

EDN: CKQJYC

УДК 581.1

## Colonial Green Alga *Botryococcus* is a Producer of Valuable Metabolites

Natalia O. Zhila<sup>a, b\*</sup>, Svetlana V. Prudnikova<sup>b</sup>,  
Andrey G. Degermendzhi<sup>a</sup> and Tatiana G. Volova<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Biophysics SB RAS  
Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”*

*Krasnoyarsk, Russian Federation*

<sup>b</sup>*Siberian Federal University*

*Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 13.04.2024, received in revised form 06.09.2024, accepted 12.09.2024

**Abstract.** An isolate of the green alga *Botryococcus braunii* collected from Lake Shira in 2022 has been studied for the first time as a producer of degradable bioplastics polyhydroxyalkanoates (PHAs) and hydrocarbons. The compositions of fatty acids, hydrocarbons, and PHAs were determined. The hydrocarbons synthesized by the isolate were mainly represented by dienes with carbon chain lengths C27 and C29. The study demonstrated the inability of the axenic culture of *B. braunii* to synthesize PHAs and the presence of polymer in the biomass of unialgal and non-axenic culture (up to 7–10 %). The bacterial component of the algal-bacterial consortium was studied, and bacteria *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas koreensis*, and *Aeromonas hydrophila*, capable of PHA synthesis, were discovered in it and identified. The study showed that the unialgal and non-axenic culture of *B. braunii* can be a source of not only algal hydrocarbons, but also degradable bioplastics PHAs.

**Keywords:** *Botryococcus braunii*, Lake Shira, fatty acids, poly(3-hydroxybutyrate), hydrocarbons.

**Acknowledgements.** The study was funded by State Assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FWES-2021–0025).

Citation: Zhila N. O., Prudnikova S. V., Degermendzhi A. G., Volova T. G. Colonial green alga *Botryococcus* is a producer of valuable metabolites. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(3), 278–286. EDN: CKQJYC



© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: nzhila@mail.ru

ORCID: 0000-0002-6256-0025 (Zhila N.); 0000-0001-8990-3043 (Prudnikova S.); 0000-0001-8649-5419 (Degermendzhi A.); 0000-0001-9392-156X (Volova T.)

## Зеленая колониальная водоросль *Botryococcus* – продуцент ценных метаболитов

Н. О. Жила<sup>а, б</sup>, С. В. Прудникова<sup>б</sup>,  
А. Г. Дегерменджи<sup>а</sup>, Т. Г. Волова<sup>а, б</sup>

<sup>а</sup>Институт биофизики СО РАН  
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»  
Российская Федерация, Красноярск  
<sup>б</sup>Сибирский федеральный университет  
Российская Федерация, Красноярск

---

**Аннотация.** Впервые исследован изолят зеленой водоросли *Botryococcus braunii*, выделенный из озера Шира в 2022 году, как продуцент разрушаемых биопластиков полигидроксиалканоатов (ПГА) и углеводов. Определен состав жирных кислот, углеводов и полигидроксиалканоатов. Углеводы, синтезируемые изолятом, представлены в основном диенами с длиной углеродной цепи C27 и C29. Показана неспособность аксеничной культуры *B. braunii* к синтезу ПГА и наличие в биомассе альгологически чистой и неаксеничной культуры полимера (до 7–10 %). Изучена бактериальная компонента консорциума «водоросль-бактерии», в котором обнаружены и идентифицированы бактерии *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas koreensis*, *Aeromonas hydrophila*, способные к синтезу ПГА. Показано, что альгологически чистая и неаксеничная культура *B. braunii* является источником не только водорослевых углеводов, но также и разрушаемых биопластиков ПГА.

**Ключевые слова:** *Botryococcus braunii*, озеро Шира, жирные кислоты, поли(3-гидроксибутират), углеводы.

**Благодарности.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FWES-2021–0025).

---

Цитирование: Жила Н. О. Зеленая колониальная водоросль *Botryococcus* – продуцент ценных метаболитов / Н. О. Жила, С. В. Прудникова, А. Г. Дегерменджи, Т. Г. Волова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(3). С. 278–286. EDN: СКQJYC

---

### Введение

Зеленая колониальная водоросль *Botryococcus*, насчитывающая 16 видов, широко распространена в природе (Guiry, Guiry, 2024). Наиболее изучаемый вид – *Botryococcus braunii* Kützing, продуцирующий метаболиты различной природы, среди которых – липиды, углеводы, белки, углеводы и пигменты (Collotta et al., 2018). *B. braunii* – особенный

вид фотосинтезирующего продуцента, направляющий большую часть потребляемого CO<sub>2</sub> на биосинтез метаболитов. Это обеспечивает высокую продукцию углеводов по сравнению с другими видами зеленых водорослей на фоне низкой скорости роста и низкого образования биомассы клеток. *B. braunii* является также представителем микроводорослей, обладающим способностью выделять углеводо-

роды во внеклеточную среду, что представляет несомненный практический интерес (Chaudry et al., 2018). Привлекательность *B. braunii* как продуцента целевых продуктов определяется способностью к росту за счет усвоения CO<sub>2</sub> в процессах оксигенного фотосинтеза. Последнее особо значимо в связи с наблюдающимся накоплением CO<sub>2</sub> в биосфере и поиском решений для снижения углеродного следа.

Значимость *B. braunii* как продуцента целевых продуктов усиливают появившиеся сообщения о способности синтезировать полигидроксиалканоаты (ПГА) – «зеленые» биопластики микробиологического происхождения (Kavitha et al., 2016a, b). ПГА – био-разрушаемые полимеры, синтез которых возможен с использованием различных субстратов, включая отходы (Koller, Mukherjee, 2022), и перспективные для применения в различных сферах – от коммунального и сельского хозяйства до фармакологии и биомедицины (Palmeiro-Sánchez et al., 2022). ПГА имеют большой потенциал для вклада в “The Circular Economy” (Koller, Mukherjee, 2022), так как представляют собой биотехнологический аналог полипропилена для постепенной замены синтетических пластиков на основе нефти, накопление которых в биосфере представляет собой глобальную экологическую проблему (Geyer, 2020).

Водоросль *B. braunii* широко распространена в естественных условиях в пресных и солоноватых водах и является компонентом «цветения» последних (Aaronson et al., 1983; Metzger, Largeau, 1999); встречается она и в уникальном лечебном озере Ширы, которое характеризуется устойчивой стратификацией биологических и химических компонент. Впервые изолят этой водоросли был выделен из озера Ширы в 2001 году. На основании исследованного состава жирных кислот и идентифицированной структуры угле-

водородов организм был отнесен к *B. braunii*, раса А (Zhila et al., 2001). В течение ряда лет выраженного развития этой водоросли в озере не наблюдали, и только в полевом сезоне 2022 года в результате бурного «цветения» был выделен новый изолят *B. braunii*. Цель данной работы – исследование нового изолята *B. braunii* не только как продуцента углеводов, но также и разрушаемых полигидроксиалканоатов.

### Материалы и методы

В период массового развития фитопланктона в озере Ширы (июль 2022 года) в литоральной зоне с поверхности воды были отобраны пробы, содержащие свыше 90 % *Botryococcus*, что было определено с использованием микроскопии (Биолаб, Россия). С применением общепринятых методов была получена альгологически чистая культура водоросли, в том числе свободная от бактериальной компоненты, которую выращивали на модифицированной среде Прата (Kalacheva et al., 2002) с чередованием циклов день/ночь длительностью по 14 и 10 ч. Альгологически чистую культуру получали путем переноса отдельных колоний *B. braunii* с помощью микропипетки Пастера в стерильную питательную среду. Для получения аксеничной культуры *B. braunii* водоросли культивировали на жидкой среде Прата с добавлением антибиотика имипенема в концентрации 100 мкг/мл и 0,1 % глюкозы в темноте в течение суток. Затем готовили серию десятикратных разведений и высевали в чашки Петри на 1,5 % агаризованную среду Прата для получения изолированных колоний. Полученные микроколонии переносили в жидкую среду Прата и культивировали в течение суток с чередованием циклов день/ночь длительностью по 14 и 10 ч. Проверку чистоты проводили путем высева 0,1 мл культуры на чашки

с мясептонным агаром; чашки инкубировали при 30 °С в течение 3 суток. Показателем аксеничности культуры *B. braunii* было отсутствие роста сопутствующей микрофлоры на мясептонном агаре.

Анализ состава жирных кислот (ЖК) липидов, ПГА, идентификация структуры углеводов выполнены с применением хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией на хроматографе (7890/5975С, Agilent Technologies, USA). Состав жирных кислот и углеводов определяли в экспоненциальной фазе роста, содержание ПГА – в стационарной фазе роста культуры *B. braunii*. Для идентификации бактерий проводили секвенирование V4 региона гена 16S рРНК при помощи праймеров 515F (5'-TATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') и 806R (5'-AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2011), и модифицированной пары: 515F-Y (5'-TATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') (Parada et al., 2016) и 806RB (5'-AGTCAGTCAGCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') (Apprill et al., 2015). Генетический анализ проводили на платформе Illumina MiniSeq (MiniSeq Mid Output Reagent Kit) в лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН по протоколу Pichler et al. (2018).

## Результаты и обсуждение

Водоросль, выделенная из озера Ши́ра, образует колонии, представленные одиночными или многочисленными клетками, соединенными друг с другом слизистыми тяжами. Клетки зеленого цвета, овальной формы, длина которых составляет 5–12 мкм, ширина – 3–7 мкм.

Состав жирных кислот и углеводов определяли в экспоненциальной фазе роста, так как известно, что максимальное накопление углеводов у *B. braunii* происходит

в этой фазе роста (Metzger, Largeau, 1999). Состав ЖК липидов выделенной водоросли главным образом представлен насыщенными и моноеновыми кислотами с длиной цепи от C<sub>14</sub> до C<sub>32</sub> (рис. 1а). В качестве основной насыщенной ЖК определена пальмитиновая кислота (до 34 % от суммы ЖК). Моноеновые кислоты (C<sub>16</sub> и C<sub>18</sub>) представлены двумя изомерами. В составе ЖК липидов водоросли определены моноеновые длинноцепочечные жирные кислоты. Ранее показано, что жирнокислотный спектр липидов *B. braunii* представлен насыщенными и моноеновыми жирными кислотами с четным числом углеродных атомов от 14 до 30 (Metzger et al., 1991; Templier et al., 1991; Metzger, Largeau, 1999). Основными жирными кислотами, как было установлено, являлись пальмитиновая, олеиновая и октакозеновая кислоты, содержание которых значительно варьировало в зависимости от штамма. Также, помимо октакозеновой кислоты, были идентифицированы и другие длинноцепочечные моноеновые кислоты (Metzger et al., 1991; Metzger, Largeau, 1999).

Во фракции углеводов, составляющей 50–60 % от суммы липидов *B. braunii*, главным образом определены насыщенные и диеновые углеводороды C<sub>20</sub>–C<sub>31</sub> (рис. 1б). Исследованный состав ЖК и структура углеводов *B. braunii*, выделенного из озера Ши́ра в 2022 году, аналогичны изоляту 2001 года, следовательно, организм относится к расе А, синтезирующей углеводороды с нечетным количеством атомов углерода от C<sub>27</sub> до C<sub>31</sub>, с линейной, неразветвленной структурой. Масс-спектры диеновых углеводов C<sub>27</sub> и C<sub>29</sub> приведены на рис. 2. Для большинства исследованных штаммов *B. braunii* расы А доминирующими углеводородами являлись диены C<sub>27</sub>–C<sub>31</sub>. Помимо диенов в составе углеводов идентифицированы триены с нечетным количеством

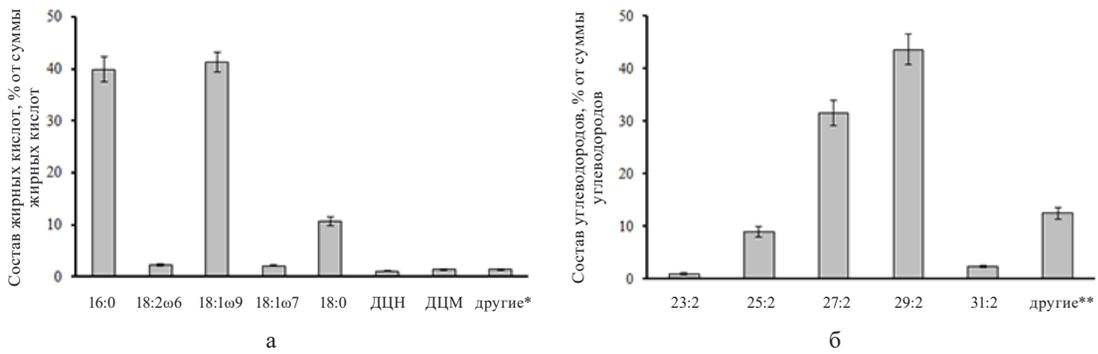
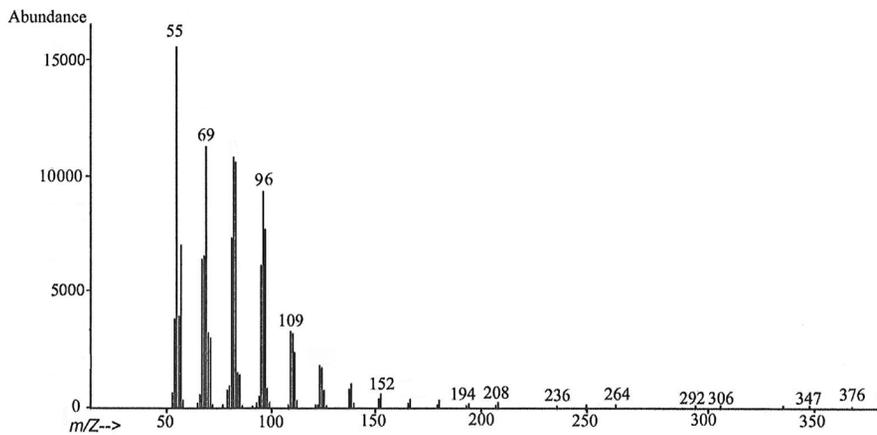
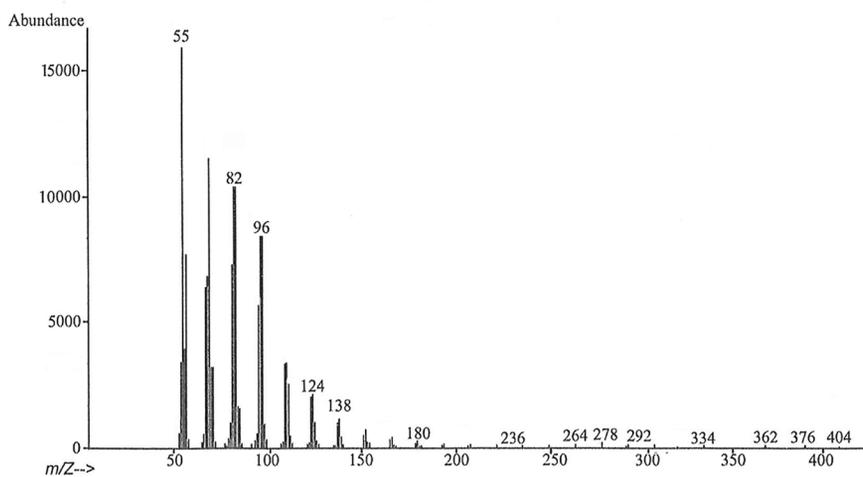


Рис. 1. Состав жирных кислот (а) и углеводородов (б). ДЦН – длинноцепочечные (C20-C26) насыщенные ЖК, ДЦМ – длинноцепочечные (C20-C32) моноеновые ЖК, другие\* (C14:0, C15:0, C16:1), другие\*\* – насыщенные углеводороды C20-C29, триеновые углеводороды C27-C29

Fig. 1. Composition of fatty acids (a) and hydrocarbons (b). LCN – long-chain (C20-C26) saturated FAs, LCM – long-chain (C20-C32) monoenoic FAs, others\* (C14:0, C15:0, C16:1), others\*\* – saturated hydrocarbons C20-C29, trienoic hydrocarbons C27-C29



а



б

Рис. 2. Масс-спектры диеновых углеводородов C27 (а) и C29 (б)

Fig. 2. Mass spectra of dienoic hydrocarbons C 27 (a) and C 29 (b)

атомов углерода C27-C31 (Metzger, Largeau, 1999). По составу углеводов с доминированием диенов, содержащих нечетное количество атомов углерода C27-C31, выделенный из озера Шира штамм похож на природные образцы *B. braunii* из австралийских озер Тараго и Сорренто (Wake, Hillen, 1981). Углеводородный состав с преобладанием C29-углеводородов также был характерен и для других штаммов расы А – как для музейного штамма Austin (Metzger et al., 1986), так и для природных штаммов, выделенных из озера Чальяпата, лагуны Ккота Пата (Боливия), озер Шомсон (Франция), Укаймеден (Марокко) (Metzger et al., 1985, 1989).

Способность *B. braunii*, выделенной из озера Колавай (Индия), синтезировать поли(3-гидроксibuтират) [П(ЗГБ)], накапливающийся в клетках в виде гранул, описана в работах (Kavitha et al., 2016a, b). Однако авторы не представили данные о наличии или отсутствии в исследованной культуре водоросли бактерий-спутников. При этом только обнаружение ПГА в аксеничной культуре водоросли может служить доказательством синтеза ПГА именно *B. braunii*, а не бактериями-спутниками. Известно, что колонии *B. braunii* являются пристанищем для бактерий-эпibiонтов (Chirac et al., 1985). Внеклеточные метаболиты водоросли служат для бактерий питательными компонентами, а витамины, синтезируемые бактериями, потребляются водорослью. Среди спутников *B. braunii*, способных синтезировать ПГА, описаны представители *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* (Chirac et al., 1985).

Способность водоросли *B. braunii*, выделенной в 2022 году, синтезировать ПГА исследована на образцах биоматериала, взятых из аксеничной и неаксеничной культуры водоросли. Содержание ПГА определяли в стационарной фазе роста, так как известно, что

максимальное накопление ПГА происходит в этой фазе роста (Muneer et al., 2020). Установлено отсутствие П(ЗГБ) и иных типов ПГА даже в следовых количествах в аксеничной культуре. Хроматографический анализ образцов, взятых из неаксеничной культуры, показал наличие ПГА (рис. 3), представленного П(ЗГБ); его продукция составляла до 7–10 % от веса сухой биомассы. Это является приемлемым для фотосинтетической продукции ПГА (Fritz et al., 2020).

Полимер, обнаруженный в неаксеничной культуре *B. braunii*, представляет собой, по всей видимости, продукт бактерий, а не собственно водоросли. Для проверки этого предположения выполнены микробиологические исследования водорослевой неаксеничной культуры на предмет наличия в ней бактерий и определения способности их к синтезу ПГА. Высев проб культуры на питательный агар (Nutrientagar, HiMedia) и отбор изолированных колоний бактерий показал, что их общая численность в культуре *B. braunii* составляет  $(5,77 \pm 0,45) \cdot 10^5$  КОЕ/мл. С применением молекулярно-генетических методов, включающих секвенирование при помощи универсальных праймеров на V4 регион гена 16S рРНК, идентифицировано четыре вида бактерий-спутников водоросли: *Aeromonas hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943, *Rheinheimera aquimaris* Yoon et al. 2007, *Pseudomonas koreensis* Kwon et al. 2003 и *Pseudomonas mendocina* Palleroni 1970 (последовательности фрагментов гена 16S рРНК идентифицированных штаммов депонированы в GenBankNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) под номерами OR 754193 – OR 754196). При этом свыше 70 % приходится на представителей рода *Pseudomonas*: *P. mendocina* (53,9 %) и *P. koreensis* (22,7 %). Третий по численности организм *A. hydrophila* (12,8 %); и четвертый – *R. aquimaris* (10,6 %).

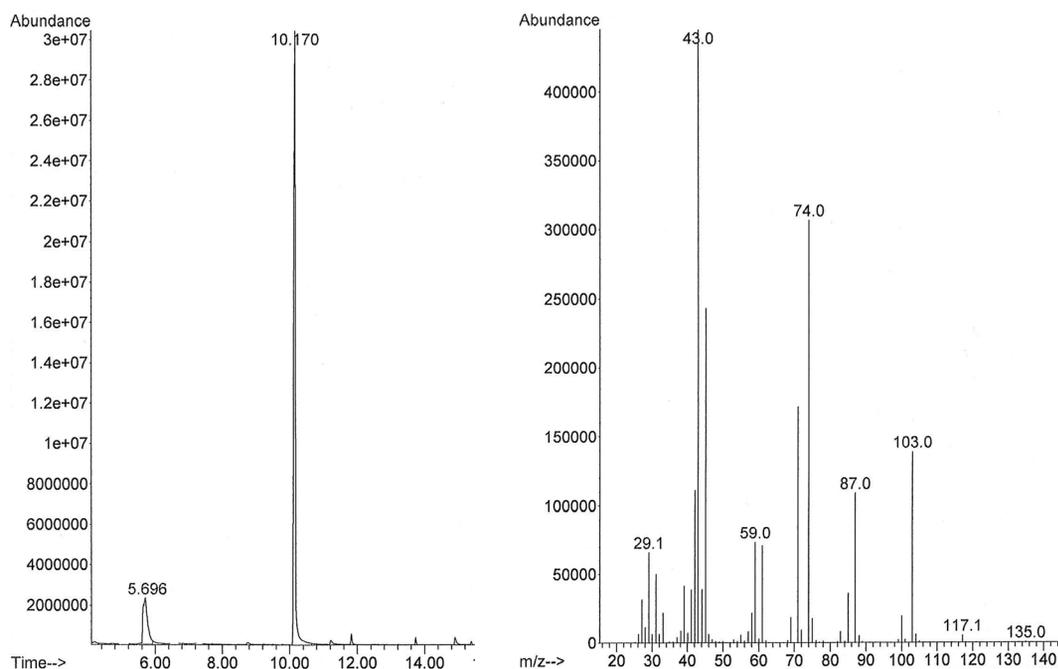


Рис. 3. Хроматограмма полимера и масс-спектр метилового эфира ЗГБ. Время удержания мономеров: 5,696 – метиловый эфир ЗГБ, 10,170 – метиловый эфир бензойной кислоты

Fig. 3. Polymer chromatogram and mass spectrum of 3HB methyl ester. Monomer retention time: 5.696 – 3HB methyl ester, 10.170 – benzoic acid methyl ester

Согласно литературным данным, многие виды рода *Pseudomonas* синтезируют полигидроксиалканоаты. Вид *P. mendocina* может накапливать два типа ПГА – содержащие как короткоцепочечные мономеры, такие как 3-гидроксibuтират, так и со средней длиной цепи – 3-гидроксиоктаноат и 3-гидроксидеканоат, что подтверждается наличием двух разных ПГА-синтаз, кодируемых генами *phbC* и *phaC* (Hein et al., 2002; Chanasit et al., 2016). Для вида *P. koreensis* также показано наличие генов *phaC1* и *phaC2*, кодирующих ПГА-синтазу класса II, что указывает на способность к аккумуляции среднецепочечных ПГА (Chao, Lingwei, 2011; Muneer et al., 2020). Различные штаммы вида *A. hydrophila* описываются как перспективные продуценты ПГА не только гомополимера П(ЗГБ), но и сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксигексаноата) (П(ЗГБ-со-ЗГГ))

(Mozejko-Ciesielska et al., 2019). Так, при выращивании *A. hydrophila* NIU 01 на среде с кокосовым маслом бактерии синтезировали П(ЗГБ), содержание которого превышало 50 % (Chen et al., 2013). При крупнотоннажном культивировании штамма *A. hydrophila* 4AK4 на среде с глюкозой и лауриновой кислотой бактерии синтезировали сополимер П(ЗГБ-со-ЗГГ) с высокими выходами (Chen et al., 2001). Данные о способности *R. aquimaris* синтезировать ПГА в доступной литературе отсутствуют. Таким образом, 90 % бактериальной компоненты в консорциуме «водоросли/бактерии» представлено *P. mendocina*, *P. koreensis*, *A. hydrophila*, способными синтезировать не только короткоцепочечный П(ЗГБ), но и среднецепочечные ПГА, содержащие мономеры 3-гидроксигексаноата, 3-гидроксиоктаноата и 3-гидроксидеканоата.

## Заклучение

Впервые показано, что колониальная водоросль *B. braunii* раса А, обитающая в озере Шира, при выращивании в лабораторной аль-

гологически чистой и неаксеничной культуре, является источником не только водорослевых углеводов, но также и разрушаемых биопластиков полигидроксиалканоатов.

## Список литературы / References

Aaronson S., Berner T., Gold K., Kushner L., Patni N.J., Repak A., Rubin D. (1983) Some observations on the green planktonic alga, *Botryococcus braunii* and its bloom form. *Journal of Plankton Research*, 5(5): 693–700

Apprill A., McNally S., Parsons R., Weber L. (2015) Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR 11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2): 129–137

Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Lozupone C.A., Turnbaugh P.J., Fierer N., Knight R. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(Suppl. 1): 4516–4522

Chanasit W., Hodgson B., Sudesh K., Umsakul K. (2016) Efficient production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Pseudomonas mendocina* PSU using a biodiesel liquid waste (BLW) as the sole carbon source. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(7): 1440–1450

Chao Z., Lingwei R. (2011) Combinations of spectrofluorometry and polymerase chain reaction for rapid detection of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating (Mcl-PHA) bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 5: 5053–5056

Chaudry S., Bahri P.A., Moheimani N.R. (2018) Techno-economic analysis of milking of *Botryococcus braunii* for renewable hydrocarbon production. *Algal Research*, 31: 194–203

Chen B.Y., Hung J.Y., Shiao T.J., Wei Y.H. (2013) Exploring two-stage fermentation strategy of polyhydroxyalkanoate production using *Aeromonas hydrophila*. *Biochemical Engineering Journal*, 78: 80–84

Chen G., Zhang G., Park S., Lee S. (2001) Industrial scale production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1–2): 50–55

Chirac C., Casadevall E., Largeau C., Metzger P. (1985) Bacterial influence upon growth and hydrocarbon production of the green alga *Botryococcus braunii*. *Journal of Phycology*, 21(3): 380–387

Collotta M., Champagne P., Mabee W., Tomasoni G. (2018) Wastewater and waste CO<sub>2</sub> for sustainable biofuels from microalgae. *Algal Research*, 29: 12–21

Fritz I., Meixner K., Neureiter M., Drog B. (2020) Comparing heterotrophic with phototrophic PHA production – concurring or complementing strategies? *The handbook of polyhydroxyalkanoates. Microbial biosynthesis and feedstocks*. Koller M. (ed.) Boca Raton, CRC Press, p. 331–356

Geyer R. (2020) Production, use, and fate of synthetic polymers. *Plastic waste and recycling: environmental impact, societal issues, prevention, and solutions*. Letcher T.M. (ed.) Cambridge, Academic Press, p. 13–32

Guiry M.D., Guiry G.M. (2024) AlgaeBase. World-wide electronic publication; National University of Ireland, Galway. URL: <http://www.algaebase.org> (Accessed 25.07.2024)

Hein S., Paletta J., Steinbüchel A. (2002) Cloning, characterization and comparison of the *Pseudomonas mendocina* polyhydroxyalkanoate synthases PhaC 1 and PhaC 2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(2): 229–236

- Kalacheva G. S., Zhila N. O., Volova T. G. (2002) Lipid and hydrocarbon compositions of a collection strain and a wild sample of the green microalga *Botryococcus*. *Aquatic Ecology*, 36(2): 317–331
- Kavitha G., Kurinjimalar C., Sivakumar K., Palani P., Rengasamy R. (2016a) Biosynthesis, purification and characterization of polyhydroxybutyrate from *Botryococcus braunii* Kütz. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89: 700–706
- Kavitha G., Kurinjimalar C., Sivakumar K., Kaarthik M., Aravind R., Palani P., Rengasamy R. (2016b) Optimization of polyhydroxybutyrate production utilizing wastewater as nutrient source by *Botryococcus braunii* Kütz using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93(Part A): 534–542
- Koller M., Mukherjee A. (2022) A new wave of industrialization of PHA biopolyesters. *Bioengineering*, 9(2): 74
- Metzger P., Largeau C. (1999) Chemicals of *Botryococcus braunii*. *Chemicals from microalgae*. Cohen Z. (ed.) London, Taylor and Francis, p. 205–260
- Metzger P., Berkloff C., Casadevall E., Couté A. (1985) Alkadiene- and botryococcene-producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 24(10): 2305–2312
- Metzger P., Templier J., Largeau C., Casadevall E. (1986) An *n*-alkatriene and some *n*-alkadienes from the A race of the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 25(8): 1869–1872
- Metzger P., Villarreal-Rosales E., Casadevall E., Couté A. (1989) Hydrocarbons, aldehydes and triacylglycerols in some strains of the A race of the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 28(9): 2349–2353
- Metzger P., Villarreal-Rosales E., Casadevall E. (1991) Methyl-branched fatty aldehydes and fatty acids in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 30(1): 185–191
- Możejko-Ciesielska J., Marciniak P., Szacherska K. (2019) Polyhydroxyalkanoates synthesized by *Aeromonas* species: trends and challenges. *Polymers*, 11(8): 1328
- Muneer F., Rasul I., Azeem F., Siddique M. H., Zubair M., Nadeem H. (2020) Microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs): efficient replacement of synthetic polymers. *Journal of Polymers and Environment*, 28(9): 2301–2323
- Palmeiro-Sánchez T., O’Flaherty V., Lens P.N. L. (2022) Polyhydroxyalkanoate bio-production and its rise as biomaterial of the future. *Journal of Biotechnology*, 348: 10–25
- Parada A. E., Needham D. M., Fuhrman J. A. (2016) Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 18(5): 1403–1414
- Pichler M., Coskun Ö.K., Ortega-Arbulú A. S., Conci N., Wörheide G., Vargas S., Orsi W.D. (2018) A 16S rRNA gene sequencing and analysis protocol for the Illumina MiniSeq platform. *MicrobiologyOpen*, 7(6): e00611
- Templier J., Largeau C., Casadevall E. (1991) Biosynthesis of *n*-alkatrienes in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 30(7): 2209–2215
- Wake L. V., Hillen L. W. (1981) Nature and hydrocarbon content of blooms of the alga *Botryococcus braunii* occurring in Australian freshwater lakes. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 32(3): 353–367
- Zhila N.O., Kalacheva G.S., Volova T.G., Degermendzhi A.G. (2001) Structure of hydrocarbons synthesized by the alga *Botryococcus* isolated from Lake Shira. *Doklady Biological Sciences*, 378(1–6): 265–269