

ISSN 1029-8940 (Print)
 ISSN 2524-230X (Online)
 УДК 581.1
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-3-263-275>

Поступила в редакцию 10.05.2018
 Received 10.05.2018

**Н. Г. Аверина, Н. В. Козел, Р. А. Щербаков, М. С. Радюк,
 Е. Е. Мананкина, Р. Г. Гончарик, Н. В. Шалыго**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ NaCl НА ПРОДУКТИВНОСТЬ ВОДОРОСЛИ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* И СОДЕРЖАНИЕ В ЕЕ КЛЕТКАХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ, АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АСТАКСАНТИНА

Аннотация. Изучено влияние NaCl (25, 50, 100, 200 и 300 мМ) на продуктивность *Haematococcus pluvialis* (штамм IBCE H-17) по таким показателям, как сухая биомасса, содержание белка, фотосинтетических пигментов, а также астаксантина и активных форм кислорода (АФК). Установлено, что NaCl в низких и средних концентрациях (25, 50 и 100 мМ) в среде культивирования стимулировал накопление сухой биомассы в течение первых 7 сут выращивания в среднем в 1,3 раза по сравнению с контролем (стандартной средой Рудика). Через 12 сут инкубации стимуляция составила в среднем 33 % при использовании 25 и 50 мМ соли. Содержание белка в расчете на сухой вес падало, составляя в среднем 70 % от контроля на 7-е сутки инкубации при использовании 50–300 мМ соли и 55 % на 12-е сутки при концентрации соли 100–300 мМ. При выращивании водоросли в течение 7 сут на растворах, содержащих NaCl, падало и общее содержание фотосинтетических пигментов – хлорофиллов (Хл) *a* и *b*, а также каротиноидов – неоксантина, виолаксантина, лютеина и β-каротина. Хл *b* оказался более устойчивым к засолению по сравнению с Хл *a*. Из всех пигментов наибольшее отрицательное воздействие NaCl оказывал на β-каротин. Стрессовые условия, создаваемые NaCl, приводили к генерации АФК. В частности, через 7 сут культивирования общее содержание АФК в варианте «NaCl-100» в 1,7 раза превышало таковое в контрольной культуре и в 3,0 раза было выше контроля в 12-суточной культуре. Отмечено существенное положительное влияние засоления на содержание астаксантина. Максимальный эффект наблюдали при использовании 100 мМ NaCl. Через 7 сут инкубации содержание астаксантина превышало контрольные показатели в 2,8 раза, а через 12 сут – в 20,5 раза. Количество клеток водоросли через 7 сут инкубации в варианте «NaCl-100» уменьшалось в среднем на 33 %, в то время как диаметр клеток возрастал на 29 %.

Ключевые слова: *Haematococcus pluvialis*, NaCl, сухой вес, количество и размер клеток, белок, фотосинтетические пигменты, реактивные формы кислорода

Для цитирования: Влияние NaCl на продуктивность водоросли *Haematococcus pluvialis* и содержание в ее клетках фотосинтетических пигментов, активных форм кислорода и астаксантина / Н. Г. Аверина [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2018. – Т. 63, № 3. – С. 263–275. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-3-263-275>

**N. G. Averina, N. V. Kozel, R. A. Sherbakov, M. S. Radyuk,
 E. E. Manankina, R. G. Goncharik, N. V. Shalygo**

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

EFFECT OF NaCl ON *HYEMATOCOCCUS PLUVIALIS* PRODUCTIVITY AND CONTENT IN ITS CELLS OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS, ACTIVE OXYGEN FORMS AND ASTAXANTINE

Abstract. The effect of NaCl (25, 50, 100, 200 and 300 mM) on the productivity of the *Haematococcus pluvialis* strain IBCE H-17 on such parameters as dry biomass, content of protein, photosynthetic pigments, as well as astaxanthin and reactive oxygen species (ROS) was studied. It was found that NaCl at low and medium concentrations (25, 50 and 100 mM) in the culture medium stimulated the accumulation of dry biomass during the first 7 days of cultivation on average 1.3 times as compared to the control (Rudik's standard medium). After 12 days of incubation, stimulation averaged 33 % using 25 and 50 mM salt. The protein content on a dry weight basis fell, averaging 70 % of the control on the 7th day of incubation with 50–300 mM salt and 55 % on the 12th day for a salt concentration of 100–300 mM. When the algae was grown for 7 days on solutions containing NaCl, the total content of photosynthetic pigments – chlorophylls (Chl) *a* and *b* as well as the carotenoids neoxanthine, violaxanthin, lutein and β-carotene decreased. Chl *b* was more resistant to salinity than Chl *a*. Of all the pigments, NaCl exerts the greatest negative effect on β-carotene. Stress conditions created by NaCl led to the generation of ROS, in particular, after 7 days of cultivation the total ROS content in the “NaCl-100” variant was 1.7 times higher than that in the control culture and 3.0 times higher than the control in the 12-day culture. A significant positive effect of salinity on the content of astaxanthin was noted. The maximum effect was observed with 100 mM NaCl. After 7 days of incubation, the content of astaxanthin exceeded the control indices by 2.8 times, and after 12 days – by 20.5 times. The number of algae cells after 7 days of incubation in the “NaCl-100” variant decreased on average by 33 %, while the cell diameter increased by 29 %.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, NaCl, dry weight, number and size of cells, protein, photosynthetic pigments, reactive forms of oxygen

For citation: Averina N. G., Kozel N. V., Sherbakov R. A., Radyuk M. S., Manankina E. E., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Effect of NaCl on *Haematococcus pluvialis* productivity and content in its cells of photosynthetic pigments, active oxygen forms and astaxanthine. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 263–275 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-3-263-275>

Введение. В стрессовых условиях, таких, например, как воздействие постоянного или импульсного света высокой интенсивности либо высоких температур, добавление в культуральную среду NaCl, истощение азота, железа или фосфора в среде выращивания ряда водорослей, индуцируется накопление в клетках *Scenedesmus*, *Chlorella*, а также *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) кетокаротиноида астаксантина [1–9]. Астаксантин – красный пигмент, широко используемый в сельском хозяйстве, пищевой, фармакологической промышленности, а также в косметологии благодаря его чрезвычайно высокой антиоксидантной активности, которая в определенных условиях значительно превышает таковую β-каротина и витамина Е [10, 11]. Наряду с этим астаксантин нашел применение и в медицине как препарат, обладающий нейропротекторными и иммуномодулирующими свойствами [12]. В клетках *H. pluvialis* содержание астаксантина составляет от 2 до 5 % от сухой массы водоросли [13, 14]. Химически синтезированный искусственный астаксантин, представляющий смесь из трех стереоизомеров, отличается от натурального структурно и обладает гораздо меньшей биоактивностью, чем натуральный пигмент [15, 16]. В связи с этим интерес к *H. pluvialis* в последние годы значительно возрос, что связано с его промышленным производством, а также с поиском способов увеличения общей продуктивности и выхода астаксантина. Штамм IBCE Н-17 *H. pluvialis* из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси не был изучен на предмет индукции накопления астаксантина в условиях избыточного засоления среды.

Цель данной работы – изучение возможности применения NaCl (25, 50, 100, 200 и 300 мМ) при выращивании водоросли *H. pluvialis* (штамм IBCE Н-17) с целью повышения выхода астаксантина. Параллельно оценивали продуктивность гематококка по таким показателям, как сухой вес, количество и размер клеток, содержание белка, фотосинтетических пигментов – хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов, а также общее содержание активных форм кислорода (АФК).

Объекты и методы исследования. Объектом исследований служила альгологически чистая культура одноклеточной зеленой жгутиковой водоросли *H. pluvialis*, штамм IBCE Н-17, из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [17]. Клетки гематококка эллипсоидные или удлинненно-яйцевидные, с гладкой оболочкой и двумя жгутиками, взятые из альгологической коллекции, стерильно пересевали на чашки Петри с агаризованной питательной средой ВВМ, подращивали на свету в течение 5–7 сут при температуре 23 ± 2 °С, после чего смывали с чашек Петри стерильной средой Рудика и выращивали в накопительном режиме при освещении светом люминесцентных ламп Philips TD-36/765, освещенности 15 мкмоль квантов/м²/с и режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре в световом периоде 23 ± 2 °С, как описано в работе [16]. Через 4 сут выращивания суспензию гематококка, находящуюся на стадии активного роста, содержащую около 80 % подвижных клеток, использовали в экспериментах. На этой стадии в суспензию водорослей с оптической плотностью 0,3–0,4 при 560 нм добавляли NaCl таким образом, чтобы конечная концентрация соли в суспензии составляла 0 (контроль), 25, 50, 100, 200 и 300 мМ. В этих условиях водоросль культивировали в течение 12 сут, периодически подвергая ее анализу.

Количество клеток в культуре водоросли оценивали при помощи камеры Горяева и построения калибровочной кривой, как это описано в работе [18]. Диаметр клеток гематококка определяли с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 с камерой Nikon DS-Fi2, используя программное обеспечение NIS-Elements Advanced Solutions v. 4.40 (Nikon, Япония). При этом проводили предварительную калибровку.

Продуктивность *H. pluvialis* определяли по изменению сухой биомассы, которую оценивали по поглощению и светорассеянию суспензий водоросли в красной и инфракрасной областях

спектра при 680 и 750 нм на спектрофотометре Solar PB-2201 (Беларусь). Поглощение при 680 нм соответствует максимуму поглощения Хл, а поглощение при 750 нм определяется в основном светорассеянием на клетках гематококка. Для количественного расчета сухой биомассы *H. pluvialis* использовали формулу, описанную Tomohisa Katsuda с соавт. в работе [8].

Для определения качественного и количественного состава фотосинтетических пигментов в клетках водоросли использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Содержание хлорофиллов (Хл) и каротиноидов в образцах оценивали с помощью хроматографа высокого давления Shimadzu Prominence LC 20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey-Nagel (Германия). Экстракцию, разделение и идентификацию пигментов осуществляли, как описано в работе [18]. Содержание Хл *a*, *b* и каротиноидов определяли в мкг/г сухой массы либо на 1 л суспензии.

Для определения белка использовали промытую и осажденную путем центрифугирования сырую биомассу *H. pluvialis* (20–100 мг). Экстракцию белка осуществляли, как описано в работе [18], а его содержание (в мкг/г сухого веса) оценивали, используя метод Бредфорда [19].

Для определения содержания АФК промытую и осажденную путем центрифугирования (центрифуга Sigma 1-15K) сырую биомассу *H. pluvialis* (100 мг) растирали в жидком азоте и экстрагировали 1 мл 10 мМ трис-НСl, рН 7,2, затем центрифугировали 20 мин при 12 000 г на холоду. К 100 мкл супернатанта добавляли 900 мкл 10 мМ трис-НСl, рН 7,2, и 10 мкл 1 мМ раствора диацетата дихлорфлуоресцеина в диметилсульфоксиде. Пробы инкубировали в темноте в течение 10 мин, после чего регистрировали интенсивность флуоресценции при 524 нм и возбуждающем свете при 496 нм на спектрофлуориметре Solar PB-2201. По калибровочной кривой определяли содержание АФК в образцах, как описано в работе [20].

Количество астаксантина в клетках гематококка определяли методом ВЭЖХ с помощью хроматографа высокого давления Shimadzu Prominence LC 20. Для этого клетки гематококка осаждали на центрифуге при 12 000 г 10 мин. Осадок ресуспендировали в 4 Н НСl, нагревали суспензию при 70 °С в течение 5 мин, после чего ее центрифугировали при той же скорости и дважды промывали осадок 2 мл дистиллированной воды. После каждой промывки суспензию центрифугировали при 12 000 г в течение 10 мин. Промытый осадок ресуспендировали в 0,5 мл метанола, экстрагировали пигменты при встряхивании 30 мин на шейкере и центрифугировали при 12 000 г в течение 10 мин. Процедуру экстрагирования пигментов в 0,5 мл метанола повторяли еще раз. К 1,0 мл суммарного экстракта добавляли 20 мкл 1 М КОН и оставляли в темноте на 6 ч при комнатной температуре. Полученный экстракт использовали для хроматографии. Перед хроматографией супернатант еще раз центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 г. Далее в вials для хроматографии вносили по 0,5 мл супернатанта и помещали их в камеру хроматографа. Объем инъекции – 20 мкл. Для разделения пигментов в колонке использовали растворы А (90 %-ный ацетонитрил, 9,9 %-ная дистиллированная вода и 0,1 %-ный триэтиламин) и В (100 %-ный этилацетат) с потоком 0,5 мл/мин. Пигменты регистрировали детектором с диодной матрицей по спектрам поглощения в диапазоне от 200 до 800 нм. Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 475 нм. Площади пиков хроматограммы использовали для количественного определения пигментов [21].

В ходе обработки экспериментальных данных вычисляли среднее, стандартное отклонение среднего, достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента для принятого уровня значимости ($p = 0,05$) и данного числа степеней свободы. Представлены данные 6 опытов в двукратной биологической повторности. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ Excel 2016, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований [22].

Результаты и их обсуждение. Засоление среды выращивания низкими и средними концентрациями NaCl (25, 50 и 100 мМ) стимулировало накопление сухой биомассы в течение первых 7 сут выращивания в среднем в 1,3 раза по сравнению с контролем (рис. 1). Через 12 сут инкубации стимуляция составила в среднем 33 % при использовании 25 и 50 мМ соли. На рис. 2 представлены результаты индивидуального опыта, согласно которым при использовании 25, 50 и 100 мМ NaCl сухой вес клеток возрос в среднем в 1,8 раза по сравнению с контрольной культурой,

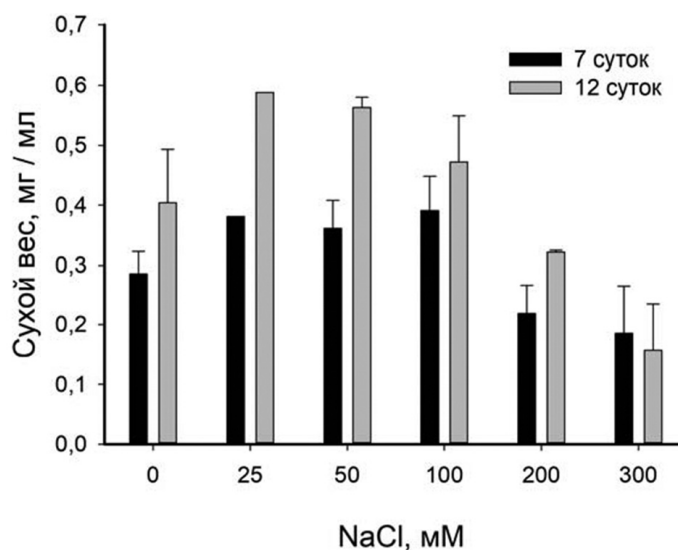


Рис. 1. Изменение сухого веса клеток водоросли *H. pluvialis* контрольной и опытных (NaCl 25, 50, 100, 200 и 300 mM) культур, выращиваемых в течение 7 и 12 сут на среде Рудика

Fig. 1. The change in the dry weight of *H. pluvialis* algae cells in the control and experimental (NaCl 25, 50, 100, 200 and 300 mM) cultures grown for 7 and 12 days on Rudik's medium

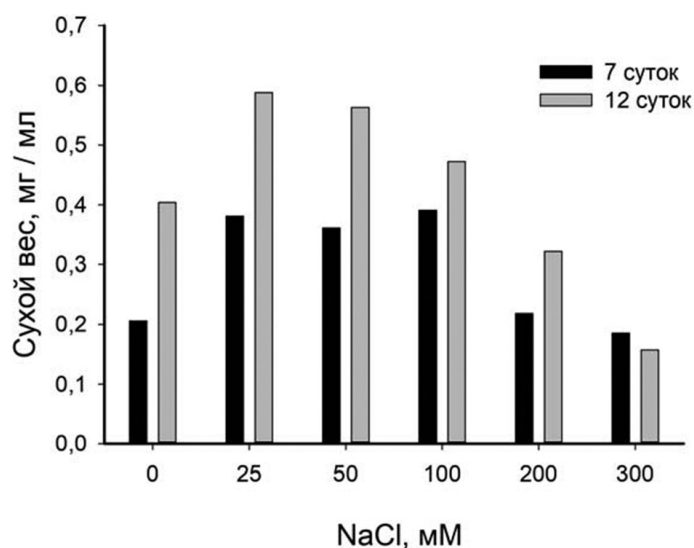


Рис. 2. Изменение сухого веса клеток водоросли *H. pluvialis* контрольной и опытных (NaCl 25, 50, 100, 200 и 300 mM) культур, выращиваемых в течение 7 и 12 сут на среде Рудика (результаты индивидуального опыта)

Fig. 2. Change in the dry weight of *H. pluvialis* algae cells in control and experimental (NaCl 25, 50, 100, 200 and 300 mM) cultures grown for 7 and 12 days on Rudik's medium (the results of individual experience are presented)

выращиваемой в течение 7 сут на среде Рудика без добавления соли. Через 12 сут выращивания положительный эффект действия соли составил 34 %. На рис. 1, 2 также показано, что возрастание концентрации соли до 200 и 300 mM приводило к резкому снижению сухой биомассы водоросли. Так, через 7 сут культивирования при использовании 300 mM NaCl сухой вес культуры клеток оставался практически на уровне контрольных значений (рис. 1, 2). Через 12 сут выращивания величина сухого веса в этом варианте составила в среднем 53 % от контроля.

При выращивании водоросли в течение 7 сут на растворах, содержащих NaCl, падало и общее содержание фотосинтетических пигментов – Хл *a* и *b*, а также каротиноидов (рис. 3, 4). Ингибирование наблюдали уже при использовании 25 mM соли, и в случае Хл оно практически мало зависело от концентрации NaCl. Так, для Хл *b* при использовании 25, 50, 100, 200 и 300 mM соли содержание пигмента составило 69, 62, 77, 66 и 63 % от контроля, для Хл *a* наблюдалась

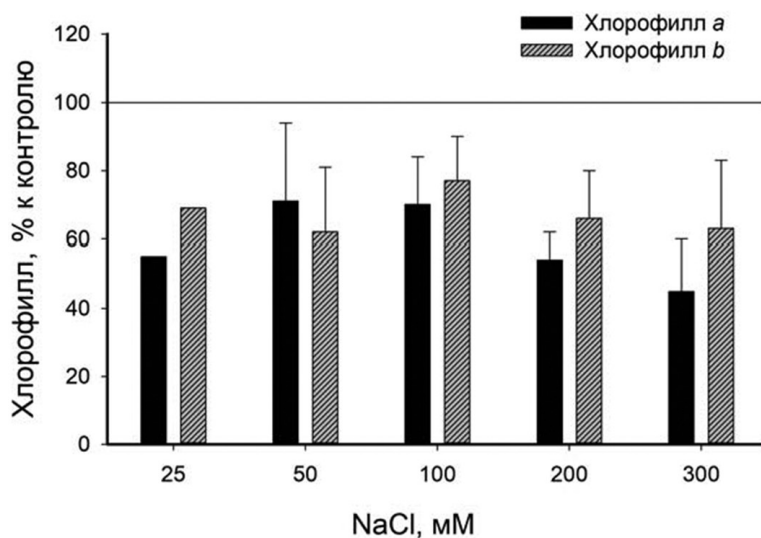


Рис. 3. Влияние NaCl на содержание Хл в клетках водоросли *H. pluvialis* контрольной и опытных (NaCl 25, 50, 100, 200 и 300 mM) культур, выращиваемых в течение 7 сут на среде Рудика
 Fig. 3. The effect of NaCl on the content of Chl in the cells of *H. pluvialis* algae of control and experimental (NaCl 25, 50, 100, 200 and 300 mM) cultures grown for 7 days on Rudik's medium

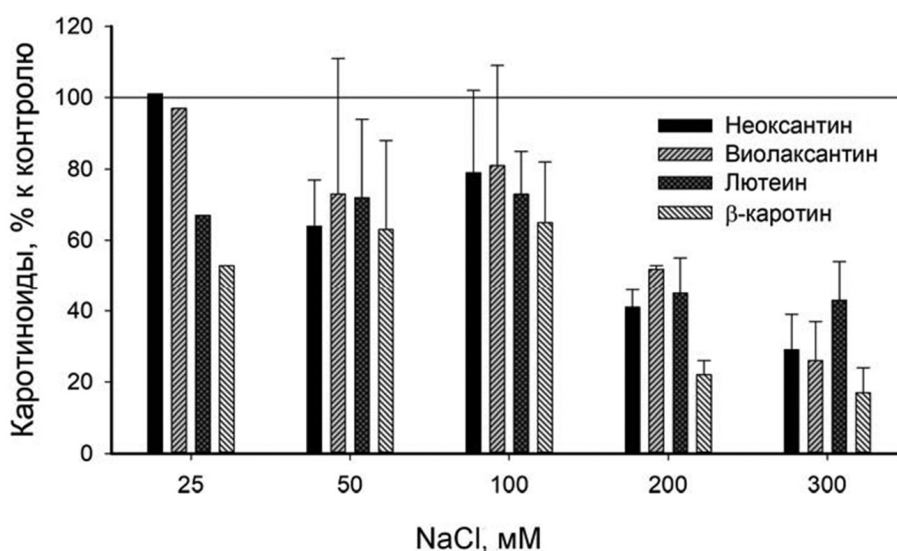


Рис. 4. Влияние NaCl на содержание каротиноидов в клетках водоросли *H. pluvialis* контрольной и опытных (NaCl 25, 50, 100, 200 и 300 mM) культур, выращиваемых в течение 7 сут на среде Рудика.
 Линией отмечено содержание пигментов в контрольной культуре, принятое за 100 %
 Fig. 4. Effect of NaCl on the content of carotenoids in *H. pluvialis* algae cells of control and experimental (NaCl 25, 50, 100, 200 and 300 mM) cultures grown for 7 days on Rudik's medium.
 The line corresponds to the pigment content in the control culture taken as 100 %

такая же тенденция. Следует отметить, что Хл *b* оказался более устойчивым к засолению по сравнению с Хл *a* (см. рис. 3). В контрольной культуре перед началом обработки NaCl были идентифицированы первичные каротиноиды – ксантофиллы: неоксантин (240 ± 70 мкг/л суспензии), виолаксантин (140 ± 43 мкг/л суспензии), лютеин (1345 ± 302 мкг/л суспензии), а также β-каротин (550 ± 119 мкг/л суспензии) с преобладанием двух последних каротиноидов. Максимальное ингибирующее действие на образование каротиноидов оказывало добавление 200 и 300 mM соли. Из всех каротиноидов наибольшее отрицательное воздействие засоление оказывало на β-каротин (рис. 4), содержание которого при использовании 200 и 300 mM соли через 7 сут культивирования составляло лишь 22 ± 4 и 17 ± 7 % соответственно от исходного контроля.

При использовании 25 мМ соли содержание белка в клетках водоросли, выращиваемой в течение 7 сут, составляло 0,538 мг/мг сухого веса и практически не отличалось от контроля (0,516 мг/мг сухого веса). Дальнейшее повышение концентрации NaCl до 50, 100, 200 и 300 мМ снижало содержание белка в среднем на 30 % независимо от используемой концентрации соли – 0,375; 0,316; 0,409; 0,356 мг/мг сухого веса соответственно (в среднем $0,364 \pm 0,019$ мг/мг сухого веса). Через 12 сут инкубации содержание белка снижалось как в контроле ($0,127 \pm 0,005$ мг/мг сухого веса), так и в опытных вариантах. При использовании 25 и 50 мМ соли содержание белка в клетках водоросли составило в среднем 84 % от контроля, а при добавлении 100, 200 и 300 мМ NaCl – в среднем 55 %.

Оценка содержания в клетках гематококка астаксантина, относящегося к вторичным каротиноидам, показала, что его накопление стимулировалось при всех изученных концентрациях соли в среде выращивания (рис. 5). Через 7 сут выращивания максимальное содержание астаксантина наблюдалось в варианте «NaCl-100» – 2,8 относительных единиц по сравнению с контролем, принятым за 1. Через 12 сут инкубации стимуляция в этом варианте достигла величины 20,5 единиц по сравнению с исходным контролем. В одном из опытов при использовании 100 мМ соли содержание астаксантина в 7- и 12-суточной культурах клеток составило 3,0 и 30,0 единиц соответственно по отношению к контролю, принятому в 7-суточной культуре за 1. Содержание астаксантина в вариантах «NaCl-200» и «NaCl-300» всегда было ниже, чем в варианте «NaCl-100», но значительно выше, чем в контроле (рис. 5).

Поскольку клетки гематококка начинали накапливать астаксантин в условиях стресса, проведена оценка общего содержания АФК в варианте с использованием 100 мМ соли (рис. 6). После 7 сут выращивания содержание АФК в варианте с добавлением соли в 1,7 раза превышало такое в контрольной культуре (рис. 6) и в 3,0 раза было выше контроля в 12-суточной культуре.

Далее было изучено влияние 100 мМ NaCl на содержание клеток *H. pluvialis* и их диаметр в разные периоды культивирования водоросли. Количественная оценка содержания клеток гематококка контрольных и опытных вариантов приведена в таблице. Оценка содержания клеток в 7-суточной контрольной культуре и выращиваемой на среде с добавлением 100 мМ NaCl показала значительное уменьшение (на 33 %) количества клеток в вариантах с избыточным засолением (см. таблицу). При этом размеры клеток в вариантах с использованием NaCl существенно возрастали, составляя в среднем 129 % от контроля (см. таблицу, рис. 7).

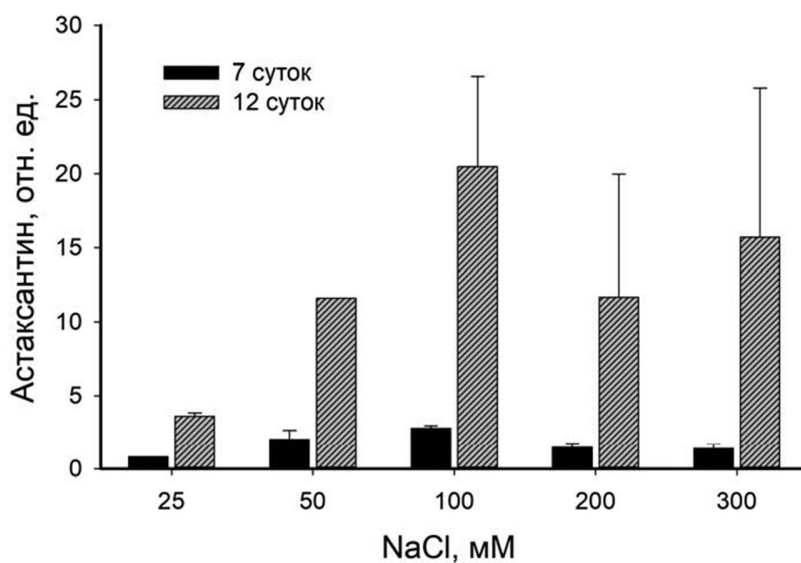


Рис. 5. Влияние NaCl на содержание астаксантина в клетках водоросли *H. pluvialis* опытных (NaCl 25, 50, 100, 200 и 300 мМ) культур, выращиваемых в течение 7 сут на среде Рудика

Fig. 5. The effect of NaCl on the content of astaxanthin in the cells of *H. pluvialis* algae of experimental (NaCl 25, 50, 100, 200 and 300 mM) cultures grown for 7 days on Rudik's medium

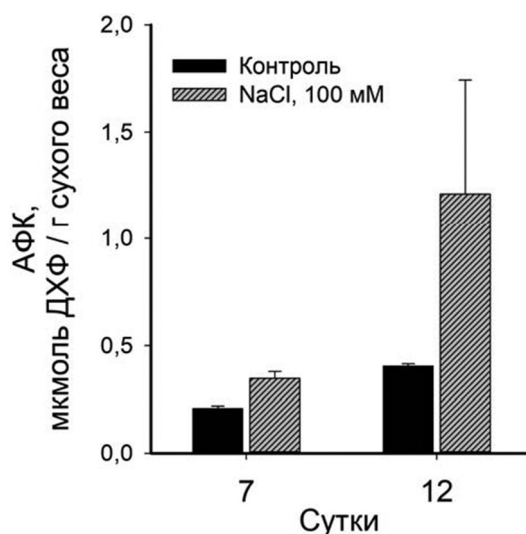


Рис. 6. Содержание АФК в клетках водоросли *H. pluvialis* контрольной и опытной (NaCl 100 мМ) культур, выращиваемых в течение 7 и 12 сут на среде Рудика

Fig. 6. The content of ROS in the cells of *H. pluvialis* algae by control and experimental (NaCl 100 mM) cultures grown for 7 and 12 days on Rudik's medium

Влияние NaCl (100 мМ) на диаметр и количество клеток водоросли *H. pluvialis*, выращиваемой в течение 7–25 сут, в 1 мл суспензии

The effect of NaCl (100 mM) on the diameter and number of *H. pluvialis* algae cells grown for 7 to 25 days per 1 ml of the suspension

Время инкубации	Вариант опыта	К-во клеток, тыс. кл/мл	Диаметр клеток	
			мкм	%
7 сут <i>опыт 1</i>	Контроль	89	15,00	100
	NaCl 100 мМ	56	19,00	127
<i>опыт 2</i>	Контроль	115	14,27	100
	NaCl 100 мМ	106	22,10	155
<i>опыт 3</i>	Контроль	109	18,34	100
	NaCl 100 мМ	49	19,19	105
25 сут	Контроль	114*	22,57	100
	NaCl 100 мМ	62*	33,49	148
12 сут <i>опыт 4</i>	Контроль	157	17,86	100
	NaCl 100 мМ	146	21,05	118

Примечание. * – количество клеток на 12-е сутки.

Таким образом, в стрессовых условиях, создаваемых избыточным содержанием в среде культивирования NaCl, клетки гематококка начинали накапливать астаксантин (см. рис. 5) для защиты от возросшего уровня внутриклеточного окислительного стресса, что выражалось в значительном увеличении по сравнению с контролем общего содержания АФК (рис. 6). Максимальное количество астаксантина накапливалось при использовании 100 мМ соли, что согласуется с результатами работы, в которой использовали штамм гематококка Flotow 34/7 [23]. Вместе с тем при такой концентрации соли и используемой освещенности наблюдали гибель в среднем 30 % клеток в течение 7–12 сут (см. таблицу). В стрессовых условиях накопления астаксантина гибель клеток гематококка отмечена в ряде работ, в которых использовали такие стрессоры, как свет высокой интенсивности [4, 24], NaCl и KCl [1, 5, 23, 24], дефицит азота, фосфора, железа, серы [1, 4, 9, 23, 24]. Например, около 50 % клеток гематококка погибли при использовании 103 мМ [23] и 138 мМ NaCl [1].

Выявленное нами увеличение размера клеток, накапливающих астаксантин (см. таблицу, рис. 7), по-видимому, связано с отмеченным рядом авторов замедлением или даже с прекращением в таких условиях клеточного деления, а следовательно, и с более продолжительным периодом

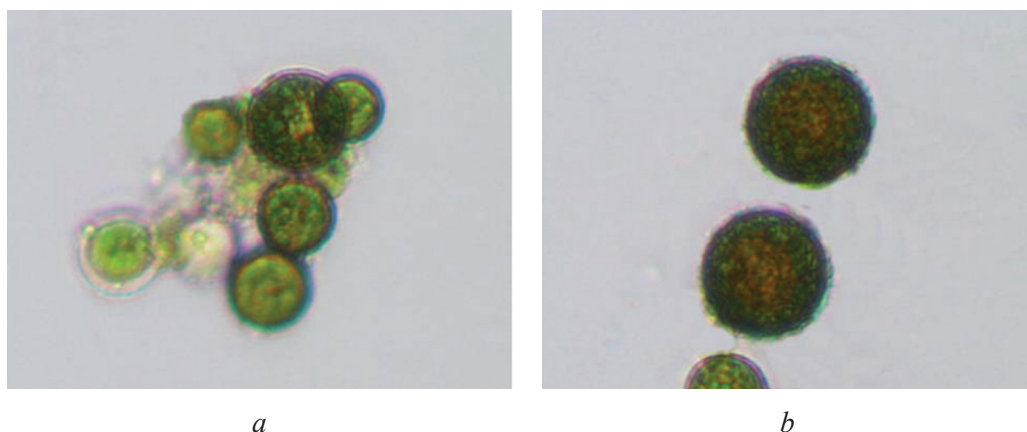


Рис. 7. Клетки водоросли *H. pluvialis* контрольной (а) и опытной (b, NaCl 100 мМ) культур, выращиваемых в течение 7 сут на среде Рудика

Fig. 7. Cells of *H. pluvialis* algae control (a) and experimental (b, NaCl 100 mM) cultures grown for 7 days on Rudik's mediu

клеточного роста [4, 24]. Увеличение размера клеток даже при снижении их количества (вариант «NaCl-100») могло быть причиной повышения продуктивности водоросли по сравнению с контролем по такому показателю, как сухой вес вещества (см. рис. 1, 2). В работе [25] также отмечено повышение биомассы гематококка на 7-е и 9-е сутки выращивания водоросли на среде с низким содержанием NaCl (17,1 мМ). Положительное влияние низких концентраций соли на целый ряд морфометрических показателей растений (например, таких, как прорастание семян, масса проростков, длина корешков и надземной части проростков ячменя и гречихи), установленное в ряде работ [26, 27], может быть связано с действием NaCl как питательного компонента. С другой стороны, выявленное нами положительное влияние NaCl на такие биохимические показатели, как синтез 5-аминолевулиновой кислоты и возрастание содержания гема в растениях ячменя и огурца [28–30], может указывать на стимуляцию дыхательного процесса с целью генерации дополнительной энергии для поддержания ростовых процессов в стрессовых условиях, создаваемых засолением.

Использование NaCl для накопления астаксантина описано в целом ряде работ и предпринято в основном с целью разработки биотехнологий его производства [1, 5–7, 24]. Однако механизмы действия соли на метаболизм астаксантина почти не изучены [26, 31]. Ранее на высших растениях нами показано, что избыточное засоление, создаваемое NaCl, ингибирует экспрессию гена нитратредуктазы, снижает содержание и активность фермента, подавляя тем самым ассимиляцию неорганического азота и его превращение в органическую форму [32–34]. В единственной работе Dong с соавт. [35, на китайском языке], проведенной на гематококке, отмечено падение активности нитратредуктазы при выращивании водоросли в условиях высокой засоленности среды. Авторы предположили, что одним из механизмов индукции накопления астаксантина под действием NaCl является ингибирование поступления в клетки водоросли неорганического азота, его внутриклеточный дефицит и индукция накопления астаксантина, как это наблюдается в экспериментах с дефицитом азота в среде выращивания гематококка [9, 35]. Использование нами классических приемов и метода оценки активности нитратредуктазы [32–34] в клетках гематококка, к сожалению, показало чрезвычайно низкую активность фермента как в контрольных, так и в «солевых» препаратах, что не позволило количественно оценить активность белка. Вместе с тем падение активности нитратредуктазы в условиях засоления среды, отмеченное в работе [32], могло бы объяснить и наблюдаемое нами падение содержания хлорофилла и белка при всех используемых концентрациях соли (см. рис. 3), поскольку первым органическим соединением, ассимилировавшим неорганический азот нитратредуктазой, является глутаминовая кислота – предшественник хлорофилла в биосинтезе [36]. Глутаминовая кислота является также ключевой аминокислотой, участвующей в биологической азотфиксации и синтезе белков. Этот вывод поддерживают и результаты работы [37], согласно которым при выращивании гематококка в течение 15 сут в условиях дефицита азота наблюдалось активное накопление астаксантина

и 50 %-ное падение содержания хлорофилла по сравнению с его исходным количеством. В то же время накопление астаксантина в среде, дефицитной по фосфору, в этих же условиях не приводило к изменению содержания хлорофилла в гематококке, что указывает на специфическое действие дефицита внутриклеточного азота на систему синтеза хлорофилла. Вызванное действием NaCl падение содержания хлорофилла по мере накопления астаксантина в клетках водоросли *H. Pluvialis* (штаммы Steptoe и SAG 19-A) наблюдали также в работах [1, 25].

Заклучение. Изучение молекулярно-генетических механизмов действия NaCl на систему синтеза астаксантина показало стимуляцию под действием соли экспрессии генов как начальных ферментов системы синтеза каротиноидов – фитоинсинтазы и фитоиндесатуразы, а также генов, продукты которых непосредственно участвуют в синтезе астаксантина – β -каротинкетотазы и β -каротингидролазы, что сопровождалось активным накоплением астаксантина [25, 38]. Отмеченная в ряде работ индукция каротиногенеза под действием соли практически полностью обеспечивалась накоплением вторичных каротиноидов, а именно астаксантина и его производных [9, 39]. В период накопления астаксантина в присутствии NaCl нами установлено падение содержания участвующих в фотосинтезе первичных каротиноидов – неоксантина, лютеина, виолаксантина и β -каротина. По-видимому, в условиях стресса, вызванного засолением, активность биосинтетической ветви, ведущей к образованию неоксантина и виолаксантина из β -каротина, подавляется, в то время как вторая ветвь, ведущая к синтезу из β -каротина вторичных кетокаротиноидов – адониксантина, астаксантина и его производным, активируется. Наиболее низкое содержание β -каротина по сравнению с другими каротиноидами может свидетельствовать о его активном потреблении во второй биосинтетической ветви, что подтверждается повышенной экспрессией генов β -каротинкетотазы и β -каротингидролазы при избытке NaCl [25, 38]. Сведения об активности ферментов, участвующих в образовании первичных каротиноидов, в частности эпоксидазы (Zer 1), в условиях действия NaCl отсутствуют.

Несомненно, что использование биохимических и молекулярно-генетических подходов является наиболее перспективным и может лечь в основу генно-инженерных преобразований *H. pluvialis* с целью усиления синтеза астаксантина. Наши дальнейшие исследования будут посвящены поиску новых индукторов каротиногенеза в клетках *H. pluvialis*, а также активно развиваемому в настоящее время направлению, в основу которого положено использование сочетанного действия нескольких стрессовых факторов, значительно усиливающих выход астаксантина [1, 2, 5, 6, 35].

Список использованных источников

1. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions / A. Cifuentes [et al.] // Biol. Res. – 2003. – Vol. 36, N 3–4. – P. 343–357. <https://doi.org/10.4067/s0716-97602003000300006>
2. Aburai, N. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae) / N. Aburai, D. Sumida, K. Abe // Algal Res. – 2015. – Vol. 8. – P. 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.005>
3. High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae) / Y. Li [et al.] // J. of Phycology. – 2009. – Vol. 45, N 3. – P. 635–641. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00689.x>
4. He, P. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: effects of cultivation parameters / P. He, J. Duncan, J. Barber // J. of Integrative Plant Biology. – 2007. – Vol. 49, N 4. – P. 447–451. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00468.x>
5. Study on the effect of salt concentration on growth and astaxanthin accumulation of microalga *Haematococcus pluvialis* as the initial basis for two phase culture of astaxanthin production / L.T. Tam [et al.] // TAP CHI SINH HOK. – 2012. – Vol. 34, N 2. – P. 213–223. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v34n2.964>
6. Kobayashi, M. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress / M. Kobayashi, Y. Kurimura, Y. Tsuji // Biotechnol. Lett. – 1997. – Vol. 19, N 6. – P. 507–509. <https://doi.org/10.1023/A:1018372900649>
7. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions / B. Cordero [et al.] // Biotechnol. Lett. – 1996. – Vol. 18, N 2. – P. 213–218. <https://doi.org/10.1007/BF00128682>
8. Effect of flashing light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* / T. Katsuda [et al.] // J. Bioscience Bioengineering. – 2006. – Vol. 102, N 5. – P. 442–446. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.442>
9. Changes in pigment profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses / S. Boussiba [et al.] // Biotechnol. Lett. – 1999. – Vol. 21, N 7. – P. 601–604. <https://doi.org/10.1023/A:1005507514694>

10. Shimidzu, N. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms / N. Shimidzu, M. Goto, W. Miki // Fisheries Science. – 1996. – Vol. 62, N 1. – P. 134–137. <https://doi.org/10.2331/fishsci.62.134>
11. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition / G. Hussein [et al.] // J. of Natural Products. – 2006. – Vol. 69, N 3. – P. 443–449. <https://doi.org/10.1021/np050354+>
12. Guerin, M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition / M. Guerin, M. E. Huntley, M. Olaizola // Trends Biotechnol. – 2003. – Vol. 21, N 5. – P. 210–216. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(03)00078-7)
13. Johnson, E. A. Microbial carotenoids / E. A. Johnson, W. A. Schroeder // Downstream Processing Biosurfactants Carotenoids / ed. A. Flechter. – Berlin, 1995. – P. 119–178.
14. Krishna, K. B. Secondary carotenoid production in green algae / K. B. Krishna, P. Mohanty // J. Sci. Ind. Res. – 1998. – Vol. 57, N 2. – P. 51–63.
15. Higuera-Ciajara, I. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications / I. Higuera-Ciajara, L. Félix-Valenzuela, F. Goycoolea // Critical Rev. in Food Science and Nutrition. – 2006. – Vol. 46, N 2. – P. 185–196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
16. Yuan, J.-P. Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection / J.-P. Yuan, F. Chen // Biotechnol. Tech. – 1997. – Vol. 11, N 7. – P. 455–459. <https://doi.org/10.1023/A:1018441411746>
17. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / сост. : С. С. Мельников [и др.]. – Минск : Беларусь. наука, 2011. – 101 с.
18. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на продуктивность и пигментный состав водоросли *Haematococcus pluvialis* / Н. Г. Аверина [и др.]. // Вес. Нац. акад. Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 21–32.
19. Bradford, M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. A. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, N 1–2. – P. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
20. Jambunathan, N. Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants / N. Jambunathan // Plant stress tolerance. Methods and protocols / ed. R. Sunkar. – London, 2010. – P. 291–297.
21. Yuan, J.-P. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification / J.-P. Yuan, F. Chen // J. Agric. Food. Chem. – 1999. – Vol. 47, N 1. – P. 31–35. <https://doi.org/10.1021/jf980465x>
22. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – 3-е изд., испр. – Минск : Вышэйш. шк., 1973. – 320 с.
23. Harker, M. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis* / M. Harker, A. J. Tsavalos, A. J. Young // Bioresource Technology. – 1996. – Vol. 55, N 3. – P. 207–214. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00002-x](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00002-x)
24. Boussiba, S. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* / S. Boussiba, A. Vonshak // Plant and Cell Physiology. – 1991. – Vol. 32, N 7. – P. 1077–1082. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078171>
25. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green algae *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions / R. Vidhyavathi [et al.] // J. Exp. Bot. – 2008. – Vol. 59, N 6. – P. 1409–1418. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern048>
26. Гордеева, И. В. Влияние низких концентраций раствора NaCl на прорастание семян *Hordeum vulgare* L. / И. В. Гордеева // Междунар. науч.-исслед. журн. – 2016. – Вып. 12 (54), ч. 1. – С. 14–17.
27. Гордеева, И. В. Влияние низких концентраций хлорида натрия на всхожесть семян и развитие проростков гликофитных растений (на примере *Fagopyrum esculentum*) / И. В. Гордеева // Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI века : материалы 17-й Междунар. науч. конф., 18–19 мая 2017 г., г. Минск : в 2 ч. / ред. : С. А. Маскевич (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2017. – Ч. 2. – С. 22–24.
28. Аверина, Н. Г. Механизмы формирования устойчивости растений ячменя к солевому стрессу под действием 5-аминолевулиновой кислоты / Н. Г. Аверина [и др.] // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 6. – С. 849–856.
29. Влияние солевого стресса на систему биосинтеза гема в альбино-ткани растений ячменя (*Hordeum vulgare*), обработанных стрептомицином / Н. Г. Аверина [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2011. – № 1. – С. 62–66.
30. Формирование устойчивости этилированных проростков огурца (*Cucumis sativus* L.) к солевому стрессу / С. Л. Чирук [и др.] // Актуальные проблемы экологии : материалы VII Междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 26–28 окт. 2011 г. / редкол. : Н. П. Канунникова (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2011. – С. 226–228.
31. Steinbrenner, J. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydrolase during stress-induced astaxanthin formation in the green algae *Haematococcus pluvialis* / J. Steinbrenner, H. Linden // Plant Physiology. – 2001. – Vol. 125, N 2. – P. 810–817. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.810>
32. Аверина, Н. Г. Молекулярные механизмы регуляции нитратредуктазы экзогенной 5-аминолевулиновой кислотой в проростках ячменя, выращенных в условиях засоления хлоридом натрия / Н. Г. Аверина, З. Бейзае, Р. А. Щербак // Докл. Нац. акад. наук Беларусі. – 2015. – Т. 59, № 4. – С. 95–101.
33. Beyzaei, Z. Involvement of nitrate reductase in the ameliorating effect of 5-aminolevulinic acid on NaCl-stressed barley seedlings / Z. Beyzaei, N. G. Averina, R. A. Sherbakov // Acta Physiologiae Plantarum. – 2015. – Vol. 37, N 2. – Art. 11. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1752-0>
34. Mechanism of salt stress inducing astaxanthin synthesis / O. Dong [et al.] // Chem. Engineering. – 2007. – Vol. 35, N 1. – P. 45–47.
35. Metabolite profiling and integrative modeling reveal metabolic constraints for carbon partitioning under nitrogen starvation in the green algae *Haematococcus pluvialis* / L. Recht [et al.] // J. Biol. Chem. – 2014. – Vol. 289, N 44. – P. 30387–30403. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.555144>

36. Аверина, Н. Г. Биосинтез тетрапирролов в растениях / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская. – Минск : Беларус. навука, 2012. – 413 с.
37. Boussiba, S. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses / S. Boussiba [et al.] // *Biotechnol. Lett.* – 1999. – Vol. 21, N 7. – P. 601–604. <https://doi.org/10.1023/A:1005507514694>
38. Huang, J.-C. Stress-related differential expression of multiple β -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* / J.-C. Huang, F. Chen, G. Sandmann // *J. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 122, N 2. – P. 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.09.002>
39. Kumar, C. Studies on production potential of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* : Ph. D. thesis / C. Kumar. – New Delhi, 2014. – 170 p.

References

- Cifuentes A., González M., Vargas S., Hoeneisen M., González N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research*, 2003, vol. 36, no. 3–4, pp. 343–357. <https://doi.org/10.4067/s0716-97602003000300006>
- Aburai N., Sumida D., Abe K. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus sp.* (Chlorophyceae). *Algal Research*, 2015, vol. 8, pp. 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.005>
- Li Y., Huang J., Sandmann G., Chen F. High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 2009, vol. 45, no. 3, pp. 635–641. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00689.x>
- He P., Duncan J., Barber J. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: effects of cultivation parameters. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, vol. 49, no. 4, pp. 447–451. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00468.x>
- Tam L. T., Hoang D. D., Mai D. T. N., Thu N. N. H., Anh H. T. L., Hong D. D. Study on the effect of salt concentration on growth and astaxanthin accumulation of microalga *Haematococcus pluvialis* as the initial basis for two phase culture of astaxanthin production. *TAP CHI SINH HOK*, 2012, vol. 34, no. 2, p. 964. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v34n2.964>
- Kobayashi M., Kurimura Y., Tsuji Y. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnology Letters*, 1997, vol. 19, no. 6, pp. 507–509. <https://doi.org/10.1023/A:1018372900649>
- Cordero B., Otero A., Patiño M., Arredondo B. O., Fabregas J. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. *Biotechnology Letters*, 1996, vol. 18, no. 2, pp. 213–218. <https://doi.org/10.1007/BF00128682>
- Katsuda T., Shimahara K., Shiraishi H., Yamagami K., Ranjbar R., Katoh S. Effect of flashing light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2006, vol. 102, no. 5, pp. 442–446. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.442>
- Boussiba S., Bing W., Yuan J.-P., Zarka A., Chen F. Changes in pigment profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Journal of Biotechnology Letters*, 1999, vol. 21, no. 7, pp. 601–604. <https://doi.org/10.1023/A:1005507514694>
- Shimidzu N., Goto M., Miki W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science*, 1996, vol. 62, no. 1, pp. 134–137. <https://doi.org/10.2331/fishsci.62.134>
- Hussein G., Sankava U., Goto H., Matsumoto K., Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*, 2006, vol. 69, no. 3, pp. 443–449. <https://doi.org/10.1021/np050354+>
- Guerin M., Huntley M. E., Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 2003, vol. 21, no. 5, pp. 210–216. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(03)00078-7)
- Johnson E. A., Schroeder W. A. Microbial carotenoids. *Advances in Biochemical Engineering. Downstream Processing Biosurfactants Carotenoids*. Berlin, 1995, pp. 119–178.
- Krishna K. B., Mohanty P. Secondary carotenoid production in green algae. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 1998, vol. 57, no. 2, pp. 51–63.
- Higuera-Ciajara I., Félix-Valenzuela L., Goycoolea F. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, vol. 46, no. 2, pp. 185–196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
- Yuan J.-P., Chen F. Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnology Techniques*, 1997, vol. 11, no. 7, pp. 455–459. <https://doi.org/10.1023/A:1018441411746>
- Mel'nikov S. S., Manankina E. E., Budakova E. A., Shalygo N. V. *Catalog of the genetic fund of economically useful species of algae*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 101 p. (in Russian).
- Averina N. G., Sheherbakov R. A., Kozel N. V., Manankina E. E., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Influence of 5-aminolevulinic acid on the production and pigment composition of algae *Haematococcus pluvialis*. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 21–32 (in Russian).
- Bradford M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Jambunathan N. Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. *Plant stress tolerance. Methods and protocols*. London, 2010, pp. 291–297.
- Yuan J.-P., Chen F. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, vol. 47, no. 1, pp. 31–35. <https://doi.org/10.1021/jf980465x>

22. Rokitski P. F. *Biological statistics*. 3rd ed. Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 1973. 320 p. (in Russian).
23. Harker M., Tsavalos A. J., Young A. J. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 1996, vol. 55, no. 3, pp. 207–214. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00002-x](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00002-x)
24. Boussiba S., Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant and Cell Physiology*, 1991, vol. 32, no. 7, pp. 1077–1082. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078171>
25. Vidhyavathi R., Venkatachalam L., Sarada R., Ravishankar G. A. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green algae *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 2008, vol. 59, no. 6, pp. 1409–1418. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern048>
26. Gordeeva I. V. Effect of NaCl solution of low concentrations on seed germination of *Hordeum vulgare* L. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal* [International Research Journal], 2016, iss. 12 (54), pt. 1, pp. 14–17 (in Russian).
27. Gordeeva I. V. Effect of sodium chloride of low concentrations on seed germination and seedlings development of glycophyte plants (using the example of *Fagopyrum esculentum*). *Sakharovskie chteniya 2017 goda: ekologicheskie problemy XXI veka: materialy 17-i mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii (18–19 maya 2017 goda, Minsk). Chast' 2* [Sakharov readings 2017: environmental problems of the XXI century: materials of the 17th International scientific conference (May 18–19, 2017, Minsk). Pt. 2]. Minsk, 2017, pp. 22–24 (in Russian).
28. Averina N. G., Gritskevich E. R., Vershilovskaya I. V., Usatov A. V., Yaronskaya E. B. Mechanisms of salt stress tolerance development in barley plants under the influence of 5-aminolevulinic acid. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2010, vol. 57, no. 6, pp. 792–798. <https://doi.org/10.1134/S1021443710060075>
29. Averina N. G., Gritskevich E. R., Samovich T. V., Usatov A. V., Yaronskaya E. B. Influence of salt stress on the heme biosynthesis system in the albino tissue of barley plants (*Hordeum vulgare*) treated with streptomycin. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2011, vol. 1, pp. 62–66 (in Russian).
30. Chiruk S. L., Vershilovskaya I. V., Samovich T. V., Obuhovskaya L. V., Yaronskaya E. B., Averina N. G. Formation of sustainability of etiolated cucumber seedlings (*Cucumis sativus* L.) to salt stress. *Aktual'nye problemy ekologii: materialy VII Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Grodno, 26–28 oktyabrya 2011 g.)* [Actual problems of ecology: materials of the VII International scientific and practical conference (Grodno, October 26–28, 2011)]. Grodno, 2011, pp. 226–228 (in Russian).
31. Steinbrenner J., Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydrolase during stress-induced astaxanthin formation in the green algae *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiology*, 2001, vol. 125, no. 2, pp. 810–817. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.810>
32. Averina N. G., Beizai Z., Shcherbakov R. A. Molecular mechanisms of regulation of nitrate reductase with exogenous 5-aminolevulinic acid in barley seedlings grown under salinization with NaCl. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2015, vol. 59, no. 4, pp. 95–101 (in Russian).
33. Beyzaei Z., Averina N. G., Shcherbakov R. A. Involvement of nitrate reductase in the ameliorating effect of 5-aminolevulinic acid on NaCl-stressed barley seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015, vol. 37, no. 2, art. 11. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1752-0>
34. Dong O., Zhao X. M., Xing X. Y., Gong J. X. Mechanism of salt stress inducing astaxanthin synthesis. *Chemical Engineering*, 2007, vol. 35, no. 1, pp. 45–47.
35. Recht L., Töpfer N., Batushansky A., Sikron N., Gibon Y., Fait A., Nikoloski Z., Boussiba S., Zarka A. Metabolite profiling and integrative modeling reveal metabolic constraints for carbon partitioning under nitrogen starvation in the green algae *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, vol. 289, no. 44, pp. 30387–30403. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.555144>
36. Averina N. G., Yaronskaya E. B. *Biosynthesis of tetrapyrroles in plants*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2012. 413 p. (in Russian).
37. Boussiba S., Wang B., Yuan J.-P., Zarka A., Chen F. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnology Letters*, 1999, vol. 21, no. 7, pp. 601–604. <https://doi.org/10.1023/A:1005507514694>
38. Huang J.-C., Chen F., Sandmann G. Stress-related differential expression of multiple β -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*, 2006, vol. 122, no. 2, pp. 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.09.002>
39. Kumar C. *Studies on production potential of astaxanthin by Haematococcus pluvialis*. Ph. D. thesis. New Delhi, 2014. 170 p.

Информация об авторах

Аверина Наталья Георгиевна – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: averina@ibp.org.by

Козел Николай Владимирович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kmu@tut.by

Information about the authors

Nataliya G. Averina – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: averina@ibp.org.by

Nikolai V. Kozel – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kmu@tut.by

Шербак *Ростислав Александрович* – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sherbakov@ibp.org.by

Радюк Мечислав Степанович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: radmes@mail.ru

Мананкина Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: room454@mail.ru

Гончарик Руслан Геннадьевич – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rusgon@mail.ru

Шальго Николай Владимирович – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shalygo@ibp.org.by

Rostislav A. Sherbakov – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sherbakov@ibp.org.by

Mechislav S. Radyuk – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: radmes@mail.ru

Elena E. Manankina – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: room454@mail.ru

Ruslan G. Goncharik – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rusgon@mail.ru

Nikolai V. Shalygo – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shalygo@ibp.org.by