., 2014). Объем среды культивирования составлял 500 мл, начальная численность клеток  $1,8-2,3 \cdot 10^5$ /мл. Культивирование проводили при температуре +25–26 °С, двустороннем освещении (2 клк) с чередованием фотопериода 16 : 8 (день : ночь). Культуру постоянно продували стерильным воздухом, а на 15-е сутки (численность клеток  $2,7-2,9 \cdot 10^6$ /мл) её подвергали воздействию солевого стресса. В колбы вносили раствор NaCl в концентрациях 0,25; 0,5; 0,75; 1 и 1,5%, после чего альгологическую культуру переводили на круглосуточное освещение для стимуляции каротиногенеза (Masojídek et al., 2000; Соловченко, 2013). Рост численности клеток контролировали каждые трое суток путем подсчета в камере Горяева, биомассу определяли по накоплению сухой биомассы (Методы, 1975).

Содержание фотосинтетических пигментов в биомассе определяли на 6-е, 12-е и 18-е сутки после внесения в культуральную среду различных концентраций NaCl. Биомассу отделяли от питательной среды, отмывали дистиллированной водой от остатков солей и концентрировали, центрифугируя в течение 20 мин при 3000 об/мин. Для анализа фотосинтетических пигментов биомассу фиксировали в жидком азоте и хранили при температуре -40 °С. Фотосинтетические пигменты экстрагировали ацетоном и определяли по методу, описанному в литературе (Wellburn, 1994). Экстинкцию растворов измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония). Опыты проводили в двухкратной биологической и трехкратной аналитической повторностях. Полученные результаты статистически обрабатывали в программе Excel стандартного пакета Microsoft Office 2013. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента, используя 5%-ный уровень значимости ( $p \leq 0,05$ ). На рисунках и в таблице представлены средние арифметические и их стандартные отклонения.

## Результаты и обсуждение

Используемый в работе штамм IBASU-A 251 в 2011 г. был отнесен к перспективным продуцентам биомассы (Царенко и др., 2011). Он характеризуется устойчивостью к контаминации другими видами и способностью к накоплению липидов (Царенко, Борисова, 2014). Для определения воздействия экзогенного хлорида натрия на аккумуляцию и спектр фотосинтетических пигментов применяли метод двухстадийной накопительной культуры (Kobayashi et al., 1991). Первоначально культивирование осуществляли при максимально благоприятных для деления клеток и накопления биомассы условиях, после чего в культуральную среду вносили хлорид натрия различной концентрации. При полном минеральном обеспечении переход в стационарную фазу у штамма IBASU-A 251 наблюдался на 28–32-е сутки. Продолжительность первого этапа составила 14 сут и соответствовала стадии активного роста, тогда как второй этап пребывания культуры в условиях солевого стресса длился 18 сут и был использован в данном исследовании.

Внесение NaCl в культуральную среду на стадии активного роста биомассы *A. dimorphus* существенно влияло на дальнейшее развитие микроводоросли. Замедление роста численности клеток водоросли было прямо пропорционально концентрации хлорида натрия в среде культивирования (см. рис. 1). На 12-е сутки культивирования при концентрации NaCl 0,25% в среде отмечено прекращение роста численности клеток микроводоросли и переход альгологической культуры на стационарный уровень. При концентрации NaCl 0,5–1,5% резкое замедление роста численности клеток микроводоросли наблюдалось на 3-и сутки. Рост *A. dimorphus* возобновлялся на 6-е сутки при концентрации NaCl 0,5 и 0,75%. Вероятно, в этот временной промежуток формируются адаптивные процессы в клетках микроводоросли, в результате чего продолжается рост альгокультуры. На 15-е сутки при концентрации NaCl 0,5 и 0,75% наступал переход в стационарную фазу роста. Наибольшее замедление роста наблюдалось при концентрации NaCl 1 и 1,5%. После 9 суток солевого стресса наблюдался переход этих альгокультур в стационарную фазу роста (см. рис. 1). Мы установили, что в контрольных условиях на 15-е сутки с начала второй стадии культивирования прирост количества клеток в альгокультуре уменьшался, что обусловлено истощением питательной среды и накоплением в ней метаболитов водоросли. Данный этап соответствовал началу стационарной фазы развития. Замедление роста численности клеток совпадало со снижением скорости накопления биомассы микроводоросли, при этом биомасса сухого вещества была обратно пропорциональна концентрации NaCl (см. рис. 2).

Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей о влиянии засоленности на рост пресноводных таксономически близких *A. dimorphus* водорослей *A. obliquus* и

*Scenedesmus almeriensis* Ceryn & Campos (Sánchez et al., 2008; Kaewkannetra et al., 2012). Показано, что при концентрации 0,5% NaCl в культуральной среде продолжалось увеличение биомассы *S. almeriensis*, тогда как при концентрации 3% NaCl рост замедлялся более чем в два раза (Sánchez et al., 2008).

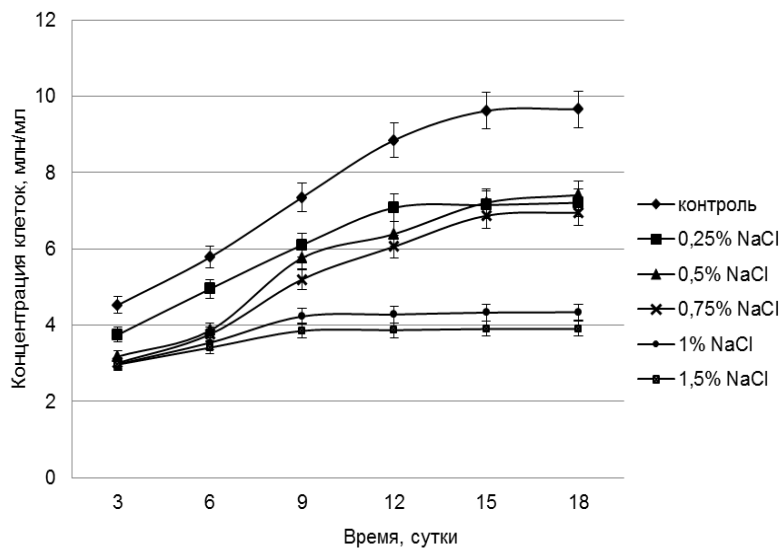


Рис. 1. Влияние хлорида натрия на рост альгокультуры *Acutodesmus dimorphus*

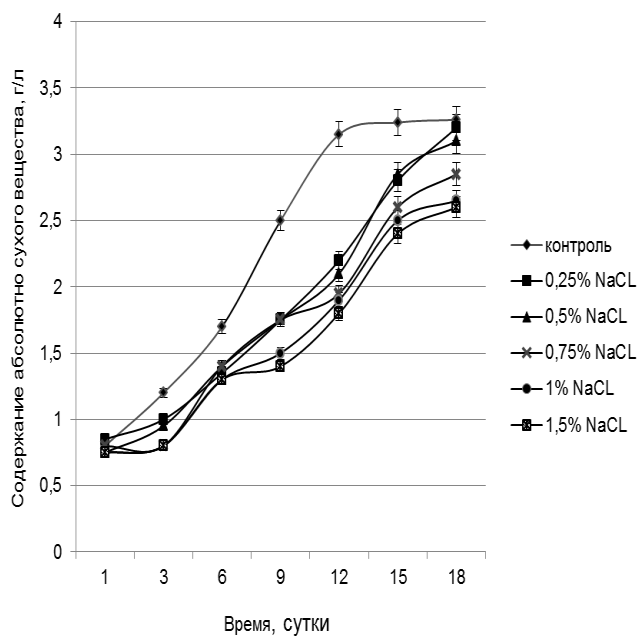


Рис. 2. Влияние хлорида натрия на накопление биомассы *Acutodesmus dimorphus*

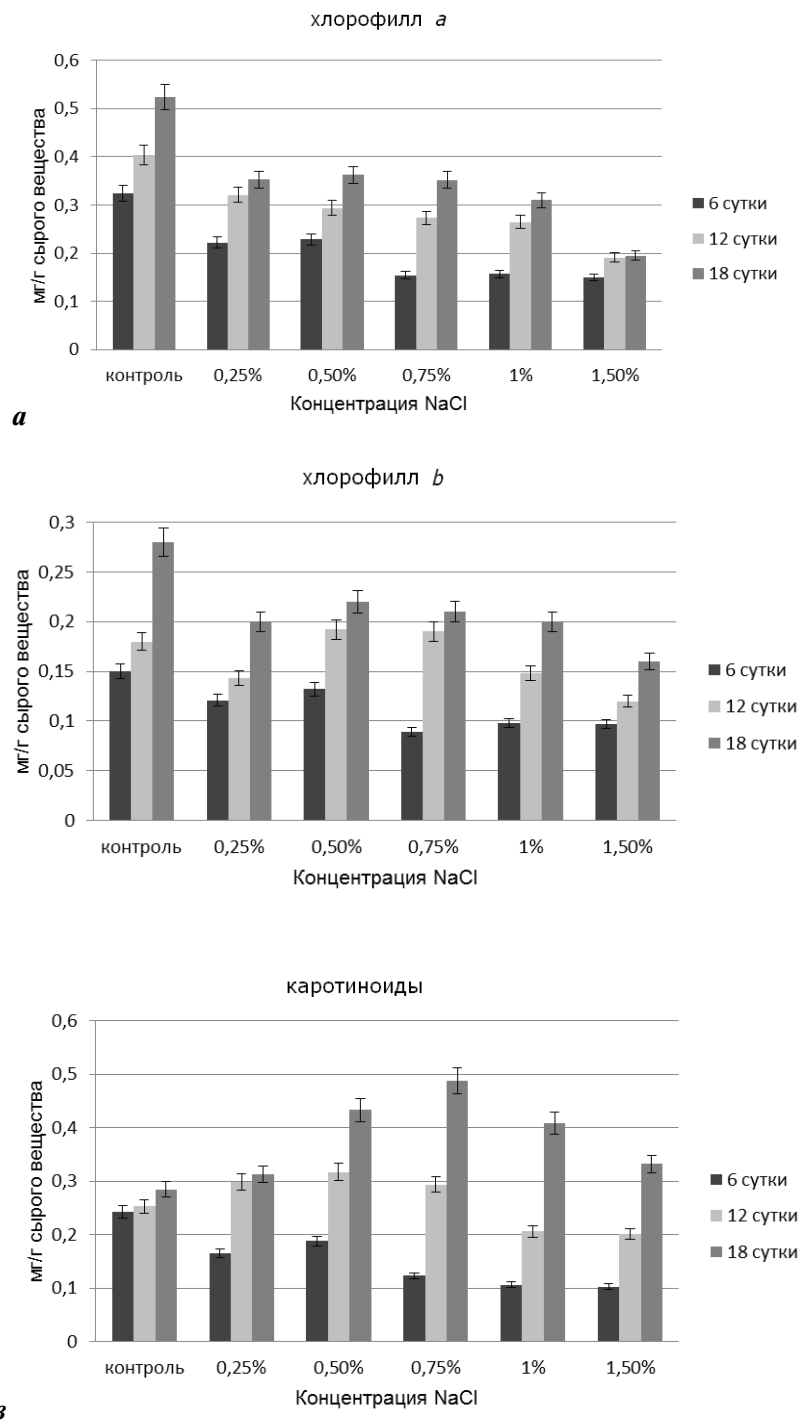


Рис. 3. Содержание фотосинтетических пигментов (*a* – хлорофилл *a*; *б* – хлорофилл *b*; *в* – каротиноиды) в альгокультуре *Acutodesmus dimorphus* под воздействием NaCl различной концентрации

Установлено, что концентрация NaCl 0,05 М в культуральной среде практически не влияла на темпы роста *A. obliquus*, тогда как при 0,3 М интенсивность роста культуры уменьшалась более чем в 2 раза, а при концентрации 0,6–3,0 М он прекращался (Kaewkannetra et al., 2012). Ингибирование роста и уменьшение биомассы под воздействием солевого стресса было отмечено у некоторых синезеленых и зеленых водорослей: *Arthrospira fusiformis* (Rafiqul et al., 2003), *Chlorella zofingiensis* (Del Campo et al., 2004) и *Chlorococcum* sp. (Masojídek et al., 2000).

Показателем реакции фотосинтетического аппарата на воздействие неблагоприятных факторов является содержание и соотношение фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) (Fu, Bell, 2003; Sudhir, Murthy, 2004; Vonshak, Torzillo, 2004; Babenko et al., 2014; Haubner et al., 2014; Liang et al., 2014).

Проведенные нами исследования показали, что при возрастании концентрации NaCl показатели содержания хлорофиллов *a* и *b* в каждом опыте были ниже контрольных (см. рис. 3, *a*, *б*), при этом содержание каротиноидов увеличивалось на 12-е сутки эксперимента (см. рис. 3, *в*). В контроле наблюдалось постепенное накопление хлорофиллов *a* и *b* на всех этапах проведения опыта (см. рис. 3, *a*, *б*), тогда как общее количество каротиноидов практически не возрастало до конца эксперимента (см. рис. 3, *в*).

Первое определение содержания фотосинтетических пигментов было проведено на 6-е сутки после внесения NaCl в среду культивирования. С повышением концентрации NaCl в среде уменьшалось количество хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов (см. рис. 3, *a*, *б*, *в*). При концентрации NaCl 0,75–1,5% содержание хлорофилла *a* уменьшалось более чем в 2 раза (см. рис. 3, *a*), хлорофилла *b* – в 1,7–1,5 раза (см. рис. 3, *б*), каротиноидов – в 1,9–2,3 раза (см. рис. 3, *в*). При этом альгокультура приобретала бледно-зеленую окраску, тогда как при концентрации соли 0,25 и 0,5% цвет культивируемой микроводоросли не отличался от контроля.

На 12-е сутки стрессового воздействия тенденция к уменьшению количества хлорофилла *a* сохранялась во всех опытах (см. рис. 3, *a*). Содержание хлорофилла *b* было незначительно ниже контроля при концентрации NaCl 0,25; 1 и 1,5%, а увеличение его отмечено при 0,5 и 0,75%-ной концентрации хлорида натрия (см. рис. 3, *б*). При сопоставлении полученных данных с параметрами роста видно, что увеличение содержания хлорофилла *b* наблюдалось при переходе культуры в стационарную фазу роста (см. рис. 1). При концентрации хлорида натрия 0,25–0,75% количество каротиноидов увеличивалось в 1,3–1,4 раза, тогда как при содержании NaCl 1 и 1,5% оно было ниже контроля (см. рис. 3, *в*). Полученные данные позволяют предположить, что между 6-ми и 12-ми сутками клетки *A. dimorphus*, подвергшиеся влиянию низких концентраций NaCl, адаптируются к действию стрессора, что отчасти происходит благодаря увеличению количества каротиноидов, которые, как известно, выполняют функции защиты

клеток от фотоокисления (Vonshak, Torzillo, 2004). При увеличении концентрации соли в среде (1–1,5%) клетки водоросли хуже справляются с воздействием стрессора, что, вероятно, связано с переизбытком ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в хлоропластах, в результате чего фотосинтез ингибируется сильнее (Sudhir, Murthy, 2004).

На 18-е сутки культивирования *A. dimorphus* в условиях солевого стресса наблюдалось увеличение количества хлорофиллов *a* и *b* по сравнению с 12-и сутками (см. рис. 3, *a*, *b*). Содержание каротиноидов возросло в 1,2–1,6 раза, а при концентрации хлорида натрия 0,75% количество каротиноидов увеличилось вдвое и достигло максимума (см. рис. 3, *в*). На этом этапе культивирования альгокультура приобретала окраску от буро-зеленой и бурой при концентрации  $\text{NaCl}$  0,25 и 0,5% до желто-оранжевой при 0,75% и янтарно-оранжевой при 1 и 1,5% хлорида натрия в культуральной среде. Такое изменение цвета культивируемой водоросли обусловлено деградацией хлорофиллов и возрастанием содержания каротиноидов.

Отмеченные изменения в содержании фотосинтетических пигментов зависели от концентрации  $\text{NaCl}$  в среде и продолжительности солевого стресса (см. таблицу). Так, с увеличением концентрации  $\text{NaCl}$  показатели соотношения хлорофиллов *a/b*, а также общего количества хлорофиллов *a + b* уменьшались на каждом временном этапе опыта (см. таблицу), что косвенно свидетельствует о снижении фотохимической активности клеток микроводоросли в зависимости от увеличения концентрации соли. *Acutodesmus dimorphus* IBASU-A 251 рассматривается как галофоб (Борисова и др., 2014), однако штамм способен к росту и накоплению биомассы в условиях низкой концентраций  $\text{NaCl}$  (0,25–0,75%) (см. рис. 1, 2).

Влияние хлорида натрия на соотношение фотосинтетических пигментов в культуре *Acutodesmus dimorphus*

Концентрация $\text{NaCl}$ , %	Продолжительность солевого стресса, сут								
	6	12	18	6	12	18	6	12	18
	хлорофилл <i>a/b</i>			хлорофилл <i>a + b</i> , мг/г сырого вещества			хлорофилл <i>a + b</i> /каротиноиды		
Контроль	2,16	2,3	1,87	0,47±0,01	0,59±0,06	0,80±0,06	2,03	2,35	2,82
0,25	1,92	1,85	1,76	0,35±0,02	0,44±0,04	0,66±0,04	2,02	1,86	1,82
0,5	1,73	1,72	1,66	0,36±0,02	0,49±0,03	0,58±0,04	1,92	1,46	1,33
0,75	1,73	1,52	1,49	0,24±0,03	0,46±0,02	0,57±0,03	1,97	1,54	1,17
1	1,61	1,48	1,32	0,25±0,02	0,45±0,04	0,54±0,02	2,07	1,73	1,25
1,5	1,54	1,36	1,22	0,25±0,03	0,33±0,03	0,35±0,02	2,11	1,64	1,23



Прекращение роста и снижение темпов образования биомассы совпадало с существенным уменьшением общего количества хлорофиллов  $a + b$ , которое наблюдалось при увеличении концентрации NaCl в среде до 1,5% (см. таблицу). В то же время концентрации NaCl 0,25–1,5% способствовали увеличению общего содержания каротиноидов, при этом величина соотношения хлорофилла  $a + b$ /каротиноиды уменьшалась. Наибольшее содержание каротиноидов (0,487 мг/г сырой биомассы) зафиксировано нами на 18-е сутки воздействия солевого стресса при концентрации 0,75% NaCl в среде. Хлорид натрия в концентрации 0,25; 0,5; 1 и 1,5% также стимулировал накопление каротиноидов, но в меньшей степени.

Влияние NaCl на синтез каротиноидов отмечено у ряда микроводорослей. Установлено, что при 30%-ной концентрации NaCl, дефиците азота и избыточном освещении происходит существенное накопление  $\beta$ -каротина в клетках водоросли *Dunaliella salina* Teod. (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 отмечено 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 приводило к уменьшению количества фотосинтетических пигментов (Del Campo et al., 2004). В условиях высокой инсоляции и 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. В первые сутки стресса в клетках *Chlorococcum* sp. накапливался лютеин, тогда как на 3-и и 4-е сутки увеличивалось содержание кантаксантина и астаксантина, а уровень лютеина существенно снижался (Masojidek 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,  $\beta$ -каротина) было незначительным (Ranga Rao et al., 2010). Внесение в среду культивирования *Scenedesmus* sp. 2% NaCl в сочетании с отходами производства лимонной кислоты приводило к полной деградации хлорофиллов и аккумуляции каротиноидов (El-Sayed, 2010).

## Выводы

Внесение в среду культивирования *Acutodesmus dimorphus* IBASU-A 251 хлорида натрия в фазу активного роста и накопления биомассы

оказывало ингибирующее действие на рост и вызывало деградацию хлорофиллов *a* и *b*. С увеличением концентрации соли и продолжительности культивирования наблюдалось постепенное увеличение содержания каротиноидов. На 18-е сутки культивирования при всех исследованных концентрациях соли зафиксирован рост количества каротиноидов. Максимальный уровень каротиноидов наблюдался в присутствии 0,75%-ного NaCl в среде культивирования.

Полученные результаты позволяют рассматривать *Acutodesmus dimorphus* IBASU-A 251 как активный продуцент каротиноидов, перспективный для последующих исследований гиперсинтеза отдельных классов каротиноидов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Балнокин Ю.В., Строганов Б.П. Солевой обмен и проблема солеустойчивости растений. В кн.: *Новые направления в физиологии растений*. М.: Наука, 1985. С. 199–213.
- Борисова О.В., Царенко П.М., Конішук М.О. *Колекція культур мікрободоростей IBASU-A*. Київ, 2014. 110 с.
- Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике*. Отв. ред. А.В. Топачевский. Киев: Наук. думка, 1975. 247 с.
- Соловченко А.Е. Физиология и адаптивное значение вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей. *Физиол. раст.* 2013. 60(1): 3–16.
- Царенко П., Борисова О., Блюм Я. Мікрободорості як об'єкт біоенергетики: види колекції IBASU-A – перспективні продуценти біомаси як джерела сировини для біопалива. *Вісн. НАН України*. 2011. 5: 49–54.
- Царенко П.М., Борисова Е.В. Коллекция культур микроводорослей IBASU-A – потенциальный ресурс биосырья для производства биодизеля. *Альгология*. 2014. 24(3): 409–412.
- Babenko L.M., Kosakivska I.V., Akimov Yu.A., Klymchuk D.O., Skaternya T.D. Effect of temperature stresses on pigment content, lipoxygenase activity and cell ultrastructure of winter wheat seedlings. *Genet. and Plant Physiol.* 2014. 4(1–2): 117–125.
- Boussiba S., Fan L., Vonshak A. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods Enzymol.* Pt A: Carotenoids. 1992. 213: 386–391.
- Cardozo K.H., Guaratini T., Barros M.P., Falcro V.R., Tonon A.P., Lopes N.P., Campos S., Torres M.A., Souza A.O., Colepicolo P., Pinto E. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2007. 146(1–2): 60–78.
- Chokshi K., Pancha I., Trivedi K., George B., Maurya R., Ghosh A., Mishra S. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. *Biores. Technol.* 2015. 180: 162–171.
- Del Campo J.A., Rodríguez H., Moreno J., Vargas M.B., Rivas J., Guerrero M.G. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. 64: 848–854.

- Doria E., Longoni P., Scibilia L., Iazzi N., Cella R., Nielsen E. Isolation and characterization of a *Scenedesmus acutus* strain to be used for bioremediation of urban wastewater. *J. Appl. Phycol.* 2012. 24: 375–383.
- Duan X., Ren G.Y., Liu L.L., Zhu W.X. Salt-induced osmotic stress for lipid overproduction in batch culture of *Chlorella vulgaris*. *Afr. J. Biotechnol.* 2012. 11(27): 7072–7078.
- El Baz F.K., Aboul-Enein A.M., El-Baroty G.S., Youssef A.M., Abdel-Baky H.H. Accumulation of antioxidant vitamins in *Dunaliella salina*. *J. Biol. Sci.* 2002. 2(4): 220–223.
- El-Sayed A.B. Carotenoids accumulation in the green alga *Scenedesmus* sp. incubated with industrial citrate waste and different induction stresses. *Natur. Sci.* 2010. 8(10): 34–40.
- Fisher M., Pick U., Zamir A. A salt-induced 60-kilodalton plasma membrane protein plays a potential role in the extreme halotolerance of the alga *Dunaliella*. *Plant Physiol.* 1994. 106(4): 1359–1365.
- Fu F.-X., Bell P.R.F. Effect of salinity on growth, pigmentation, N<sub>2</sub> fixation and alkaline phosphatase activity of cultured *Trichodesmium* sp. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 2003. 257: 69–76.
- Garcia-Gonzalez J., Sommerfeld M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *J. Appl. Phycol.* 2016. 28(2): 1051–1061.
- Goyal A. Osmoregulation in *Dunaliella*. II. Photosynthesis and starch contribute carbon for glycerol synthesis during a salt stress in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol. Biochem.* 2007. 45: 705–710.
- Gupta B., Huang B. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *Int. J. Genom.* 2014: 1–18.
- Haubner N., Sylvander P., Vuori K., Snoeijs P. Abiotic stress modified the synthesis of alphanocopherol and beta-carotene in phytoplankton species. *J. Phycol.* 2014. 50: 753–759.
- Hu Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford (UK): Black. Sci. Ltd., 2004. P. 83–93.
- Jahnke L.C., White A.L. Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *J. Plant Physiol.* 2003. 160(10): 1193–1202.
- Kaewkannetra P., Enmak P., Chiu T.Y. The effect of CO<sub>2</sub> and salinity on the cultivation of *Scenedesmus obliquus* for biodiesel production. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 2012. 17: 591–597.
- Kalita N., Baruah G., Dev Goswami R.C., Talukdar J., Kalita M.C. *Ankistrodesmus falcatus*: A promising candidate for lipid production, its biochemical analysis and strategies to enhance lipid productivity. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* 2011. 1(4): 148–157.
- Kobayashi M., Kakizono T., Nagai S. Astaxanthin production by a green alga *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *J. Ferment. Bioeng.* 1991. 71(5): 335–339.
- Kobayashi M., Kurimura Y., Tsuji Y. Light-independent astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnol. Lett.* 1997. 19(6): 507–509.

- 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. Increased lipid productivity of *Acutodesmus dimorphus* using optimized pulsed electric field. *J. Appl. Phycol.* 2016. 28(2): 931–938.
- Liang Y., Cao C., Tian C., Sun M. Changes in cell density and chlorophyll fluorescence with salinity stress in two *Isochrysis galbana* strains (*Prymnesiophyceae*). *Algal. Stud.*, 2014. 145–146: 81–98.
- Lu N., Wei D., Chen F., Yang S.-T. Lipidomic profiling and discovery of lipid biomarkers in snow alga *Chlamydomonas nivalis* under salt stress. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2012. 114: 253–265.
- Masojádek J., Torzillo G., Kopecký J., Koblížek M., Nidiaci L., Komenda J., Lukavská A., Sacchi A. Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress. *J. Appl. Phycol.* 2000. 12: 417–426.
- Mata T.M., Melo A.C., Simxes M., Caetano N.S. Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Biores. Technol.* 2012. 107: 151–158.
- Mishra A., Mandoli A., Jha B. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008. 35: 1093–1101.
- Nishino H., Murakoshi M., Tokuda H., Satomi Y. Cancer prevention by carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 2009. 483: 165–168.
- Pelah D., Sintov A., Cohen E. The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2004. 20: 483–486.
- Rafiqul I.M., Hassan A., Sulebele G., Orosco C.A., Roustaian P., Jalal K.C.A. Salt stress culture of blue-green algae *Spirulina fusiformis*. *Pak. J. Biol. Sci.* 2003. 6: 648–650.
- Ranga Rao A., Dayananda C., Sarada R., Shamala T.R., Ravishankar G.A. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Biores. Technol.* 2007. 98: 560–564.
- Ranga Rao A., Sarada R., Ravishankar G.A. Enhancement of carotenoids in green alga *Botryococcus braunii* in various autotrophic media under stress conditions. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.* 2010. 4(2): 87–92.
- Richmond A. Cell response to environmental factors. In: *CRC Handbook of Microalgal Mass culture*. Boca Raton (Florida): CRC Press Inc., 1986. P. 89–95.
- Romanenko E.A., Kosakovskaya I.V., Romanenko P.A. Phytohormones of Microalgae: Biological Role and Involvement in the Regulation of Physiological Processes. Pt I. Auxins, Abscisic Acid, Ethylene. *Int. J. on Algae.* 2015. 17(3): 275–289.
- Romanenko K.O., Kosakovskaya I.V., Romanenko P.O. Phytohormones of Microalgae: Biological Role and Involvement in the Regulation of Physiological Processes. *Int. J. on Algae.* 2016. 18(2): 179–201.
- Ruangsomboon S. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga *Botryococcus braunii* KMITL 2. *Biores. Technol.* 2012. 109: 261–265.
- Sadka A., Himmelhoch S., Zamir A. A 150 kilodalton cell surface protein is induced by salt in the halotolerant green alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 1991. 95(3): 822–831.

- Sánchez J.F., Fernández J.M., Ación F.G., Rueda A., Pérez-Parra J., Molina E. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Proc. Biochem.* 2008. 43: 398–405.
- Sibi G., Shetty V., Mokashi K. Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels. A review. *J. Energy Inst.* 2015. 89(3): 330–334.
- Sudhir P., Murthy S.D.S. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica.* 2004. 42(4): 481–486.
- Takagi M., Karseno, Yoshida T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.* 2006. 101(3): 223–226.
- Vonshak A., Torzillo G. Environmental Stress Physiology. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Black. Sci., 2004. P. 57–82.
- Wellburn A. 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.* 1994. 144: 307–313.

Поступила 12 января 2017 г.

Подписала в печать Е.К. Золотарева

## REFERENCES

- Babenko L.M., Kosakivska I.V., Akimov Yu.A., Klymchuk D.O., Skaternya T.D. *Genet. and Plant Physiol.* 2014. 4(1–2): 117–125.
- Balnokin Yu.V., Stroganov B.P. In: *Novye napravleniya v fiziologii rasteniy [New directions in plant physiology]*. Moscow: Nauka Press, 1985. P. 199–213.
- Borysova O.V., Tsarenko P.M., Konishchuk M.O. *Kolektsiya kultur mikrovodorostey IBASU-A [Microalgae cultures collection IBASU-A]*. Kyiv, 2014. 110 p.
- Boussiba S., Fan L., Vonshak A. *Methods Enzymol.* Pt A: *Carotenoids*. 1992. 213: 386–391.
- Cardozo K.H., Guaratini T., Barros M.P., Falcro V.R., Tonon A.P., Lopes N.P., Campos S., Torres M.A., Souza A.O., Colepicolo P., Pinto E. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2007. 146(1–2): 60–78.
- Chokshi K., Pancha I., Trivedi K., George B., Maurya R., Ghosh A., Mishra S. *Biores. Technol.* 2015. 180: 162–171.
- Del Campo J.A., Rodríguez H., Moreno J., Vargas M.B., Rivas J., Guerrero M.G. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. 64: 848–854.
- Doria E., Longoni P., Scibilia L., Iazzi N., Cella R. *J. Appl. Phycol.* 2012. 24: 375–383.
- Duan X., Ren G.Y., Liu L.L., Zhu W.X. *Afr. J. Biotechnol.* 2012. 11(27): 7072–7078.
- El Baz F.K., Aboul-Enein A.M., El-Baroty G.S., Youssef A.M., Abdel-Baky H.H. *J. Biol. Sci.* 2002. 2(4): 220–223.
- El-Sayed A.B. *Nature Sci.* 2010. 8(10): 34–40.
- Fisher M., Pick U., Zamir A. *Plant Physiol.* 1994. 106(4): 1359–1365.
- Fu F.-X., Bell P.R.F. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 2003. 257: 69–76.
- Garcia-Gonzalez J., Sommerfeld M. *J. Appl. Phycol.* 2016. 28(2): 1051–1061.
- Goyal A. *Plant Physiol. Biochem.* 2007. 45: 705–710.
- Gupta B., Huang B. *Int. J. Genom.* 2014: 1–18.

- Haubner N., Sylvander P., Vuori K., Snoeijis P. *J. Phycol.* 2014. 50: 753–759.
- Hu Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford (UK): Black. Sci. Ltd., 2004. P. 83–93.
- Jahnke L.C., White A.L. *J. Plant Physiol.* 2003. 160(10): 1193–1202.
- Kaewkannetra P., Enmak P., Chiu T.Y. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 2012. 17: 591–597.
- Kalita N., Baruah G., Dev Goswami R.C., Talukdar J., Kalita M.C. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* 2011. 1(4): 148–157.
- Kobayashi M., Kakizono T., Nagai S. *J. Ferment. Bioeng.* 1991. 71(5): 335–339.
- Kobayashi M., Kurimura Y., Tsuji Y. *Biotechnol. Lett.* 1997. 19(6): 507–509.
- 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. *J. Appl. Phycol.* 2016. 28(2): 931–938.
- Liang Y., Cao C., Tian C., Sun M. *Algol. Stud.* 2014. 145–146: 81–98.
- Lu N., Wei D., Chen F., Yang S.-T. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2012. 114: 253–265.
- Masojídek J., Torzillo G., Kopecký J., Koblížek M., Nidiaci L., Komenda J., Lukavská A., Sacchi A. *J. Appl. Phycol.* 2000. 12: 417–426.
- Mata T.M., Melo A.C., Simxes M., Caetano N.S. *Biores. Technol.* 2012. 107: 151–158.
- Metody fiziologo-biokhimičeskogo isledovaniya vodorosley v gidrobiologičeskoy praktike.* Red. A.V. Topachevskiy [Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice. Ed. A.V. Topachevskiy]. Kiev: Nauk. Dumka Press, 1975. 247 p.
- Mishra A., Mandoli A., Jha B. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008. 35: 1093–1101.
- Nishino H., Murakoshi M., Tokuda H., Satomi Y. *Arch. Biochem. Biophys.* 2009. 483: 165–168.
- Pelah D., Sintov A., Cohen E. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2004. 20: 483–486.
- Rafiqul I.M., Hassan A., Sulebele G., Orosco C.A., Roustaian P., Jalal K.C.A. *Pak. J. Biol. Sci.* 2003. 6: 648–650.
- Ranga Rao A., Dayananda C., Sarada R., Shamala T.R., Ravishankar G.A. *Biores. Technol.* 2007. 98: 560–564.
- Ranga Rao A., Sarada R., Ravishankar G.A. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.* 2010. 4(2): 87–92.
- Richmond A. Cell response to environmental factors. In: *CRC Handbook of Microalgal Mass culture*. Florida: CRC Press Inc., 1986. P. 89–95.
- Romanenko E.A., Kosakovskaya I.V., Romanenko P.A. *Int. J. on Algae.* 2015. 17(3): 275–289.
- Romanenko K.O., Kosakovskaya I.V., Romanenko P.O. *Int. J. on Algae.* 2016. 18(2): 179–201.
- Ruangsomboon S. *Biores. Technol.* 2012. 109: 261–265.
- Sadka A., Himmelhoch S., Zamir A. *Plant Physiol.* 1991. 95(3): 822–831.
- Sánchez J.F., Fernández J.M., Acien F.G., Rueda A., Pérez-Parra J., Molina E. *Proc. Biochem.* 2008. 43: 398–405.
- Sibi G., Shetty V. *J. Energy Inst.* 2015. 89(3): 330–334.
- Solovchenko A.E. *Fiziol. Rast.* 2013. 60(1): 3–16.
- Sudhir P., Murthy S.D.S. *Photosynthetica.* 2004. 42(4): 481–486.
- Takagi M., Karseno, Yoshida T.J. *Biosci. Bioeng.* 2006. 101(3): 223–226.
- Tsarenko P., Borisova O., Blyum Ya. *Visnyk NAN Ukrainy.* 2011. 5: 49–54.
- Tsarenko P.M., Borisova E.V. *Algologia.* 2014. 24(3): 409–412.

Vonshak A., Torzillo G. Environmental Stress Physiology. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford (UK): Black. Sci., 2004. P. 57–82.

Wellburn A. *J. Plant Physiol.* 1994. 144: 307–313.

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2017, 27(3): 231–245

doi: 10.15407/alg27.03.231

*Romanenko K.O.<sup>1</sup>, Romanenko P.O.<sup>2</sup>, Babenko L.M.<sup>1</sup>, Kosakivska I.V.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>N.G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine,  
2, Tereshchenkovskaya Str., Kiev 01004, Ukraine

<sup>2</sup>Department of Plant Biology, Institute of Biology and Medicine,  
Taras Shevchenko National University of Kiev,  
64/13, Vladimirskaya Str., Kiev 01004, Ukraine

#### SALT STRESS EFFECTS ON GROWTH AND PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS' CONTENT IN ALGOCULTURE OF *ACUTODESMUS DIMORPHUS* (CHLOROPHYTA)

In this work we analyzed the effect of salt stress on cell number growth, biomass accumulation, and photosynthetic pigment content in algoculture of freshwater green alga *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) P.M. Tsarenko. It was shown that the introduction of sodium chloride to a culture medium retards microalga growth and diminishes the quantity of chlorophylls *a* and *b*. Increases in salt concentrations and the duration of cultivation caused an increase in the amount of carotenoids. An increase in the carotenoid amount was observed on day 18 of cultivation for all applied salt concentrations, and maximum values were identified at 0.75% of NaCl in the culture medium.

**Key words:** *Acutodesmus dimorphus*, salt stress, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoids