



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 1. С. 104–109

*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 1, pp. 104–109

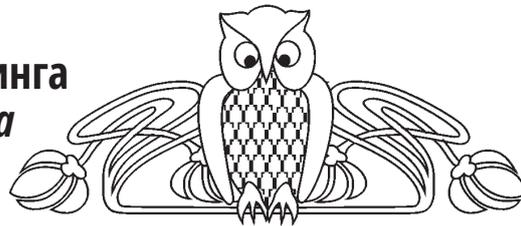
<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-1-104-109>, EDN: DYIHLL

Научная статья

УДК 57.084.01

## Цветометрическая система мониторинга роста микроводоросли *Dunaliella salina* в лабораторных условиях



А. А. Галицкая<sup>1,2</sup>✉, А. А. Акопян<sup>1</sup>, Л. А. Дыкман<sup>2</sup>, В. А. Богатырев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» Российской академии наук (ИБФРМ РАН), Россия, 410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13

Галицкая Анна Алексеевна, кандидат биологических наук, <sup>1</sup>доцент кафедры биохимии и биофизики, <sup>2</sup>научный сотрудник лаборатории иммунохимии, [ann.gal@mail.ru](mailto:ann.gal@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0002-7364-4726>

Акопян Арам Ашотович, студент кафедры биохимии и биофизики, [aram99298@gmail.com](mailto:aram99298@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-1510-6628>

Дыкман Лев Абрамович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии, [dykman\\_l@ibppm.ru](mailto:dykman_l@ibppm.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7252-8312>

Богатырев Владимир Александрович, доктор биологических наук, <sup>1</sup>профессор кафедры физиологии человека и животных, <sup>2</sup>ведущий научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии, [bogatyrev\\_v@ibppm.ru](mailto:bogatyrev_v@ibppm.ru), <https://orcid.org/0000-0001-5602-3365>

**Аннотация.** Солоноводная микроводоросль *Dunaliella salina*, являясь экстремофильным галофитом, представляет собой перспективный объект для биотехнологических производств. Целью данной работы является разработка методологии неdestructивного контроля развития культуры микроводоросли в условиях сбалансированного роста в процессе периодического культивирования в планшетах. Перед началом эксперимента культуру микроводоросли синхронизировали. Количественное содержание хлорофиллов *a* и *b*, а также каротиноидов определяли спектрофотометрически в спиртовых экстрактах. В процессе культивирования осуществляли запись изображений цейтраферной съемкой на камеру смартфона. Основу цветиметрической оценки составляет анализ временной серии изображений в цветовой модели RGB. Показано, что соотношение цветов с высокой степенью коррелирует с содержанием определяемых основных растительных пигментов – хлорофиллов и каротиноидов, и с данными спектрофотометрических измерений живых суспензий. Наиболее ярко проявляются изменения синего канала, менее всего – зеленого. Логарифм интенсивности цвета линейно зависит от степени разведения культуры. Разработанный метод оперативного слежения за динамикой развития культуры микроводоросли *D. salina* позволяет строить кривые роста и решать многопараметрические задачи по оптимизации культивирования микроводорослей, в том числе при работе с большими массивами образцов.

**Ключевые слова:** микроводоросли, *Dunaliella salina*, неинвазивный мониторинг, цветиметрия, спектрофотометрия

**Благодарности:** Работа выполнена при финансовой поддержке РФ (проект № 19-14-00077-П).

**Для цитирования:** Галицкая А. А., Акопян А. А., Дыкман Л. А., Богатырев В. А. Цветиметрическая система мониторинга роста микроводоросли *Dunaliella salina* в лабораторных условиях // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 1. С. 104–109. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-1-104-109>, EDN: DYIHLL

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

### Colormetric system for monitoring the growth of microalgae *Dunaliella salina* under laboratory conditions

A. A. Galitskaya<sup>1,2</sup>✉, A. A. Akopian<sup>1</sup>, L. A. Dykman<sup>2</sup>, V. A. Bogatyrev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms Federal Research Center "Saratov Scientific Center of the Russian Academy of Sciences" (IBPPM RAS), 13 Entuziastov Ave., Saratov 410049, Russia

Anna A. Galitskaya, [ann.gal@mail.ru](mailto:ann.gal@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0002-7364-4726>

Aram A. Akopian, [aram99298@gmail.com](mailto:aram99298@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-1510-6628>

Lev A. Dykman, [dykman\\_l@ibppm.ru](mailto:dykman_l@ibppm.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7252-8312>

Vladimir A. Bogatyrev, [bogatyrev\\_v@ibppm.ru](mailto:bogatyrev_v@ibppm.ru), <https://orcid.org/0000-0001-5602-3365>



**Abstract.** The brackish microalgae *Dunaliella salina*, being an extremophilic halophyte, is a promising object for biotechnological production. The aim of this work is to develop a methodology for non-destructive control of the development of a microalgae culture under conditions of balanced growth during periodic cultivation on plates. Before the start of the experiment, the microalgae culture was synchronized. The quantitative content of chlorophylls a and b, as well as carotenoids, was determined spectrophotometrically in alcohol extracts. During cultivation, time-lapse images were recorded on a smartphone camera. The basis of the colorimetric evaluation is the analysis of the time series of images in the RGB color model. It is shown that the ratio of colors correlates to a high degree with the content of the determined main plant pigments – chlorophylls and carotenoids, and with the data of spectrophotometric measurements of live suspensions. The changes in the blue channel are the most pronounced, the least being in the green channel. The logarithm of color intensity is linearly dependent on the degree of dilution of the culture. The developed method for real-time monitoring of the development dynamics of the *D. salina* microalgae culture makes it possible to build growth curves and solve multiparametric problems to optimize the cultivation of microalgae, including when working with large arrays of samples.

**Keywords:** microalgae, *Dunaliella salina*, non-invasive monitoring, colorimetry, spectrophotometry

**Acknowledgements:** This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 19-14-00077-П).

**For citation:** Galitskaya A. A., Akopian A. A., Dykman L. A., Bogatyrev V. A. Colorimetric system for monitoring the growth of microalgae *Dunaliella salina* under laboratory conditions. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 1, pp. 104–109 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-1-104-109>, EDN: DYIHLL

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

Экстремофильная галофитная микроводоросль *D. salina* является первичным (иногда единственным) продуцентом и составляет основу трофической структуры солоноводных биоценозов [1, 2]. Выживая в условиях гиперсоленых водоемов и повышенной солнечной радиации, дуналиелла накапливает большие количества биотехнологически значимых метаболитов, таких как каротиониды и глицерин. Она имеет значительный потенциал и перспективы использования в фармацевтике, индустрии питания, энергетической биотехнологии [3]. В связи с этим развитие методологии неdestructивного мониторинга развития культур микроводорослей представляется актуальной задачей.

Группу оптических методов всегда относили к наиболее щадящим по отношению к изучаемому объекту способам исследования. Однако живые растения в этом плане представляются достаточно сложными объектами. Поглощение света пигментными комплексами зеленых растений критично зависит от физиологического состояния и условий среды обитания, прежде всего, от освещенности [4] (соотношение окисленных/восстановленных форм хлорофиллов), от молекулярной организации фотосистем в мембранах тилакоидов, структурной организации хлоропластов, клеток и клеточных систем в целом [5, 6]. Коллимированное пропускание света весьма чувствительно к светорассеянию, присущему суспензиям микроорганизмов [7]. Успешные попытки учета вклада светорассеяния в общее ослабление света суспензиями микроводорослей [8], связанные с использованием интегрирующих сфер, мало пригодны для рутинных измерений большого количества образцов. Ранее нами была разработана

система спектрофотометрической оценки скорости роста/отмирания микроводорослей в микропланшетном токсикологическом эксперименте [9]. Однако такая система измерений дает заметные искажения в случае изменения морфологии и, особенно, при оседании клеток. Цель настоящего исследования – разработка системы цветометрической оценки параметров роста (построение кривых роста) культур *D. salina* при планшетном периодическом культивировании. Основная задача метода – нахождение контрольных точек (характерных времен) на кривых роста/отмирания для последующего подробного исследования спектроскопическими и цитологическими методами.

## Материалы и методы

**Поддержание культуры микроводорослей.** Культура микроводорослей *D. salina* Теод. IP-PASD-294 была получена из коллекции Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева, Москва (ИФР РАН). Для наращивания биомассы использовали культуральную среду Ben-Amotz [10], включающую в свой состав набор компонентов в следующих концентрациях: NaCl 1,5 М; NaHCO<sub>3</sub> 50 мМ; KNO<sub>3</sub> 25 мМ; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 5 мМ; CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O 0,3 мМ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 мМ; ЭДТА 30 мкМ; FeCl<sub>3</sub> 2 мкМ; MnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 7 мкМ; CuCl<sub>2</sub> 1 мкМ; ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 1 мкМ; CoSO<sub>4</sub> 1 мкМ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 мкМ; pH 8. Непосредственно перед инокуляцией раствор фильтровали через фильтр 0,22 мкм (Millipore, США).

Для экспериментов применяли частично синхронизированную культуру, полученную путем как минимум трех последовательных пересевов в 6 луночных планшетах (Biofilm, Китай) с интервалами 3–4 сут.



*Цейтраферная съемка (таймлапс).* Запись изображений осуществляли на камеру смартфона Андроид с программой Fraimelapse с различными временными интервалами, блокировкой автоматической экспозиции и баланса белого. В программе ImageJ создавали пакет изображений File/Import/Image sequence. Усредненные по выделенной области интересов (изображение лунки) уровни цветности получали с помощью инструмента «гистограмма» во вкладке «анализ». Значения измеряемого канала цвета  $V(r)$ ,  $V(g)$ ,  $V(b)$ , заносили в таблицы Excel и пересчитывали значения по формуле

$$V'(rgb)_i = \ln(V(rgb)_0 / V(rgb)_i), \quad (1)$$

где  $V(rgb)_0$  – значение уровня цветности канала лунки бланка (без водорослей), а  $V(rgb)_i$  – значение того же канала  $i$ -й лунки.

*Определение содержания растительных пигментов.* Для определения содержания растительных пигментов аликвоты (по 200 мкл) суспензий водорослей переносили в 96-луночный планшет с лунками объемом 2 мл либо центрифужные пробирки и добавляли по 1.8 мл 96% этанола. После перемешивания пипетированием планшеты выдерживали 15 мин в ультразвуковой ванне УЗУМИ (Трима, Россия). Пробы центрифугировали при 3000  $g$  15 мин. По 300 мкл супернатанта переносили в лунки стандартного планшета и регистрировали поглощение на спектрофотометрическом ридере BioTek Cytation (Agilent, США) на длинах волн 470, 649 и 665 нм. Содержание пигментов (хлорофиллов  $a$  и  $b$ , каротиноидов) определяли по формулам:

$$\text{Chl } a \text{ (мкг} \times \text{мл}^{-1}) = 12,21 \times A_{665} - 2,81 \times A_{649}, \quad (2)$$

$$\text{Chl } b \text{ (мкг} \times \text{мл}^{-1}) = 20,13 \times A_{649} - 5,03 \times A_{665}, \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{Car} \text{ (мкг} \times \text{мл}^{-1}) &= \\ &= (1000 \times A_{470} - 3,27 \times A_{665} - 104 \times A_{649}) / 227 \end{aligned} \quad (4)$$

в соответствии с работой [11].

*Фотометрические измерения и обработка данных.* При посеве и через каждые сутки проводили спектрофотометрические измерения на планшетном ридере BioTek Cytation в режиме регистрации спектров экстинкции 400–800 нм с шагом 4 нм. Для вычисления поглощения хлорофилла *in vivo* в суспензиях культур *D. salina* использовали высоту пика 680 нм, скорректированную на величину неселективного ослабления по значениям ближайших локальных минимумов 640 и 740 нм. Расчет величины поглощения осуществляли по формуле:

$$\tilde{A}_{680} = (E_{680} - E_{740}) - (E_{640} - E_{740}) \times 0,6, \quad (5)$$

где  $E_{680}$ ,  $E_{740}$ ,  $E_{640}$  – регистрируемые значения экстинкции на соответствующих длинах волн.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета прикладных компьютерных программ Microsoft Excel 2007. Полученные данные представлены в виде средней арифметической и ее стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). О достоверности межгрупповых различий судили по параметрическому критерию Стьюдента ( $t$ -тест) для количественных показателей с нормальным распределением. Проверка статистических гипотез осуществлялась при критическом уровне значимости  $p < 0,05$ .

*Определение зависимости параметров роста от посевной дозы.* Аликвоту (стандартно 8 мл) накопительной культуры осаждали при 1000  $g$  10 мин и редиспергировали в половинном объеме культуральной среды. В лунки 96-луночного планшета проводили посев в серии разведений от 0 до 100% с шагом 20% в 2 сериях триплицированных рядов. Планшет устанавливали в факторостатный бокс и включали видеозапись в режиме цейтраферной съемки. Ежедневно регистрировали параметр  $\tilde{A}_{680}$ . Через 72 ч экстрагировали и анализировали 1 серию (3 ряда) лунок. Через 2 недели эксперимент завершали экстракцией остальных лунок.

### Результаты и их обсуждение

В аддитивной цветовой модели RGB значения основных цветов (красного, зеленого, синего) записываются в 256-значном формате. При этом белому соответствует значение (255, 255, 255), а черному – (0, 0, 0). Поскольку концентрационная зависимость ослабления света поглощающими суспензиями подчиняется закону Бугера – Ламберта – Бера, логично было предположить, что логарифм цветности будет линейно зависеть от концентрации. Для проверки этого предположения мы оценили изменение каждого канала цветности в ряду последовательных разведений суспензии *D. salina*.

На рис. 1 приведены изображения фрагмента планшета с серией разведений 3-дневной культуры *D. salina*, проведенной с шагом в 20%; оригинальное фото (а), фотометрическая (б) и спектрофотометрическая (в) оценка концентрации культуры.

Сравнение панелей (б) и (в) показывает, что оба способа дают адекватную оценку, поскольку аппроксимируются линейными функциями с очень высокой степенью достоверности.

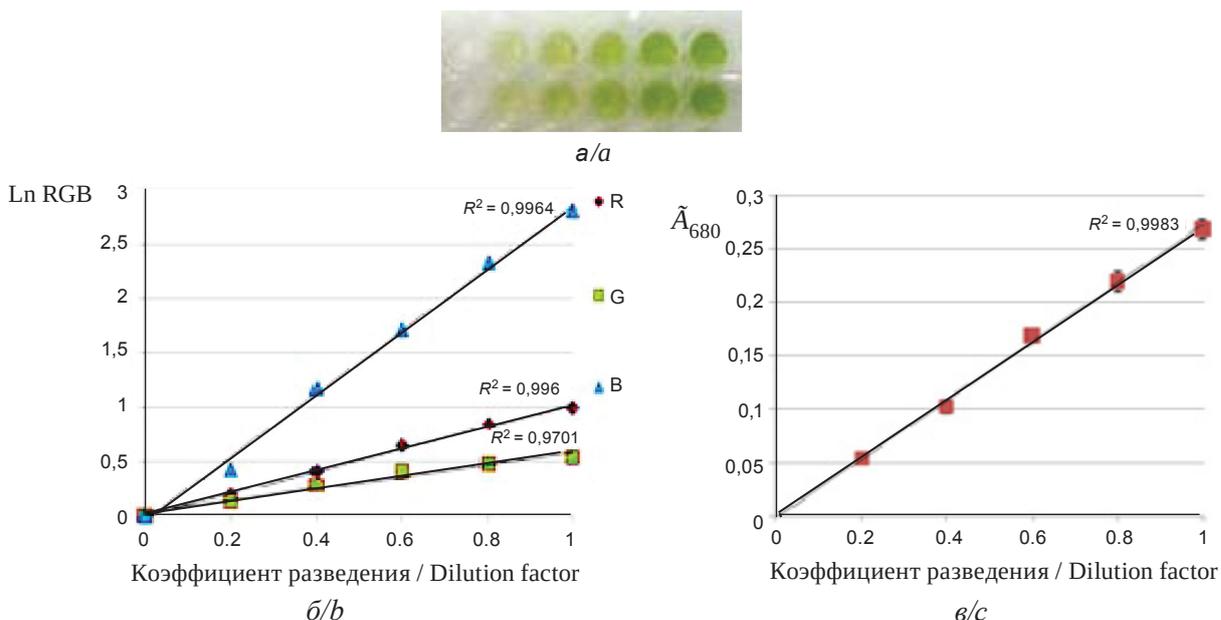


Рис. 1. Цветометрическая и спектрофотометрическая оценка концентрации культуры *D. salina* при разведении в лунках 96-луночного планшета с шагом 20%. Фото фрагмента планшета (а), зависимость значений каналов цветности R, G, B (б) и параметра  $\tilde{A}_{680}$  (в) от разведения. Прямые показывают линейные аппроксимации. Рядом с прямыми указан коэффициент корреляции Пирсона  $R^2$ . Бары показывают стандартные отклонения по трем измерениям

Fig. 1. Colorimetric and spectrophotometric assessment of the concentration of the *D. salina* culture when diluted in the wells of a 96-well plate with a step of 20%. Photo of a fragment of the plate (a), the dependence of the values of the R, G, B color channels (b) and the parameter  $\tilde{A}_{680}$  (c) on the dilution. The straight lines show linear approximations. The Pearson correlation coefficient  $R^2$  is indicated next to the straight lines. Bars show standard deviations across three dimensions

Для уточнения достоверности оценки мы использовали общепринятую стандартную методику определения содержания основных растительных пигментов: хлорофиллов *a*, *b* и

каротиноидов в спиртовых экстрактах по разработанной нами упрощенной процедуре. На рис. 2 приведены графики зависимости концентрации пигментов от разведения культуры.

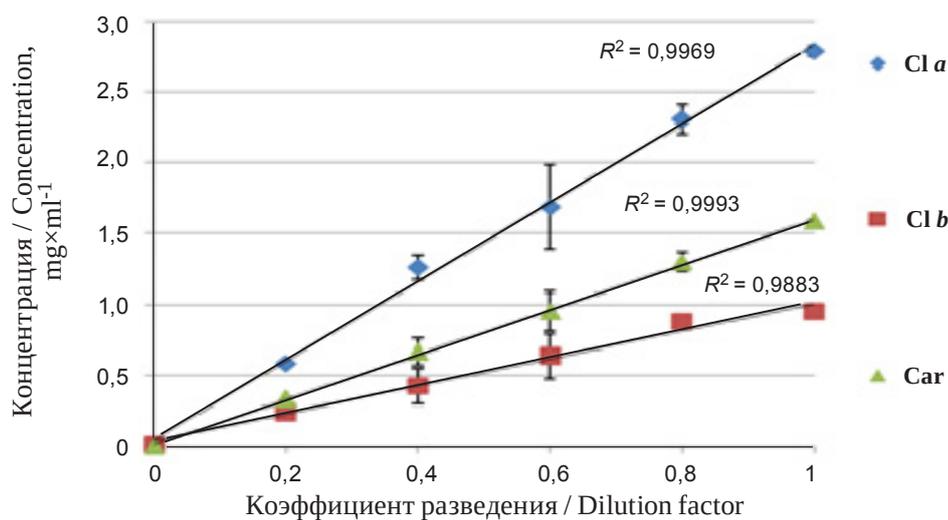


Рис. 2. Зависимость концентрации основных растительных пигментов в спиртовых экстрактах *D. salina* от разведения культуры. Прямые показывают аппроксимационные линейные функции. Над линиями приведены значения достоверности аппроксимации  $R^2$ . Бары показывают стандартные отклонения

Fig. 2. Dependence of the concentration of the main plant pigments in alcoholic extracts of *D. salina* on the dilution of the culture. The straight lines show the approximate linear functions. The values of the approximation reliability  $R^2$  are shown above the lines. Bars show standard deviations



Упрощенная методика позволяет проводить измерения одновременно в нескольких планшетах, при этом общее время анализа занимает не более 1 ч. Корректность измерений подтверждается сохранением соотношения пигментов при разведении. Отношение каротиноидов к общему хлорофиллу постепенно изменяется в процессе роста культуры и особенно заметно при переходе на поздний стационар и в фазу отмирания.

Аналогичные изменения прослеживаются при цветометрических измерениях, что вполне понятно, поскольку цветометрия по сути является колориметрией, освобожденной от искажающего действия светорассеяния.

Динамические показатели популяции, такие как численность, скорость роста/отмирания отражаются на кривой роста, где по оси абсцисс

откладывается время, а по оси ординат – какой-либо биометрический показатель: численность, биомасса, содержание белка, пигментов и др. На рис. 3 приведены зависимость параметра  $\tilde{A}_{680}$  от коэффициента разведения инокуляционной дозы при различных временах культивирования до 72 ч (а) и пример построения кривых по данным цветометрии (R, B) и спектрофотометрии ( $\tilde{A}_{680}$ ) (б) для коэффициента 0,6.

Анализ данных показывает, что коэффициент корреляции для массивов  $\tilde{A}_{680}$  и  $\ln R$  (красного канала) составляет 0,92, а для  $\tilde{A}_{680}$  и  $\ln B$  – 0,8. Этот результат вполне объясним, если принять во внимание, что хлорофиллы имеют два основных максимума поглощения в красной и синей областях спектра видимого диапазона, в то время как каротиноиды – только в синей.

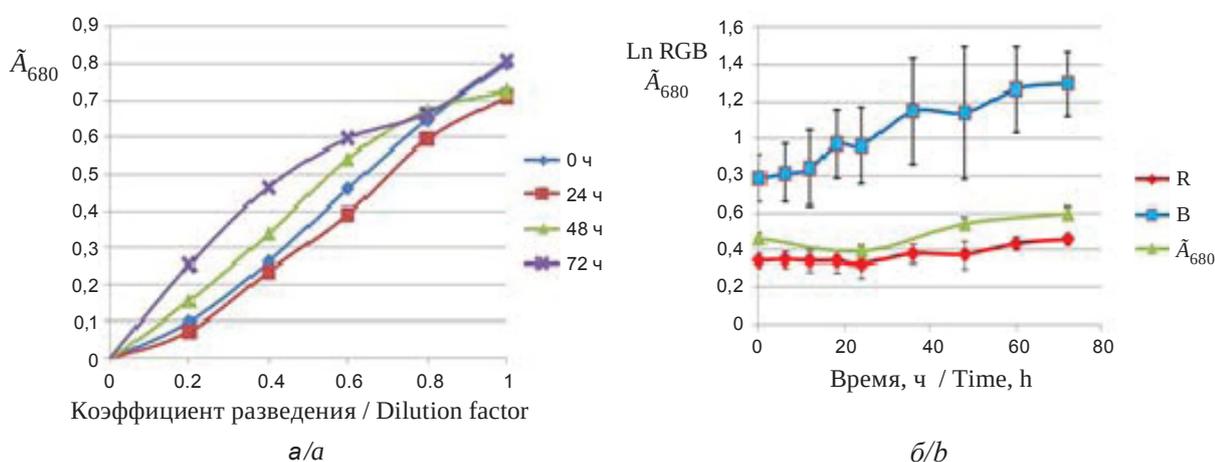


Рис. 3. Зависимость параметра  $\tilde{A}_{680}$  от коэффициента разведения инокуляционной дозы при различных временах культивирования: 0 ч – до 72 ч. Кривые роста культуры *D. salina* по данным цветометрии (R – ромбы, B – квадраты) и спектрофотометрии ( $\tilde{A}_{680}$  – треугольники). Бары показывают стандартные отклонения по трем измерениям (цвет онлайн)

Fig.3. Dependence of the parameter  $\tilde{A}_{680}$  on the dilution factor of the inoculation dose at different cultivation times: 0 h – up to 72 h. Growth curves of the *D. salina* culture according to colorimetry data (R – rhombi, B – squares) and spectrophotometry ( $\tilde{A}_{680}$  – triangles). The bars show the standard deviations of the three dimensions (color online)

### Заключение

Разработанная система цветометрического мониторинга роста и развития микроводоросли *D. salina* предназначена для многофакторного эксперимента, в том числе токсикологического, и позволяет проводить экспрессный предварительный дистанционный неинвазивный скрининг больших массивов образцов на предмет изменения содержания основных растительных пигментов. Достоверность оценки подтверждается высокой степенью корреляции ( $R \geq 0.9$ ) с апробированными спектрофотометрическими методами *in vivo* ( $\tilde{A}_{680}$ ) и *in vitro* (органических

экстрактов). Цифровой анализ цветности позволяет преодолевать такие труднопреодолимые осложнения планшетного культивирования, как неравномерность распределения микроводорослей, в связи с образованием флотирующих и бентосных культур, пузырьков газа и т.п.

### Список литературы

1. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. и перспективы его практического использования. Киев : Наук. думка, 1973. 245 с.
2. Oren A. The ecology of *Dunaliella* in high-salt environ-



- ments // *J. Biol. Res.* 2014. Vol. 21, № 1. P. 23–31. <https://doi.org/10.1186/s40709-014-0023-y>
3. Arun N., Singh D. P. A review on pharmacological applications of halophilic alga *Dunaliella* // *Indian J. Geo-Mar. Sci.* 2016. Vol. 45, № 3. P. 440–447.
  4. Захожий И. Г., Маталин Д. А., Попова Л. Г., Балнокин Ю. В. Ответные реакции фотосинтетического аппарата галотолерантной микроводоросли *Dunaliella maritima* на гиперосмотический солевой шок // *Физиология растений*. 2012. Т. 59, № 1. С. 48–56.
  5. Рабинович Е. Фотосинтез: в 3 т. Т. 2. М. : Изд-во иностр. лит., 1953. 652 с.
  6. Fujiki T., Taguchi S. Variability in chlorophyll a specific absorption coefficient in marine phytoplankton as a function of cell size and irradiance // *J. Plankton Res.* 2002. Vol. 24, № 9. P. 859–874. <https://doi.org/10.1093/plankt/24.9.859>
  7. Kubín Š. *In vivo* chlorophyll determination in suspensions of chlorococcal algae // *Arch. Protistenkd.* 1991. Vol. 139, № 1–4. P. 111–116. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(11\)80012-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(11)80012-6)
  8. Чеканов К. А., Соловченко А. Е. Возможности и ограничения неdestructивного оптического мониторинга культур одноклеточных зеленых водорослей при сбалансированном росте // *Физиология растений*. 2015. Т. 62, № 2. С. 291–300. <https://doi.org/10.7868/S0015330315010030>
  9. Golubev A. A., Prilepskii A. Y., Dykman L. A., Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A. Colorimetric evaluation of the viability of the microalga *Dunaliella salina* as a test tool for nanomaterial toxicity // *Toxicol. Sci.* 2016. Vol. 151, № 1. P. 115–125. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw023>
  10. Shaish A., Mavron A., Ben-Amotz A. Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella bardawil* // *Plant Cell Physiol.* 1990. Vol. 31, № 5. P. 689–696.
  11. Farhat N., Rabhi M., Falleh H., Jouini J., Abdelly C., Smaoui A. Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella salina* (Chlorophyceae)(1) // *J. Phycol.* 2011. Vol. 47, iss. 5. P. 1072–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01036.x>
  1. Masjuk N. P. *Morfologija, sistematika, jekologija, geograficheskoe rasprostranenie roda Dunaliella Teod. i perspektivy ego prakticheskogo ispol'zovanija* [Morphology, systematics, ecology, geographical distribution of the genus *Dunaliella* Teod. and the prospects of its practical use]. Kiev, Naukova dumka Publ., 1973. 245 p. (in Russian).
  2. Oren A. The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *J. Biol. Res.*, 2014, vol. 21, no. 1, pp. 23–31. <https://doi.org/10.1186/s40709-014-0023-y>
  3. Arun N., Singh D. P. A review on pharmacological applications of halophilic alga *Dunaliella*. *Indian J. Geo-Mar. Sci.*, 2016, vol. 45, no. 3, pp. 440–447.
  4. Zahozhij I. G., Matalin D. A., Popova L. G., Balnokin Yu. V. Responses of the photosynthetic apparatus of the halotolerant microalgae *Dunaliella maritima* to hyperosmotic salt shock. *Fiziologija rastenij* [Plant Physiology], 2012, vol. 59, no. 1, pp. 48–56 (in Russian).
  5. Rabinovich E. *Photosynthesis and related processes*: in 3 vols. Vol. 2, part 1. Wiley (Interscience), New York, 1951. 605 p. [Russ. ed.: Rabinovich E. *Fotosintez: v 3 t.* T. 2. Moscow, Izd-vo inostrannoy literatury, 1953. 652 p.]
  6. Fujiki T., Taguchi S. Variability in chlorophyll a specific absorption coefficient in marine phytoplankton as a function of cell size and irradiance. *J. Plankton Res.*, 2002, vol. 24, no. 9, pp. 859–874. <https://doi.org/10.1093/plankt/24.9.859>
  7. Kubín Š. *In vivo* chlorophyll determination in suspensions of chlorococcal algae. *Arch. Protistenkd.*, 1991, vol. 139, no. 1–4, pp. 111–116. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(11\)80012-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(11)80012-6)
  8. Chekanov K. A., Solovchenko A. E. Possibilities and limitations of non-destructive optical monitoring of unicellular green algae cultures with balanced growth. *Fiziologija rastenij* [Plant Physiology], 2015, vol. 62, no. 2, pp. 291–300 (in Russian). <https://doi.org/10.7868/S0015330315010030>
  9. Golubev A. A., Prilepskii A. Y., Dykman L. A., Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A. Colorimetric evaluation of the viability of the microalga *Dunaliella salina* as a test tool for nanomaterial toxicity. *Toxicol. Sci.*, 2016, vol. 151, no. 1, pp. 115–125.
  10. Shaish A., Mavron A., Ben-Amotz A. Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella bardawil*. *Plant Cell Physiol.*, 1990, vol. 31, no. 5, pp. 689–696.
  11. Farhat N., Rabhi M., Falleh H., Jouini J., Abdelly C., Smaoui A. Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella salina* (Chlorophyceae)(1). *J. Phycol.*, 2011, vol. 47, iss. 5, pp. 1072–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01036.x>

## References

Поступила в редакцию 29.01.23; одобрена после рецензирования 03.02.23; принята к публикации 04.02.23  
The article was submitted 29.01.23; approved after reviewing 03.02.23; accepted for publication 04.02.23