

Coumarin-based dye for vital staining of cell cultures

Original Article

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Annenkov V.V.¹, Pal'shin V.A.*¹, Danilovtseva E.N.¹, Zelinskiy S.N.¹

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

ABSTRACT. Fluorescent dyes are widely used in modern biochemical and biological research to assess, in particular, the functional state of cells, cellular components, tissues, and organisms. Blue fluorescent dyes offer the advantage of not interfering with the autofluorescence of biological media in the green-red spectrum. This study aims to design a new affordable blue fluorescent dye capable of penetrating living cells. The structure of prepared dye (ZS-833) combines the blue fluorophore 7-(diethylamino)coumarin with the dimethyl-2-butenedioate moiety. The utility potential of ZS-833 was tested with staining heterotrophic as well as naturally pigmented cells (the *Saccharomyces cerevisiae* yeast and *Gymnodinium corollarium* dinoflagellate). ZS-833 penetrates readily both types of living cells, making them bright fluorescent in the blue and green spectral ranges but leaving dead cells unstained. These data suggest ZS-833 as a promising agent for intravital cell culture staining and visualization of cellular components, especially nonpolar ones.

Keywords: coumarin, fluorescent dye, vital staining, *Gymnodinium corollarium*, *Saccharomyces cerevisiae*

For citation: Annenkov V.V., Pal'shin V.A., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. Coumarin-based dye for vital staining of cell cultures // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1343-1354. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1343

1. Introduction

Fluorescent dyes are widely used in biological and biochemical research for cell imaging and identification, flow cytometry, environmental monitoring, assessment of cell health and physiology, structure, and organelles. Fluorescein diacetate combined with ethidium bromide is conventional for differentiating living and dead cells. (Jarnagin and Luchsinger, 1980; Adams et al., 2014). Non-fluorescent fluorescein diacetate can penetrate living cells, where, affected by esterases, it turns into fluorescein of a bright yellow-green fluorescence. At the same time, the intact cell membrane is impenetrable to ethidium bromide; it stains dead species red-orange by binding to nucleic acids. Some fluorochromes of different colors were used to identify various cellular components, including plasma membrane, theca plates, trichocysts, nucleus, lipid bodies, and vacuoles in two dinoflagellates, *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans*, as well as the green algae *Dunaliella tertiolecta* (Klut et al., 1988). The cell polarity distribution was quantitatively measured with a spiropyran-based fluorescent probe RPS-1 (Park et al., 2020). Trypan blue, Evans blue and neutral red dyes are used to assess microalgae viability (Kim et al., 2024).

Nowadays, fluorescent dyes coming from fluorescein (green fluorescence) and rhodamine (yellow-red fluorescence) derivatives are the most popular (Lavis, 2017; Rajasekar, 2021). However, dyes emitting blue light are of special interest for biological research, since autofluorescence of biological objects usually lies in green or red spectral regions. Coumarin-based compounds are noteworthy among blue fluorochromes. Reactive derivatives of AMCA (aminomethyl coumarin acetic acid), such as the activated ester AMCA-sulfo-NHS, are used for covalent labeling of antibodies and proteins (Grünfelder et al., 2003). Non-fluorescent peptide derivatives of 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) release highly fluorescent free AMC upon enzymatic cleavage that can be used to detect proteases (Gray and Sullivan, 1989). Coumarin 35 is applicable as a molecular probe for serum albumin and DNA, since in their presence, the dye fluorescence intensity increases by 30 and 8.5 times, respectively (Bayraktutan and Onganer, 2017). Hydrophobic coumarin-6 encapsulated in polymer nanoparticles was proposed for optical imaging of cancer (Gregoriou et al., 2023).

*Corresponding author. E-mail address: PVA666@lin.irk.ru (V.A. Pal'shin)

Received: November 24, 2025;

Accepted after revised: December 15, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



This study reports the synthesis of ZS-833, a dye based on coumarin and dimethyl 2-butenedioate moieties, which exhibits blue-green luminescence. The hydrophobic and weakly basic nature of the dye allows it to readily penetrate cell membranes to stain living cells. We tested it on cultures of the *Gymnodinium corollarium* dinoflagellate and the *Saccharomyces cerevisiae* yeast.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Ethyl acetate (Vekton JSC, Petersburg, Russia) was washed with an aqueous sodium bicarbonate solution, distilled water, dried over anhydrous calcium chloride, and distilled. Dichloromethane and hexane (Vekton JSC, Petersburg, Russia) were stirred with concentrated sulfuric acid for four hours, separated from the bottom acid layer, successively washed with distilled water, an aqueous sodium bicarbonate solution, distilled water, followed by drying over anhydrous calcium chloride and distillation. Ethanol was refluxed with KOH and distilled. Acetonitrile was of HPLC grade "0" (Cryochrom LLC, St. Petersburg, Russia). 4-(Diethylamino)salicylaldehyde was 98% pure (Acros Organics). Trimethyl aconitate was synthesized according to (Kar and Argade, 2003). Piperidinium acetate was prepared by mixing equimolar amounts of glacial acetic acid and piperidine upon cooling, followed by grinding the resulting solid mass under dry nitrogen. Ethidium bromide (BioChemica) was used without prior purification. Deionized water (18.2 MΩ cm) was used to prepare aqueous solutions.

2.2. Synthesis of 1,4-dimethyl (2E/Z)-2-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-yl)-2-butenedioate (ZS-833)

A mixture of 4-(diethylamino)-2-hydroxybenzaldehyde (1.17 g, 6.05 mmol), trimethyl aconitate (1.31 g, 6.06 mmol), piperidinium acetate (0.0513 g, 0.353 mmol) in 12 mL of acetonitrile was refluxed under nitrogen during 11.5 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was stirred with 45 mL of distilled water and left to separate. The dark brown oily bottom layer was separated, mixed with 20 mL of dichloromethane, washed with 20 mL of distilled water, and dried over potassium carbonate. Then, the solution was diluted with dichloromethane and mixed with flash chromatography grade silica gel (40-63 μm). The solvent was evaporated on a rotary evaporator, and the loaded silica gel was used for flash chromatographic separation (silica gel 40-63 μm, CH₂Cl₂: acetone = 10: 0.25, R_f = 0.49). Recrystallization from toluene yielded 0.56 g of the product (26%, Scheme 1). Its HPLC chromatogram contained two peaks of almost equal areas from the E- and Z-isomers with the identical ESI-MS spectra: 360.1367 ([M+H]⁺ calcd 360.1442), 382.1193 ([M+Na]⁺ calcd 382.1261), 719.2670 ([2M+H]⁺ calcd 719.2811), 741.2483 ([2M+Na]⁺ calcd 741.2630).

2.3. Instrumentation

HRMS analysis was performed on an Agilent 6210 TOF (time-of-flight) LC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry) System. A sample was dissolved in acetonitrile. Water and acetonitrile with 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid were used as eluting solvents A and B, respectively. The initial mobile phase contained 15% (v/v) of solvent B and was changed linearly to 100% (35 minutes), then held for 25 minutes. The flow rate of the mobile phase was set at 0.1 mL/min. The mobile phase was varied linearly from 15% (v/v) of solvent B at the start to 100% over 35 minutes, then elution was held for 25 minutes more. The mobile phase flow rate was 0.1 mL/min. The conditions for TOF MS were as follows: the mass range was m/z 100 to 500, and scan time was 1 s with an interscan delay of 0.1 s; mass spectra were recorded under electrospray ionization (ESI)⁺, V mode, centroid, normal dynamic range, capillary voltage of 3500 V, desolvation temperature of 325 °C, and nitrogen flow of 5 L/min.

Absorption, excitation, and emission spectra were measured with a SM-2203 spectrofluorimeter (CJSC Spectroscopy, Optics and Lasers-Modern Developments, Republic of Belarus, Minsk) in 10 mm quartz cuvettes. A pulsed xenon lamp was used as an excitation source in the device.

The relative quantum yield of fluorescence was calculated using the equation (Levitus, 2020):

$$Q_S = Q_R \left(\frac{Int_S}{Int_R} \right) \left(\frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A_S}} \right) \left(\frac{n_S}{n_R} \right)^2$$

where the subscripts S and R denote the sample and reference, respectively. Q_R is the known quantum yield of the reference standard; Int is the integrated fluorescence spectrum intensity; A is the absorbance of the solution at the excitation wavelength (λ_{ex}); and n is the refractive index of the solution solvent. Fluorescein disodium salt in 0.1 M NaOH was used as the reference standard.

Vital staining was traced with light and fluorescent microscopy performed on a MOTIC AE-31T inverted microscope with an HBO 103 W/2 OSRAM mercury lamp. Excitation was performed at 470 nm for red, green and yellow emission, and 365 nm—for blue emission. A Moticam Pro 205A camera was used to record images.

2.4. Staining living organisms with ZS-833 dye

Strain *G. corollarium* SCCAP K-0983 was isolated from the northern part of the Baltic Sea, Sweden (Sundström et al., 2009). The monoculture was grown on the f/2-Si medium (Guillard and Ryther, 1962) based on artificial seawater (salinity 11%). Cultivation was carried out in 25–50 mL plastic flasks at a temperature of 4 °C and illumination of 13–21 μmol·m⁻²·s⁻¹ with a day: night interval of 12: 12 h. To study dye uptake into cells, 0.5–1.25 μL of a 1 mM solution of the dye was added to 0.5 mL of the medium with dinoflagellates, followed by observation using a fluorescence micro-

scope. During the observation, the dye concentration in the medium with cells was 1-2.5 μM .

The *S. cerevisiae* yeast, parent-type strain W303-1B (*MATa ade2-1 his3-11* and *15 trp1-1 leu2-3112 ura3-1* [*rho*⁺]) was procured from the collection of Siberian Institute of plant Physiology and Biochemistry (SIPPB SB RAS). The cells of *S. cerevisiae* were maintained at 30 °C on YEPD medium (0.5% yeast extract, 1% peptone, and 2% glucose). The cells were grown at 30 °C in 10 mL plastic vials with 2 mL of liquid YEPD. The experiments were carried out similarly to those described above for the dinoflagellate.

To confirm that ZS-833 dye enters only living cells, ethidium bromide was additionally used (Nikolova et al., 2002; Kwolek-Mirek and Zadrag-Tecza, 2014). Solutions of ZS-833 dye (1 μL , 1 mM) and ethidium bromide (0.5 μL and 2.5 mg/L) were added to 0.5 mL of the medium 20 minutes before the observation.

3. Results and discussion

ZS-833 dye was synthesized by the Knoevenagel reaction between 4-(diethylamino)-2-hydroxybenzaldehyde and trimethyl aconitate in the presence of piperidinium acetate (Scheme 1).

The absorption spectra of ZS-833 solutions demonstrate the main maximum in the range of 440-460 nm. In the case of an aqueous solution, the absorption maximum is shifted to a longer wavelength region relative to 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid (7-DCCA) and QA2 (Chatterjee and Seth, 2013; Zelinskiy et al., 2023) that may be attributed to a longer conjugation system (Fig. 1). When moving to less polar solvents in the water-ethanol-hexane series, a slight shift of the maximum to the shortwave region occurs (Fig. 2). In the case of a hexane solution, the absorption spectrum contains several peaks. For the excitation and emission spectra, a shift to the shortwave region is also observed in the water-ethanol-hexane sequence (Fig. 3). The excitation and emission spectra of an aqueous solution have relatively weak intensities. It may be explained by the poor solubility of the dye in water and its low quantum yield (the solubility limit is $\sim 2.5 \mu\text{M}$ versus $> 10 \mu\text{M}$ for solutions in ethanol or hexane). The fluorescence quantum yield increases upon moving to less polar solvents and reaches 2.3% and 88.8% in water and hexane, respectively (Table 1). We observed a similar solvatochromic effect for other coumarin derivatives (Annenkov et al., 2019; Zelinskiy et al., 2023).

Table 1. Spectral characteristics and relative fluorescence quantum yield (Q) for ZS-833 in different solvents.

Solvent	λ_{ex} , nm	ε *	Q, %
water	425	20.7	2.3
ethanol	450	25.9	23.8
n-hexane	408	28.1	88.8

Note: * – ε ($\times 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) is the extinction coefficient for the excitation wavelength.

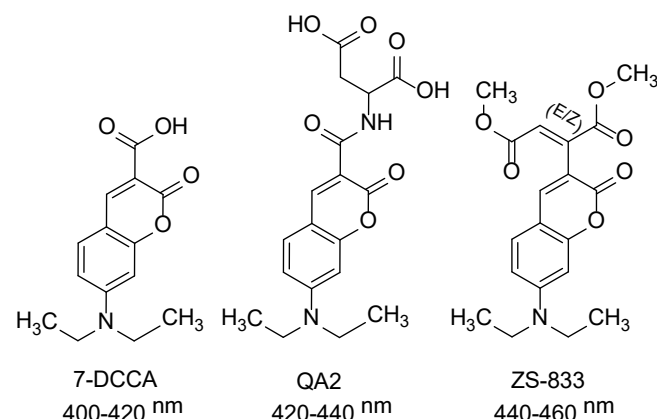


Fig. 1. Structures of 7-DCCA, QA2 and ZS-833 with their absorption maxima for an aqueous medium.

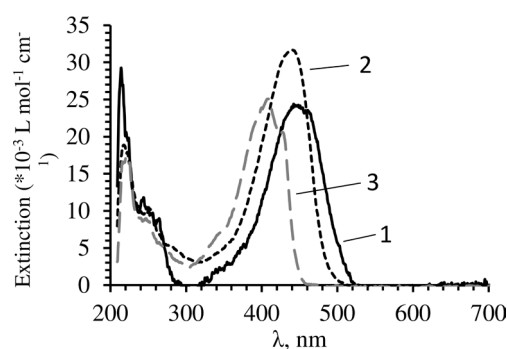
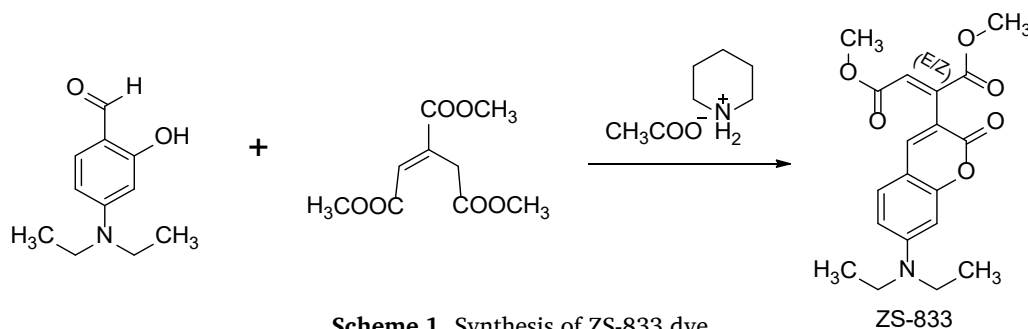


Fig. 2. Absorption spectra of ZS-833 in different solvents. 1–water; 2–ethyl alcohol (95%); and 3–n-hexane. C = 10 μM for ethyl alcohol and hexane, 2.5 μM for an aqueous solution.



Scheme 1. Synthesis of ZS-833 dye

The ability of the ZS-833 fluorescent dye to penetrate living cells was demonstrated using the dinoflagellates *G. corollarium* (Fig. 4d) and the *S. cerevisiae* yeast (Fig. 5a). In a culture medium containing ZS-833, the cells became luminous in blue and green colors characteristic of coumarin dyes (Zelinskiy et al., 2023; Annenkov et al., 2024). The QE2 coumarin-containing dye, which we previously synthesized, imparted only blue fluorescence to *G. corollarium* cells (Zelinskiy et al., 2025). However, in the case of the new dye, ZS-833, green fluorescence persisted during the initial moments of observation, then faded, giving way to the fluorescence of the cell's natural pigments (Fig. 4a-c). At the same time, the blue fluorescence of ZS-833 persisted throughout the observation period, revealing the intracellular structures of the dinoflagellate (Fig. 4e, f). During staining *S. cerevisiae* cells lacking their own pigments, the observed fluorescence was blue and green equally with no fading during the observation (Fig. 5b-d). Since the green fluorescence fading was absent for the yeast, it may be associated with an interaction between the dye and dinoflagellate cell pigments. This phenomenon requires further study.

Both species demonstrated uneven staining of intracellular structures (Figs. 4 and 5), which may result from uneven distribution of the dye within the cell as well as from a brighter fluorescence of its non-polar regions, as the fluorescence quantum yield of ZS-833 is higher for non-polar media (Table 1). It should be emphasized that the dye that we synthesized stains only living cells: when *S. cerevisiae* was stained both with ZS-833 and ethidium bromide, dead cells were stained only red by ethidium bromide that entered them (Fig. 5d).

4. Conclusion

We synthesized a new fluorescent, hydrophobic, and weakly basic dye, ZS-833, based on coumarin and dimethyl-2-butenedioate moieties. The dye effectively

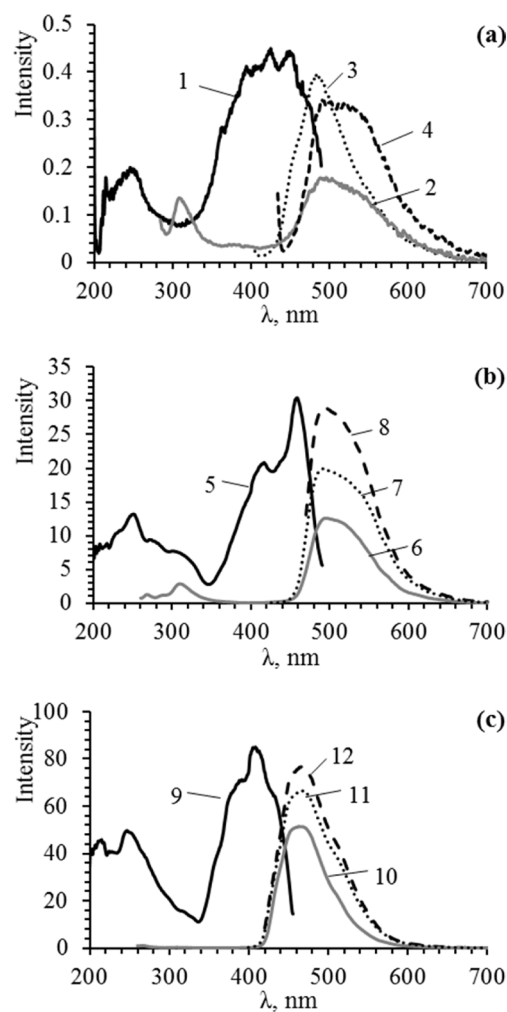


Fig.3. Excitation (1, 5, and 9) and fluorescence spectra of ZS-833 in water (a), ethanol (b), and hexane (c). Emission wavelengths for the excitation spectra: 1 and 5–500 nm, and 9–465 nm. Excitation wavelengths: 2, 6, and 10–250 nm; 3–395 nm; 4–425 nm; 7–416 nm; 8–458 nm; 11–390 nm; and 12–408 nm. C=10 μM for ethyl alcohol and hexane, and C=2.5 μM for an aqueous solution. Monochromator slits are 10 nm for both input and output.

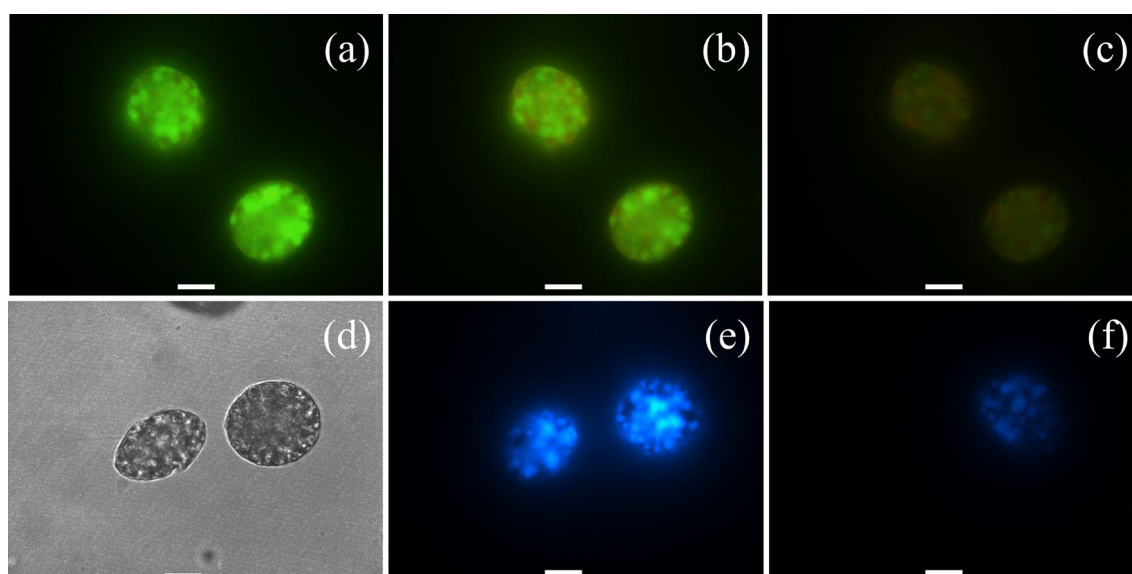


Fig.4. Micrographs of the *G. corollarium* dinoflagellate after the addition of ZS-833: (a)–(c)–green fluorescence decreasing in brightness over time: (a)–the observation beginning; (b) and (c)–different time points within 30 s; (d)–visible light; (e) and (f)–blue fluorescence at the dye concentrations of 1 μM and 0.1 μM, respectively. Scale is 10 μm.

penetrates living cells with a rigid cell wall, such as the heterotrophic yeast, *S. cerevisiae*, and the photosynthetic dinoflagellate, *G. corollarium*. The bright fluorescence in the blue and green spectral regions visualizes this process. Blue fluorescence is optimal for observation of photosynthetic organisms, while green and blue emittances are equally effective for heterotrophic cells. The concentration range of the new dye from 0.01 to 0.1 μM is optimal to ensure high-quality images. The fluorescence of ZS-833 is enhanced in a non-polar environment, which may be helpful for selective staining of non-polar cell regions.

The obtained data allow us to consider ZS-833 a promising agent for intravital staining of cell cultures and visualization of cellular components in the study of their viability, structure and functions.

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Project No. 122012600070-9. The authors thank N.V. Annenkova for the assistance in the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Adams J.K., Briski E., Ram J.L. et al. 2014. Evaluating the response of freshwater organisms to vital staining. *Management of Biological Invasions* 5(3): 197-208. DOI: [10.3391/mbi.2014.5.3.02](https://doi.org/10.3391/mbi.2014.5.3.02)
- Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160: 336-343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)
- Annenkov V., Zelinskiy S., Pal'shin V. et al. 2024. Fluorescein-based vital dye for silicifying organisms. *Dyes and Pigments* 222: 111838. DOI: [10.1016/j.dyepig.2023.111838](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2023.111838)
- Bayraktutan T., Onganer Y. 2017. Spectral-luminescent study of coumarin 35 as fluorescent "light-up" probe for BSA and DNA monitoring. *Dyes and Pigments* 142: 62-68. DOI: [10.1016/j.dyepig.2017.03.019](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.03.019)
- Chatterjee A., Seth D. 2013. Photophysical Properties of 7- (diethylamino)Coumarin-3-carboxylic Acid in the Nanocage of Cyclodextrins and in Different Solvents and Solvent Mixtures. *Photochemistry and Photobiology* 89: 280-293. DOI: [10.1111/php.12000](https://doi.org/10.1111/php.12000)
- Gray C.J., Sullivan J.M. 1989. Synthesis of 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) derivatives and their hydrolysis by plant cysteine proteinases. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 46: 11-26. DOI: [10.1002/jctb.280460103](https://doi.org/10.1002/jctb.280460103)
- Gregoriou Y., Gregoriou G., Manoli A. et al. 2023. Photophysical and biological assessment of coumarin-6 loaded polymeric nanoparticles as a cancer imaging agent. *Sensors & Diagnostics* 2(3): 1277-1285. DOI: [10.1039/D3SD00065F](https://doi.org/10.1039/D3SD00065F)
- Grünfelder C.G., Engstler M., Weise F. et al. 2003. Endocytosis of a Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein via Clathrin-coated Vesicles, Sorting by Default in Endosomes, and Exocytosis via RAB11-positive Carriers. *Molecular Biology of the Cell* 14: 2029 – 2040. DOI: [10.1091/mbc.e02-10-0640](https://doi.org/10.1091/mbc.e02-10-0640)

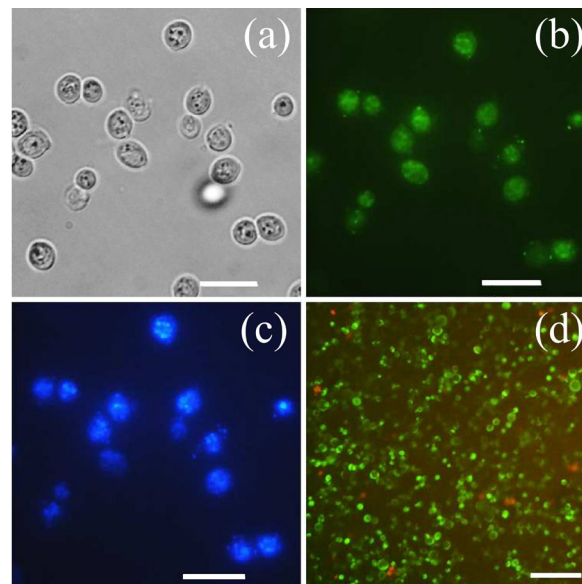


Fig.5. Visible (a) and fluorescent (b-d) micrographs of the *S. cerevisiae* yeast in 5 (a-c) and 20 minutes (d) after the addition of ZS-833, $C = 1 \mu\text{M}$. Green fluorescence (d) corresponds to the living cells with ZS-833; red fluorescence—the dead ones with ethidium bromide. Scale: (a-c) = 10 μm ; and (d) = 20 μm .

Guillard R.R.L., Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229–239. DOI: [10.1139/m62-029](https://doi.org/10.1139/m62-029)

Jarnagin J.L., Luchsinger D.W. 1980. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol* 55(4): 253-258. DOI: [10.3109/10520298009067249](https://doi.org/10.3109/10520298009067249)

Kar A., Argade N.P. 2003. A facile access to natural and unnatural dialkylsubstituted maleic anhydrides. *Tetrahedron* 59: 2991-2998. DOI: [10.1016/S0040-4020\(03\)00410-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00410-1)

Kim T., Pradhan B., Ki J.-S. 2024. Staining to machine learning: An emerging technology for determination of microalgal cell viability. *Journal of Applied Phycology* 36: 2573–2592. DOI: [10.1007/s10811-024-03274-2](https://doi.org/10.1007/s10811-024-03274-2)

Klut M.E., Bisputra T., Anita N.J. 1988. The use of fluorochromes in the cytochemical characterization of some phytoflagellates. *Histochemical Journal* 20: 35-40. DOI: [10.1007/bf01745967](https://doi.org/10.1007/bf01745967)

Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R. 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research* 14(7): 1068–1079. DOI: [10.1111/1567-1364.12202](https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202)

Lavis L.D. 2017. Teaching Old Dyes New Tricks: Biological Probes Built from Fluoresceins and Rhodamines. *Annual Review of Biochemistry* 86: 825–43. DOI: [10.1146/annurev-biochem-061516-044839](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044839)

Levitus M. 2020. Tutorial: Measurement of fluorescence spectra and determination of relative fluorescence quantum yields of transparent samples. *Methods and Applications in Fluorescence* 8(3): 033001. DOI: [10.1088/2050-6120/ab7e10](https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7e10)

Nikolova M., Savova I., Marinov M. 2002. An optimised method for investigation of the yeast viability by means of fluorescent microscopy. *Journal of Culture Collections* 3: 66-71. URL: <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/1187/1/cc02010.pdf>

Park S.J., Juvekar V., Jo J.H. et al. 2020. Combining hydrophilic and hydrophobic environment sensitive dyes to detect a wide range of cellular polarity. *Chemical Science* 11: 596-601. DOI: [10.1039/C9SC04859F](https://doi.org/10.1039/C9SC04859F)

Rajasekar M. 2021. Recent Trends in Rhodamine derivatives as fluorescent probes for biomaterial applications. *Journal of Molecular Structure* 1235: 130232. DOI: [10.1016/j.molstruc.2021.130232](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130232)

Sundström A.M., Kremp A., Daugbjerg N. et al. 2009. *Gymnodinium Corollarium* sp. nov. (Dinophyceae)— A new cold-water dinoflagellate responsible for cyst sedimentation

events in the Baltic Sea. *Journal of Phycology* 952: 938-952. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x)

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Strelova M.S. et al. 2023. Coumarin-based acid dye for fluorescent staining of calcium carbonate particles. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 244-252. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-244](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-244)

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Glyzina O.Yu. et al. 2025. Weakly basic fluorescent dye for vital staining of calcium structures in living organisms. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 1289–1304. DOI: [10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289)

Краситель на основе кумарина для прижизненного окрашивания клеточных культур

Оригинальная статья

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGYАнненков В.В.^{ORCID}, Пальшин В.А.*^{ORCID}, Даниловцева Е.Н.^{ORCID}, Зелинский С.Н.^{ORCID}

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, 3 ул. Улан-Баторская, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Флуоресцентные красители находят широкое применение в современных биохимических и биологических исследованиях, позволяя, в частности, оценивать функциональное состояние клеток, клеточных компонентов, тканей и организмов. Красители с синей флуоресценцией обладают преимуществом, поскольку их свечение не перекрывается с автофлуоресценцией биологических сред в зелёно-красной области спектра. Целью данного исследования было создание нового доступного синего флуоресцентного красителя, способного проникать в живые клетки. Полученный краситель ZS-833 сочетает в своей структуре синий флуорофор 7-(диэтиламино)кумарин с диметил-2-бутендиоатом. Для оценки возможностей ZS-833 им окрашивали и гетеротрофные, и содержащие собственные пигменты клетки (дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и динофлагелляты *Gymnodinium corollarium*). Показано, что ZS-833 способен быстро проникать в оба варианта живых клеток, придавая им яркое свечение в синей и зелёной области спектра. При этом мертвые клетки не окрашивались. Полученные данные позволяют рассматривать ZS-833 в качестве перспективного агента для прижизненного окрашивания клеточных культур и, визуализации клеточных компонентов, в особенности неполярно заряженных.

Ключевые слова: кумарин, флуоресцентный краситель, прижизненная окраска, *Gymnodinium corollarium*, *Saccharomyces cerevisiae*

Для цитирования: Анненков В.В., Пальшин В.А., Даниловцева Е.Н., Зелинский С.Н. Краситель на основе кумарина для прижизненного окрашивания клеточных культур // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - С. 1343-1354. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1343

1. Введение

Флуоресцентные красители находят обширное применение в биологических и биохимических исследованиях для визуализации и идентификации клеток, проточной цитометрии, мониторинга в экологических исследованиях, оценки здоровья и физиологии клеток, их структуры и органелл. Сочетание диацетата флуоресцеина и бромистого этидия является классическим для дифференциации живых и мертвых клеток (Jarnagin and Luchsinger, 1980; Adams et al., 2014). Нефлуоресцентный диацетат флуоресцеина способен проникать в живую клетку и под воздействием эстераз превращаться во флуоресцеин, обладающий яркой жёлто-зелёной флуоресценцией, то время как для бромистого этидия неповреждённая клеточная мембрана непреодолима, он окрашивает мертвые организмы в красно-оранжевый цвет, связываясь с нуклеиновыми

кислотами. С помощью ряда флуорохромов разных цветов у двух динофлагеллят (*Amphidinium carterae* и *Prorocentrum micans*) и зелёной водоросли *Dunaliella tertiolecta* удалось выявить различные клеточные компоненты, включая плазматическую мембрану, пластинки теки, трихоцисты, ядро, липидные тельца и вакуоли (Klut et al., 1988). Флуоресцентный зонд RPS-1 на основе спиропирановой системы позволил количественно измерить распределение клеточной полярности (Park et al., 2020). Для оценки жизнеспособности микроводорослей используются такие красители, как трипановый синий, синий Эванса и нейтральный красный (Kim et al., 2024).

В целом, на данный момент среди популярных флуоресцентных красителей доминируют производные флуоресцеина, обладающие зелёным свечением, и родамина, флуоресцирующие в жёлто-красной области спектра (Lavis, 2017; Rajasekar, 2021). Однако для биологических исследований

*Автор для переписки. Адрес e-mail: PVA666@lin.irk.ru (В.А. Пальшин)

Поступила: 24 ноября 2025;

Принята после доработки: 15 декабря 2025;

Опубликована online: 25 декабря 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



особый интерес представляют красители, испускающие синий свет, поскольку автофлуоресценция биологических объектов лежит, как правило, в зелёной, либо красной областях спектра. Среди синих флуорохромов можно отметить соединения на основе кумарина. Реакционноспособные производные АМСА (аминометилкумаринуксусная кислота), например, активированный эфир АМСА-sulfo-NHS применяют для ковалентного мечения антител и белков (Grünfelder et al., 2003). Нефлуоресцентные пептидные производные 7-амино-4-метилкумарина (АМС) при расщеплении ферментами высвобождают высокофлуоресцентный свободный АМС, что можно использовать для обнаружения протеиназ (Gray and Sullivan, 1989). Кумарин 35 может быть использован как молекулярный зонд чувствительный к сывороточному альбумину и ДНК, поскольку в их присутствии интенсивность свечения кумарина 35 увеличивалась в 30 и 8,5 раз соответственно (Bayraktutan and Onganer, 2017). Гидрофобный кумарин-6, инкапсулированный в полимерные наночастицы, был предложен для оптической визуализации рака (Gregoriou et al., 2023).

Настоящее исследование представляет синтез красителя ZS-833 на основе кумарина и диметил-2-бутендиоксидата, обладающего люминесценцией в сине-зелёной области спектра. Гидрофобный слабоосновный характер красителя позволил ему легко проникать сквозь клеточные мембраны, окрашивая живые клетки, что было протестировано на культурах динофлагеллят *Gymnodinium corollarium* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Материалы и методы

2.1. Реагенты

Этилацетат (АО «Вектон», Санкт-Петербург) промывали раствором гидрокарбоната натрия, дистиллированной водой, сушили над безводным хлоридом кальция с последующей перегонкой. Дихлорметан (АО «Вектон», Санкт-Петербург) перемешивали с концентрированной серной кислотой в течение 4 часов, отделяли от нижнего кислотного слоя, последовательно промывали дистиллированной водой, водным раствором гидрокарбоната натрия, дистиллированной водой, сушили над безводным хлоридом кальция и перегоняли. Гексан (АО «Вектон», Санкт-Петербург) очищали перемешиванием с серной кислотой, после этого промывали раствором соды и водой, осушали над хлоридом кальция и перегоняли. Этанол кипятили с КОН и перегоняли. Ацетонитрил был сорта 0 (ООО «Криохром», Санкт-Петербург). 4-(Диэтиламино)салицилальдегид был 98% чистоты (Acros Organics). Триметилаконитат синтезировали согласно (Kar and Argade, 2003). Ацетат пиперидиния получали смешением эквимольных количеств ледяной уксусной кислоты и пиперидина при охлаждении с последующим перетиранием образовавшейся твёрдой массы в атмосфере сухого азота. Бромистый этидий (BioChemica) использовали без предварительной очистки. Для приготовления водных рас-

творов использовали деионизованную воду (18,2 МОм·см).

2.2. Синтез 1,4-диметил (2E/Z)-2-(7-(диэтиламино)-2-оксо-2H-1-бензопиран-3-ил)-2-бутендиоксидата (ZS-833)

Смесь 1,17 г (6,05 ммоль) 4-(диэтиламино)-2-гидроксibenзальдегида, 1,31 г (6,06 ммоль) триметилаконитата, 0,0513 г (0,353 ммоль) ацетата пиперидиния в 12 мл ацетонитрила кипятили с обратным холодильником в атмосфере азота в течение 11,5 часов. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь перемешивали с 45 мл дистиллированной воды и оставляли для разделения фаз. Темно-коричневый маслянистый нижний слой отделяли, смешивали с 20 мл дихлорметана, промывали 20 мл дистиллированной воды и высушивали над карбонатом калия. Затем раствор разбавляли дихлорметаном и смешивали с силикагелем для флэш-хроматографии (40-63 мкм). Растворитель выпаривали на ротационном испарителе, а силикагель с нанесённым образцом использовали для флэш-хроматографического разделения (силикагель 40-63 мкм, CH₂Cl₂:ацетон = 10:0,25, R_f = 0,49). После перекристаллизации из толуола получили 0,56 г продукта (26%, схема 1). Его ВЭЖХ хроматограмма содержала два практически одинаковых по площади пика E- и Z-изомеров с одинаковыми спектрами ESI-MS: 360,1367 ([M+H]⁺ расч. 360,1442), 382,1193 ([M+Na]⁺ расч. 382,1261), 719,2670 ([2M+H]⁺ расч. 719,2811), 741,2483 ([2M+Na]⁺ расч. 741,2630).

2.3. Приборы

Анализ HRMS проводили при помощи системы Agilent 6210 TOF (времяпролётная) LC/MS (жидкостная хроматография/масс-спектрометрия). Образец растворяли в ацетонитриле. В качестве элюирующих растворителей А и В использовали воду и ацетонитрил с 0,1% добавкой по объёму трифторуксусной кислоты. Состав подвижной фазы линейно менялся от 15% растворителя В до 100% за 35 минут, затем элюирование продолжалось ещё в течение 25 минут. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,1 мл/мин. Условия проведения TOF MS: диапазон масс m/z от 60 до 3200, время сканирования 1 секунда с задержкой между сканированиями 0,1 с; масс-спектры записывали при ионизации электрораспылением (ESI)⁺, режим V, центроид, нормальный динамический диапазон, капиллярное напряжение 3500 В, температура десольватации 325 °С и поток азота 5 л/мин.

Спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции измеряли в 1 см кварцевых кюветах на спектрофлуориметре CM-2203 (ЗАО «Спектроскопия, Оптика и Лазеры – Авангардные Разработки», Республика Беларусь, г. Минск). В качестве источника возбуждения в устройстве использовалась импульсная ксеноновая лампа.

Относительный квантовый выход флуоресценции рассчитывали по формуле (Levitus, 2020):

$$Q_S = Q_R \left(\frac{Int_S}{Int_R} \right) \left(\frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A_S}} \right) \left(\frac{n_S}{n_R} \right)^2$$

где подстрочные индексы *S* и *R* обозначают краситель и стандарт сравнения. Q_R - известный квантовый выход стандарта сравнения, *Int* - интеграл спектра флуоресценции, *A* - поглощение при длине волны возбуждения флуоресценции (λ_{ex}), *n* - коэффициент преломления растворителя. В качестве стандарта сравнения использовали динатриевую соль флуоресцеина в 0,1 М NaOH.

Изучения прижизненной окраски наблюдали при помощи световой и флуоресцентной микроскопии на инвертированном микроскопе MOTIC AE-31T с ртутной лампой HBO 103 W/2 OSRAM. Длина волны возбуждения 470 нм для красной, зелёной и жёлтой эмиссии и 365 нм для синей эмиссии. Запись изображений осуществляли на камеру Moticam Pro 205A.

2.4. Окрашивание живых организмов красителем ZS-833

Штамм динофлагеллят *G. corollarium* SCCAP K-0983 выделен из северной части Балтийского моря, Швеция (Sundström et al., 2009). Монокультуру выращивали на среде f/2-Si (Guillard and Ryther, 1962) на основе искусственной морской воды (солёность 11%). Культивирование проводили в пластиковых колбах объёмом 25–50 мл при температуре 4 °C и освещённости 13–21 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ с режимом день: ночь 12: 12 ч. Для изучения вхождения красителя в клетку к 0,5 мл среды с динофлагеллятами добавляли 0,5 - 1,25 мкл красителя концентрацией 1 мМ и наблюдали вхождение красителя в клетки с помощью флуоресцентного микроскопа. Концентрация красителя в среде с клетками при наблюдении 1-2,5 μM.

Дрожжи *S. cerevisiae*, штамм W303-1B (*MATa ade2-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3112 ura3-1 [rho⁺]*), получены из коллекции Сибирского института физиологии и биохимии растений (СИФИБР СО РАН). Клетки *S. cerevisiae* содержали при температуре 30°C на среде YEPD (0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % пептона, 2 % глюкозы). Культуру клеток выращивали при температуре 30°C в пластиковых флаконах объёмом 10 мл с 2 мл жидкой среды YEPD. Эксперименты проводили аналогично вышеописанному для динофлагеллят.

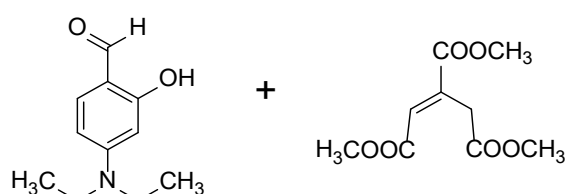


Схема 1. Синтез красителя ZS-833.

Для подтверждения того, что краситель ZS-833 входит только в живые клетки, дополнительно использовали бромистый этидий (Nikolova et al., 2002; Kwolek-Mirek and Zadrag-Tecza, 2014). К 0,5 мл среды добавляли 1 мкл красителя ZS-833 (1 мМ) и 0,5 мкл бромистого этидия (2,5 мг/л) за 20 минут до наблюдения.

3. Результаты и обсуждение

Краситель ZS-833 синтезировали по реакции Кневенагеля между 4-(диэтиламино)-2-гидроксibenзальдегидом и триметилаконитатом в присутствии ацетата пиперидиния (Схема 1).

Основной максимум в спектрах поглощения растворов ZS-833 находится в диапазоне 440-460 нм. В случае водного раствора максимум поглощения смещен в более длинноволновую область относительно 7-(диэтиламино)кумарин-3-карбоновой кислоты (7-DCCA) и QA2 (Chatterjee and Seth, 2013; Zelinskiy et al., 2023), что связано с более длинной системой сопряжения (Рис. 1). При переходе к менее полярным растворителям в ряду вода – этанол – гексан происходит небольшое смещение максимума в коротковолновую область (Рис. 2). В случае раствора в гексане в спектре поглощения наблюдается несколько пиков. Для спектров возбуждения и испускания при переходе вода – этанол - гексан также наблюдается смещение в коротковолновую область (Рис. 3). Спектры возбуждения и испускания для водного раствора имеют довольно слабые интенсивности, что, связано с плохой растворимостью красителя в воде и маленьким квантовым выходом (предел растворимости около 2,5 μM

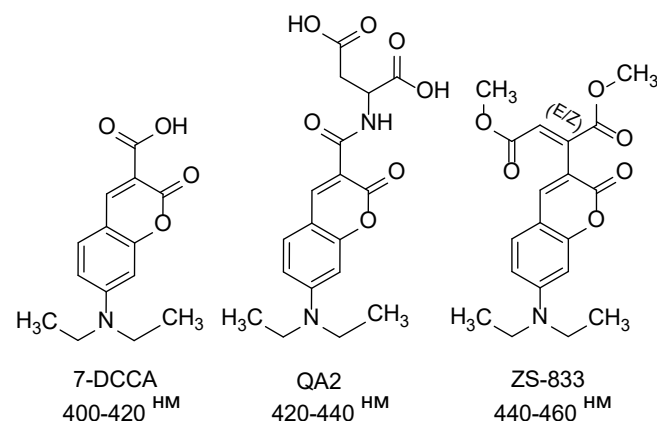
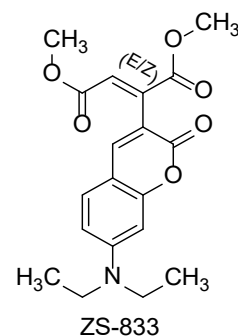


Рис.1. Структурные формулы 7-DCCA, QA2 и ZS-833 с максимумами поглощения в воде.



против более чем 10 μM для растворов в этаноле или гексане). Квантовый выход флуоресценции повышается при переходе к менее полярным растворителям и достигает 2,3 % и 88,8 % в воде и гексане соответственно (Таблица 1). Аналогичный сольватохромный эффект мы наблюдали для других производных кумарина (Annenkov et al., 2019; Zelinskiy et al., 2023).

Способность флуоресцентного красителя ZS-833 проникать в живые клетки продемонстрирована на примере динофлагеллят *G. corollarium* (Рис. 4г) и дрожжей *S. cerevisiae* (Рис. 5а). В культуральной среде, содержащей ZS-833, клетки приобретали синее и зеленое свечения, характерные для кумариновых красителей (Zelinskiy et al., 2023; Annenkov et al., 2024). Синтезированный нами ранее кумарин-содержащий краситель QE2 придавал клеткам *G. corollarium* лишь синее свечение (Zelinskiy et al., 2025). Однако, в случае с новым красителем ZS-833 в первые моменты наблюдения сохранялась зеленая флуоресценция, затем затухая и уступая свечению пигментов самой клетки (Рис. 4а-в). В тоже время синяя флуоресценция ZS-833 сохранялась на протяжении всего времени наблюдений, выявляя внутриклеточные структуры динофлагеллят (Рис. 4д, е). При окрашивании клеток *S. cerevisiae*, лишенных собственных пигментов, в равной степени наблюдалось синие и зеленое свечения, не затухающие в процессе наблюдения (Рис. 5б-г). Поскольку эффект затухания зеленого свечения не наблюдался при окрашивании дрожжей, возможно, он обусловлен взаимодействием красителя с пигментами клеток динофлагеллят, этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Для обоих организмов показано неравномерное окрашивание внутриклеточных структур (Рис. 4 и 5), что может быть связано как с неравномерным распределением красителя внутри клетки, так и с более ярким свечением ее неполярных участков, поскольку в неполярной среде повышается квантовый выход флуоресценции ZS-833 (Таблица 1). Следует подчеркнуть, что синтезированный нами краситель окрашивает только живые клетки: при совместном окрашивании *S. cerevisiae* красителем ZS-833 и бромистым этидием мертвые клетки окрашивались лишь красным от вошедшего в них бромистого этидия (Рис. 5г).

4. Выводы

Синтезирован новый флуоресцентный гидрофобный слабоосновный краситель ZS-833 на основе кумарина и диметил-2-бутендиоата. Показано, что краситель способен эффективно проникать внутрь живых клеток, окруженных жесткой клеточной стенкой, таких как гетеротрофные дрожжи *S. cerevisiae* и фотосинтезирующие динофлагелляты *G. corollarium*. При этом визуализируется яркое свечение в синей и зелёной области спектра. Для фотосинтезирующих организмов оптимальнее использование синего свечения, в то время как для гетеротрофных клеток равно эффективно наблюдение в зеленом и синем свете. Оптимальный диапазон concentra-

Таблица 1. Спектральные свойства и квантовый выход люминесценции (Q) красителя ZS-833 в разных растворителях.

Растворитель	λ_{ex} , нм	ϵ^*	Q, %
вода	425	20,7	2,3
этанол	450	25,9	23,8
н-гексан	408	28,1	88,8

Примечание: * – $\epsilon \cdot 10^{-3}$ л моль⁻¹ см⁻¹ молярный коэффициент экстинкции на длине волны возбуждения.

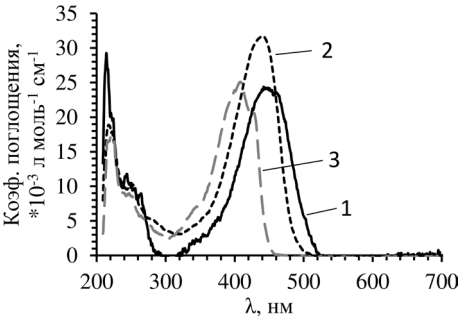


Рис.2. Спектры поглощения красителя ZS-833 в разных растворителях. 1 – в воде, 2 – в этиловом спирте (95%), 3 – в н-гексане. Концентрация 10 μM (2,5 μM для водного раствора).

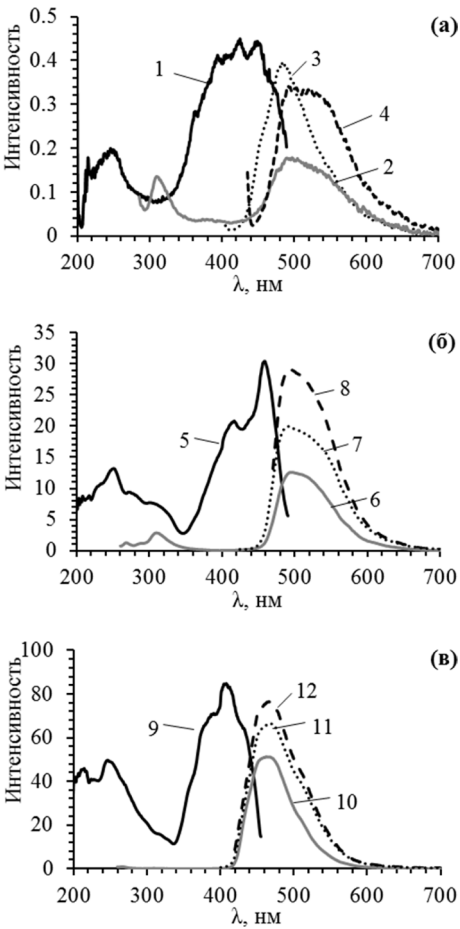


Рис.3. Спектры возбуждения (1, 5, 9) и флуоресценции красителя ZS-833 в воде (а), этаноле (б) и гексане (в). Длины волн испускания для спектров возбуждения: 1 и 5- 500, 9- 465 нм. Длины волн возбуждения: 2, 6, 10- 250, 3- 395, 4- 425, 7- 416, 8- 458, 11- 390, 12- 408 нм. Концентрация 10 μM (2,5 μM для водного раствора). Спектральные ширины щелей на возбуждение и испускание – 10 нм.

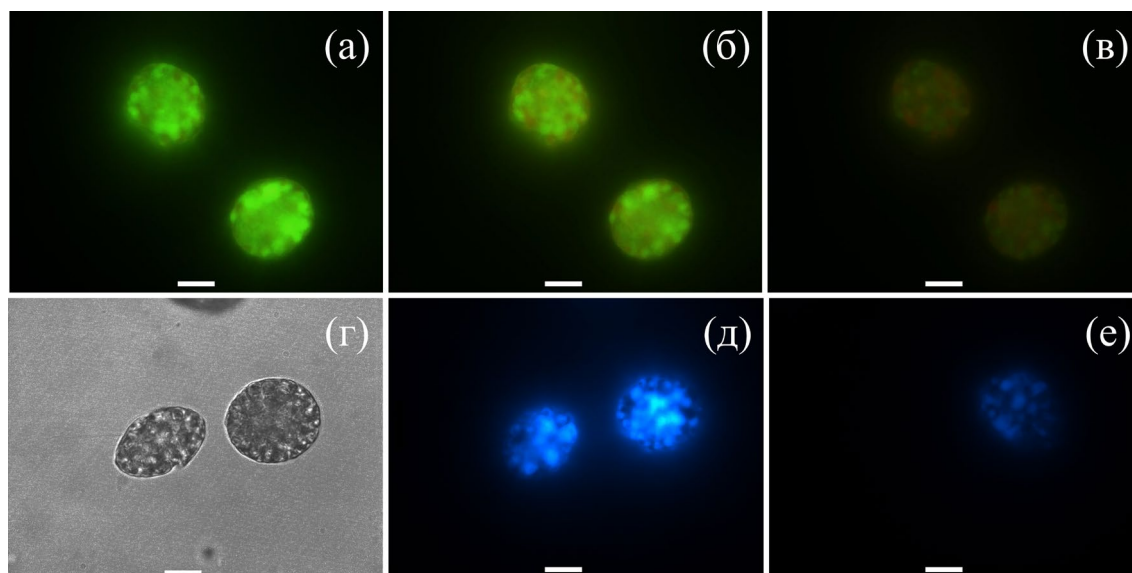


Рис.4. Микрофотографии динофлагеллят *G. corollarium* с добавлением красителя ZS-833: (а) – (в) – зеленая флуоресценция, с течением времени уменьшающая яркость: а) начало наблюдений, (б) и (в) – в разные моменты времени на масштабе 30 секунд. (г) – видимый свет, (д) и (е) – синяя флуоресценция при концентрациях красителя 1 μM и 0,1 μM соответственно. Масштаб 10 мкм.

ций нового красителя, обеспечивающий получение качественных изображений, составляет 0,01–0,1 мкм. Флуоресценция ZS-833 усиливается в неполярном окружении, что может помочь избирательному окрашиванию неполярных областей в клетке.

Полученные данные позволяют рассматривать ZS-833 в качестве перспективного агента для прижизненного окрашивания клеточных культур и визуализации клеточных компонентов, изучения их жизнеспособности, строения и функций.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 122012600070-9. Авторы выражают благодарность Н. В. Анненковой за помощь в работе над финальным текстом публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Adams J.K., Briski E., Ram J.L. et al. 2014. Evaluating the response of freshwater organisms to vital staining. *Management of Biological Invasions* 5(3): 197-208. DOI: [10.3391/mbi.2014.5.3.02](https://doi.org/10.3391/mbi.2014.5.3.02)
- Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160: 336-343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)
- Annenkov V., Zelinskiy S., Pal'shin V. et al. 2024. Fluorescein-based vital dye for silicifying organisms. *Dyes and Pigments* 222: 111838. DOI: [10.1016/j.dyepig.2023.111838](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2023.111838)

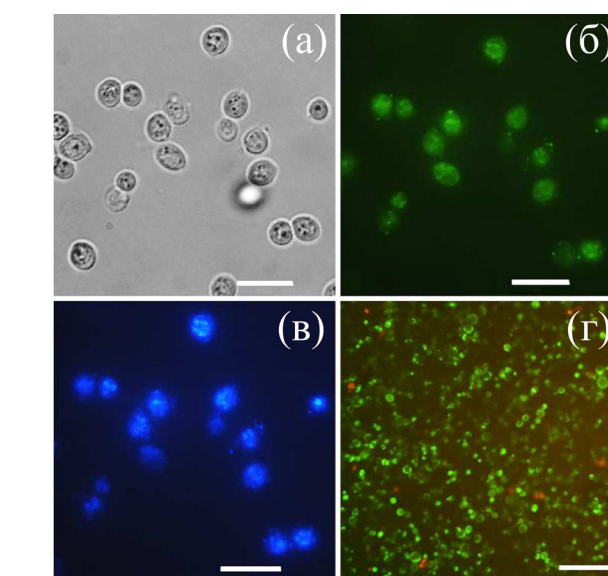


Рис.5. Видимая (а) и флуоресцентные (б-г) микрофотографии дрожжей *S. cerevisiae* через 5 мин (а-в) и 20 мин (г) после добавления красителя ZS-833-3 в концентрации 1 μM . Зеленая флуоресценция (г) соответствует живым клеткам с красителем ZS-833, красная – мертвым с бромистым этидием. Масштаб: (а – в) 10 мкм, (г) – 20 мкм.

- Bayraktutan T., Onganer Y. 2017. Spectral-luminescent study of coumarin 35 as fluorescent “light-up” probe for BSA and DNA monitoring. *Dyes and Pigments* 142: 62-68. DOI: [10.1016/j.dyepig.2017.03.019](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.03.019)

- Chatterjee A., Seth D. 2013. Photophysical Properties of 7- (diethylamino)Coumarin-3-carboxylic Acid in the Nanocage of Cyclodextrins and in Different Solvents and Solvent Mixtures. *Photochemistry and Photobiology* 89: 280-293. DOI: [10.1111/php.12000](https://doi.org/10.1111/php.12000)

- Gray C.J., Sullivan J.M. 1989. Synthesis of 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) derivatives and their hydrolysis

by plant cysteine proteinases. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 46: 11-26. DOI: [10.1002/jctb.280460103](https://doi.org/10.1002/jctb.280460103)

Gregoriou Y., Gregoriou G., Manoli A. et al. 2023. Photophysical and biological assessment of coumarin-6 loaded polymeric nanoparticles as a cancer imaging agent. *Sensors & Diagnostics* 2(3): 1277-1285. DOI: [10.1039/D3SD00065F](https://doi.org/10.1039/D3SD00065F)

Grünfelder C.G., Engstler M., Weise F. et al. 2003. Endocytosis of a Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein via Clathrin-coated Vesicles, Sorting by Default in Endosomes, and Exocytosis via RAB11-positive Carriers. *Molecular Biology of the Cell* 14: 2029 – 2040. DOI: [10.1091/mbc.e02-10-0640](https://doi.org/10.1091/mbc.e02-10-0640)

Guillard R.R.L., Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229–239. DOI: [10.1139/m62-029](https://doi.org/10.1139/m62-029)

Jarnagin J.L., Luchsinger D.W. 1980. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol* 55(4): 253-258. DOI: [10.3109/10520298009067249](https://doi.org/10.3109/10520298009067249)

Kar A., Argade N.P. 2003. A facile access to natural and unnatural dialkylsubstituted maleic anhydrides. *Tetrahedron* 59: 2991-2998. DOI: [10.1016/S0040-4020\(03\)00410-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00410-1)

Kim T., Pradhan B., Ki J.-S. 2024. Staining to machine learning: An emerging technology for determination of microalgal cell viability. *Journal of Applied Phycology* 36: 2573–2592. DOI: [10.1007/s10811-024-03274-2](https://doi.org/10.1007/s10811-024-03274-2)

Klut M.E., Bislputra T., Anita N.J. 1988. The use of fluorochromes in the cytochemical characterization of some phytoflagellates. *Histochemical Journal* 20: 35-40. DOI: [10.1007/bf01745967](https://doi.org/10.1007/bf01745967)

Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R. 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research* 14(7): 1068–1079. DOI: [10.1111/1567-1364.12202](https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202)

Lavis L.D. 2017. Teaching Old Dyes New Tricks: Biological Probes Built from Fluoresceins and Rhodamines. *Annual Review of Biochemistry* 86: 825–43. DOI: [10.1146/annurev-biochem-061516-044839](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044839)

Levitus M. 2020. Tutorial: Measurement of fluorescence spectra and determination of relative fluorescence quantum yields of transparent samples. *Methods and Applications in Fluorescence* 8(3): 033001. DOI: [10.1088/2050-6120/ab7e10](https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7e10)

Nikolova M., Savova I., Marinov M. 2002. An optimised method for investigation of the yeast viability by means of fluorescent microscopy. *Journal of Culture Collections* 3: 66-71. URL: <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/1187/1/cc02010.pdf>

Park S.J., Juvekar V., Jo J.H. et al. 2020. Combining hydrophilic and hydrophobic environment sensitive dyes to detect a wide range of cellular polarity. *Chemical Science* 11: 596-601. DOI: [10.1039/C9SC04859F](https://doi.org/10.1039/C9SC04859F)

Rajasekar M. 2021. Recent Trends in Rhodamine derivatives as fluorescent probes for biomaterial applications. *Journal of Molecular Structure* 1235: 130232. DOI: [10.1016/j.molstruc.2021.130232](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130232)

Sundström A.M., Kremp A., Daugbjerg N. et al. 2009. *Gymnodinium Corollarium* sp. nov. (Dinophyceae)— A new cold-water dinoflagellate responsible for cyst sedimentation events in the Baltic Sea. *Journal of Phycology* 952: 938-952. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x)

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Strelova M.S. et al. 2023. Coumarin-based acid dye for fluorescent staining of calcium carbonate particles. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 244-252. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-244](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-244)

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Glyzina O.Yu. et al. 2025. Weakly basic fluorescent dye for vital staining of calcium structures in living organisms. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 1289–1304. DOI: [10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289)