

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Соломоновой Екатерины Сергеевны «Оценка физиологического состояния микроводорослей с помощью цитометрических и флуоресцентных показателей», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16 — гидробиология.

Диссертационная работа Соломоновой Екатерины Сергеевны посвящена изучению физиологического состояния микроводорослей с помощью цитометрических и флуоресцентных показателей. Автор останавливается на разборе и оценке мертвых и живых клеток, организмов с разным физиологическим состоянием. Сама тема работы является очень важной, так как является краеугольным камнем в современной гидробиологии. Работа имеет как фундаментальное, так и прикладное значение, так как оценка состояния микроводорослей является важным показателем для анализа фитопланктонных или других сообществ. Развитие этого направления позволяет нам механизировать методы оценки сообществ, что значительно продвигает нас в использовании экологического мониторинга, методов выращивания водорослей для целей биотехнологии, получения различных веществ из этих очень интересных и перспективных организмов.

В целом, **актуальность избранной темы, её новизна несомненны, цели и задачи исследования, степень обоснованности защищаемых положений**, выдвинутые Екатериной Сергеевной в рукописи диссертации и автореферате выполнены полностью и успешно рассмотрены в соответствующих главах и разделах, о чем подробно будет сказано ниже. В практическом плане результаты работы могут быть использованы для решения вопросов охраны и использования ресурсов водоёмов, мониторинговых исследований, для чтения специализированных курсов и учебных практик в ВУЗах.

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, перечня сокращений и условных обозначений, списка используемых источников.

Во Введении, автор рассматривает **актуальность** данного типа исследований. Екатерина Сергеевна обоснованно указывает, что совершенствование существующих и развитие новых методов прямой детекции стрессового состояния клетки является очень важной проблемой. Мы еще довольно слабо представляем, как правильно проводить эти изыскания, а совершенствование методологической базы заставляет нас проводить исследования и двигаться в этом направлении. **Актуальность исследования полностью обоснована автором и не вызывает сомнений.** Целью работы было оценить функциональное состояние микроводорослей при оптимальных и экстремальных условиях роста с помощью цитометрических и

флуоресцентных показателей. Для решения цели были поставлены соискателем пять задач, которые включали разработку методологии применения проточной цитометрии и витального маркера диацетата флуоресцеина (FDA) для дифференции клеток по функциональной активности, определение живых и мертвых клеток в монокультурах с использованием проточного цитометра, анализ изменчивости флуоресцентных параметров клеток при различных условиях культивирования, оценить физиологическое состояние микроводорослей по варибельности объемов клеток, апробация возможности применения удельной флуоресценции на клетку и количества живых клеток для оценки состояния фитопланктона в Черном море. **Цели и задачи полностью соответствуют работе и их приведение полностью обосновано.** Научной новизной исследования является стандартизация процедуры окрашивания водорослей флуорохромом диацетатом флуоресцеина для оценки доли живых, малоактивных и мертвых клеток, а также другие методические подходы в работе с пигментами водорослей и ростовыми и структурными параметрами клеток водорослей. Также была выявлена высокая степень неоднородности объемов клеток в неблагоприятных условиях среды, получены новые сведения и сезонной изменчивости биомассы трех размерных фракций микроводорослей в Черном море. **Научная новизна полностью и очень подробно обоснована в работе.** Автором было сформулировано 4 основных положения, которые были вынесены на защиту. Все положения четко сформулированы и обоснованы по ходу диссертации. Работа в этом направлении выполнена полностью. Обоснована и теоретическая и практическая значимость работы. Диссертация представляет собой работу, в которой показаны новые данные об изменчивости физиологического состояния микроводорослей и способы оценки этого состояния.

Работа соискателя прошла хорошую апробацию на различного уровня конференциях, обоснована достоверность полученных результатов. Обработано большое количество проб, использованы современные методы исследований. Обоснован личный вклад соискателя, по результатам исследования опубликовано 26 печатных работ, в том числе 13 научных статей.

Глава 1. Посвящена обзору литературы. В этой главе, в первой ее части, автор останавливается на анализе данных по соотношению живых и мертвых клеток микроводорослей в культурах и природных сообществах. Автор правильно ставит вопрос, а что именно считать объективным критерием для разделения живых и мертвых клеток и говорит о двух методах определения, а именно биохимическом и люминесцентном. Прочитирована основная и важная литература по этому вопросу. Автор останавливается на методах определения живых и мертвых клетках, говоря сперва о биохимическом методе, а затем о люминесцентном. Отдельно рассматривается относительная переменная флуоресценция хлорофилла *a*, как экспресс-показатель функционального состояния фитопланктона. Автор обсуждает подход к

оценке физиологического состояния микроводорослей по размерному составу клеток. В целом глава написана очень продуманно, хорошим научным языком и является базой для раскрытия идей автора в последующих главах.

Глава 2. В этой главе раскрываются объекты исследования и методы. Объектами исследования служили морские водоросли из диатомовых, динофитовых и других групп или отделов. Один штамм принадлежал цианобактериям. В диссертации дается очень краткое описание использованных культур водорослей и их названия. К сожалению, в работе не дается описание водорослей в период стационарной фазы роста, микрофотографии изученных видов и молекулярно-генетический анализ. Неудачным является и использование объекта под названием *Nitzschia* sp. №3, так как это не дает нам четкого представления с чем же мы имеем дело. Использование сканирующей микроскопии для диатомовых также желательно. Очевидно, что все культуры имеются в коллекции и эти работы смогут быть выполнены в дальнейшем. Автор рассматривает методы исследования и подробно их описывает. К методам можно отнести метод проточной цитометрии, метод относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*. Показано, что использовались методы световой микроскопии и ряд других общепринятых методов. Отдельно говорится об условиях проведения экспериментов, статистической обработки данных, показан объем проанализированного материала. Все методы подробно описаны, корректны и были необходимы для выполнения работы.

Глава 3. В этой главе автор говорит о динамике численности живых, неактивных и мертвых клеток микроводорослей. В первой части главы говорится об оценке доли физиологически активных и неактивных клеток в культурах микроводорослей. Автор подробно разбирает вопрос о том, как отличаются оптимальные условия окраски разных видов микроводорослей красителем FDA, и как таксономический состав водорослей в пробе может влиять на эффективность ее окрашивания. Для этого были выбраны культуры двух диатомовых водорослей, которые, однако, очень сильно отличаются по своей морфологии и панцирю. На это стоило бы обратить внимание при анализе полученных результатов. Далее автор разбирает вопросы, связанные с соотношением мертвой и живой компоненты взвеси в культурах микроводорослей в зависимости от стадии роста в разных условиях освещенности. Для этого были проведены эксперименты, когда оценивали связь фотосинтетически неактивной взвеси с плотностью культуры и световыми условиями. Было показано, что накопительные культуры диатомовых водорослей хорошо окрашиваются диацетатом флуоресцеина и оптимальное время составляет 20 минут. В культурах вместе с живыми клетками всегда присутствует мертвая взвесь, это продукты отмирания и лизиса клеток. Эта взвесь может составлять 1-2 процента при благоприятных условиях. При высокой освещенности доля мертвых клеток

возрастает до 20 процентов, при этом у водорослей с мягкими покровами накопление мёртвой взвеси меньше, из-за лизиса клеток и растворении органики. При длительном культивировании в стационарном состоянии доля фотосинтетически неактивной взвеси может возрастать, и связано это с высокой плотностью культуры.

Глава 4. Эта глава посвящена оценке физиологического состояния водорослей в культурах. Автор отдельно разбирает функциональное состояние водорослей методами проточной цитометрии и относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* и исследование изменчивости параметров флуоресценции при различных условиях культивирования *Phaeodactylum tricornerutum*. Рассматриваются физиологические особенности при разных световых параметрах и температурных показателей. Установлено, что величина флуоресценции FDA – более устойчивый параметр по сравнению с коэффициентом переменной флуоресценции хлорофилла *a*. Метод флуоресценции FDA при экстремальных условиях культивирования можно использовать как индикатор жизнеспособности водорослей. Глава написана четко и понятно, все выводы хорошо обоснованы экспериментами с использованием двух разных видов водорослей из разных отделов.

Глава 5. В этой главе автор рассматривает и изучает оценку физиологического состояния микроводорослей по варибельности размерного спектра клеток. Отдельно рассматриваются влияние интенсивности света на варибельность размерного спектра водорослей и влияние температуры на варибельность размерного спектра водорослей. Автор исходит из того, что размер клеток фитопланктона и их внутриклеточный состав являются физиологическими признаками, которые, собственно, отражают функциональное состояние водорослей. Авторы анализируют среднюю длину и ширину клеток, объем клеток. Делается вывод, что изменение объемов клеток водорослей не является существенным показателем, который может указывать на деградацию культур или потерю их жизнеспособности. При этом коэффициент вариации объемов клеток представляет собой более чувствительный параметр и может быть косвенным критерием. Анализируя объем клеток и изменение длины и ширины, авторы приводят литературные данные по разным водорослям и сравнивают их со своими, при этом нигде не упоминается, что сравниваются разные виды и отделы водорослей. На это стоит обратить внимание в дальнейшем, так как водоросли сборная группа и представители относятся к десяти филогенетически разным супергруппам. При этом даже среди одной группы диатомовых разные роды будут иметь разные закономерности популяционной изменчивости, что было отлично показано в работах д.б.н. С.И. Генкала и нескольких моих работах. Это связано с особенностями жизненного цикла, скорости деления. Вопросы популя-

ционной изменчивости диатомовых водорослей не рассматриваются в диссертации и на это необходимо обратить внимание в дальнейшей работе.

Глава 6. В главе обсуждаются структурные характеристики и функциональное состояние пико- и нанофитопланктона в прибрежных водах Черного моря. Для этого изучались природные пробы и было получено заключение, что критерий, связанный с оценкой функционального состояния водорослей с помощью флуоресцентного красителя FDA и проточной цитометрии может быть использован и для культур, и для природных проб. Было установлено, что вклад пикофитопланктона в суммарную биомассу составлял около 20 процентов. Более того была получена статистически значимая корреляция между содержанием хлорофилла *a* (спектрофотометрическим методом) и суммарной автофлуоресценцией хлорофилла *a* и биомассой (на проточном цитометре). Процент живых клеток в течении всего года составлял около 80 процентов. В холодный период года возрастала доля нанофитопланктона, в теплый период пиководоросли могли давать вспышку развития. Все приведенные выводы хорошо обоснованы, подробно описаны и проанализированы статистическими методами.

В заключении автор дает подробное общее описание полученных результатов с формулированием выводов. Заключение является хорошо подготовленным, в нем суммирована вся необходимая информация по диссертации. Автор прекрасно аргументировал в заключении все защищаемые положения, показал связь между изучением культур и природным фитопланктоном.

Выводы. В работе представлено пять выводов, которые подготовлены согласно ходу диссертации и применяемым методам, и подходам. Все выводы хорошо сформулированы и были обоснованы в тексте.

Перечень условных обозначений содержит все обозначения и является важным составляющим диссертации.

Список литературы содержит 219 источников на русском и иностранных языках. Все источники процитированы в тексте, использование их обосновано. Большое количество источников показывает хорошую проработанность темы и владением современными данными в области гидробиологии и альгологии.

Высказанные замечания не снижают ценности работы соискателя. Основные результаты оригинальны, получены на собственном материале с привлечением большого числа литературных источников, по-своему интерпретированных диссертантом. Актуальность и качество проведенного исследования, большой объём первичного материала, уровень его обработки и анализа, знакомство автора с широким спектром литературы, апробация результатов на конференциях, освещение основных положений в публикациях, в том числе в статьях

в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, свидетельствуют о диссертационной работе, как о состоявшемся и полезном гидробиологам исследовании.

Содержание автореферата соответствует тексту диссертационной работы.

Считаю, что диссертационная работа Соломоновой Екатерины Сергеевны «Оценка физиологического состояния микроводорослей с помощью цитометрических и флуоресцентных показателей» является законченным цельным научным исследованием в области изучения физиологического состояния микроводорослей и имеет важное теоретическое, научно-практическое и образовательное значение. Самостоятельность вклада автора в работу, актуальность, новизна, достоверность и аргументированность полученных результатов не вызывают сомнений. Диссертация соответствует критериям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, установленным в пунктах 9–11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, а ее автор, Соломонова Екатерина Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16 – «Гидробиология».

Куликовский Максим Сергеевич
доктор биологических наук, главный научный сотрудник
лаборатории молекулярной систематики водных растений
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
Российской академии наук;
127276, Москва, Ботаническая 35;
+79164564370; max-kulikovsky@yandex.ru; www.ippras.ru



Соломонова Е.С.
08.09.2021

П ДЗЕСА
ЗАВ. ОТА. КАДРОВ

Куликовский М.С.



Тимирязева 35