

**Заключение диссертационного совета Д 24.1.221.01 (900.009.01), созданного
на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей
имени А.О. Ковалевского РАН», по диссертации на соискание ученой
степени кандидата наук**

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета

от 20 октября 2021 г. № 17

О присуждении Соломоновой Екатерины Сергеевны, гражданке Российской Федерации ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Оценка физиологического состояния микроводорослей с помощью цитометрических и флуоресцентных показателей» по специальности 1.5.16 (03.02.10) «гидробиология» принята к защите 18.05.2021 г. (протокол заседания № 13) диссертационным советом Д 900.009.01, созданным базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», Министерство науки и высшего образования Российской Федерации. 299011, Российская Федерация, г. Севастополь, проспект Нахимова, д. 2, приказ о создании диссертационного совета № 714/нк от 21 июня 2016 года.

Соискатель Соломонова Екатерина Сергеевна, "09" апреля 1986 года рождения, в 2008 году соискатель окончила Севастопольский национальный технический университет, работает младшим научным сотрудником отдела экологической физиологии водорослей Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»

Диссертация выполнена в отделе экологической физиологии водорослей Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального

исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» (ФИЦ ИнБЮМ).

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор **Финенко Зосим Зосимович**, ФИЦ ИнБЮМ, отдел экологической физиологии водорослей, главный научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Куликовский Максим Сергеевич - доктор биологических наук, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва), лаборатория молекулярной систематики водных растений, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией;

Конюхов Иван Владимирович – кандидат биологических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (г. Москва), кафедра биофизики биологического факультета, старший научный сотрудник дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН), город Владивосток в своем положительном отзыве, подписанном Маркиной Жанной Васильевной, кандидатом биологических наук, научным сотрудником лаборатории морской микробиоты, Орловой Татьяной Юрьевной, кандидатом биологических наук, ведущим научным сотрудником лаборатории морской микробиоты, указала, что диссертационная работа Соломоновой Екатерины Сергеевны представляет собой полноценную, методологически выверенную работу, выполненную на высоком уровне и отвечает требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям и ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.15.6 – гидробиология.

Соискатель имеет 26 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 26 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 12 работ. Научные работы соискателя посвящены изучению физиологического состояния микроводорослей при оптимальных и экстремальных условиях роста. В диссертации представлены достоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Автор принял непосредственное участие в подготовке статей соответствующей тематики.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Solomonova E.S. Cytometric method for determining the potential growth rate of phytoplankton on the mitotic index / E.S. Solomonova, V.S. Mukhanov // *International Journal on Algae*. – 2015. – Vol. 17, no. 1. – P. 94-106.
2. Solomonova E.S. Characteristics of growth and fluorescence of certain types of algae during acclimation to different temperatures under culture conditions / A.I. Akimov, Solomonova E.S. // *Oceanology*. – 2019. – Vol. 59, no. 3. – P. 316-326.
3. Solomonova E.S. Structural and functional characteristics of the phytoplankton community in coastal waters of the Black Sea / E.S. Solomonova // *Contemporary Problems of Ecology*. – 2019. – Vol. 12, no 5. – P. 473–481.
4. Соломонова Е.С. Флуоресцентные характеристики диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et Lewin, 1964 / А.И. Акимов, Н.Ю. Шоман, Е.С. Соломонова // *Морской биологический журнал*. – 2019. – Т. 4, №. 4. – С. 89–92.
5. Соломонова Е.С. Оценка доли физиологически активных клеток в накопительных культурах *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia* sp. с помощью проточной цитометрии / Е.С. Соломонова, В.С. Муханов // *Морской экологический журнал*. – 2011. – Т. 10, №. 4. – С. 67-72.
6. Соломонова Е.С. Влияние температуры и света на вариабельность размеров клеток микроводорослей/ Е.С. Соломонова // *Рибне господарство України*. – 2011. – Т. 5. – С. 28-32

7. Соломонова Е.С. Оценка функционального состояния культуры *Chlorella vulgaris suboblonga* методами проточной цитометрии и переменной флуоресценции / Е.С. Соломонова, А.И. Акимов // Морской экологический журнал. – 2012. – Т. 11, №. 4. – С. 78-84.
8. Соломонова Е.С. Соотношение мёртвой и живой компоненты взвеси в культурах микроводорослей в зависимости от стадии роста и освещённости / Е.С. Соломонова, А.И. Акимов // Морской экологический журнал. – 2014. – Т. 13, №. 1. – С. 73-81.
9. Соломонова Е.С. Динамика физиологически активных клеток пико- и нано- фитопланктона в прибрежных водах Черного моря / Е.С. Соломонова // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2016. – Т. 1. – С. 62–73.
10. Соломонова Е.С. Оценка функционального состояния *Chlorella vulgaris suboblonga* и *Phaeodactylum tricornutum* при акклимации к низкой температуре / Е.С. Соломонова // Вестник Тв.ГУ Серия «Биология и экология». – 2017. – Т. 1. – С. 2007–2017.
11. Соломонова Е.С. Подход к оценке жизнеспособности микроводорослей по вариабельности размерного спектра клеток / Е.С. Соломонова // Ботанический журнал. – 2017. – Т. 5. – С. 617-628.
12. Соломонова Е.С. Исследование применимости относительной переменной флуоресценции хлорофилла и окрашивания диацетатом флуоресцеина для оценки и контроля состояния культуры водорослей на примере *Phaeodactylum tricornutum*/ Е.С. Соломонова, А.И. Акимов, Н.Ю. Шоман // Ботанический журнал. – 2018. – Т.103, № 9. – С. 1177–1191.

На диссертацию и автореферат поступили 10 положительных отзывов: 3 отзыва без замечаний, в 7 имеются замечания.

Отзывы без замечаний подписали:

1. главный научный сотрудник лаборатории альгологии, 1-й зам. директора по науке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Мурманского морского биологического института РАН, доктор биологических наук **Макаров Михаил Владимирович**;

2. главный научный сотрудник, руководитель Лаборатории экологии Южного отделения Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН, доктор биологических наук **Силкин Владимир Арсентьевич**;

3. старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Национальный научный центр морской биологии, кандидат биологических наук, **Борода Андрей Викторович**.

Отзывы с замечаниями:

4. В отзыве профессора кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ, доктора биологических наук **Соловченко Алексея Евгеньевича**, отмечается, что единственный момент, оставшийся неясным - причины, по которым в разных сериях экспериментов автор использовал разный набор объектов (видов микроводорослей).

5. В отзыве старшего научного сотрудника кафедры общей экологии и гидробиологии Биологического факультета МГУ, кандидата биологических наук **Воробьевой Ольги Владимировны**, в качестве недочетов автореферата отнесено несоблюдение на рисунках 1, 4, и 5 масштабов графиков, представленных совместно, что несколько затрудняет восприятие.

6. В отзыве главного научного сотрудника лаборатории альгологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, доктора биологических наук **Минеевой Натальи Михайловны** и главного научного сотрудника, заведующей лабораторией альгологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, доктора биологических наук **Корневой Людмилы Генриховны** в качестве замечаний отмечается, что коэффициент вариации объема клеток вряд ли следует рассматривать как показатель физиологического состояния популяций, а исчерпание клеточных запасов азота приводит не к отсутствию скорости роста клеток, а к подавлению самого роста.

7. В отзыве ведущего научного сотрудника лаборатории структуры и динамики планктонных сообществ Федерального государственного учреждения науки Института океанологии им. П. П. Ширшова РАН, доктора биологических

наук **Микаэляна Александра Сергеевича** отмечается, что подписи к рисункам не всегда содержат полную информацию. Так на рис. 2. присутствуют выделенные области с неизвестными буквенными обозначениями. Рис. 3 и текст содержат аббревиатуру ФНВ, определяемую как фотосинтетически неактивную взвесь, что не совсем корректно, т.к. автор не проводил измерений первичной продукции и не исследовал ее фотосинтетическую активность другими, например, флуоресцентными методами. В то же время, в полном тексте диссертации к рисунку 3.4 дается расшифровка ФНВ как частиц с низким содержанием пигментов, что не вызывает никаких вопросов. Глава 3 называется «Динамика численности живых, активных и мертвых клеток микроводорослей». Однако далее в тексте фигурируют лишь малоактивные клетки, оставляя читателя в неведении, что же это. К тому же, из описания методики, вообще не ясно, как автор различал живые, малоактивные и мертвые клетки. В последнем заключительном абзаце используются следующие словосочетания: доля малоактивных и мертвых клеток, процент мертвых клеток, доля мертвых и разрушенных клеток и доля малоактивных клеток. Читателю остается только полагать, что это одно и то же. Также следует отметить использование диссертанткой совершенно не понятных определений таких как «основные структурные внутриклеточные соотношения водорослей» или «реактивность параметров». На рис. 4. Нет указаний, каким показателям соответствуют приведенные кривые. Попытка читателя разобраться в этом наталкивает на трудности. Приняв, что пунктирная линия обозначает ФНВ, можно вычислить процент ФНВ от суммарной биомассы клеток у *P. tricornutum* как примерно 16%, хотя в тексте автореферата приводится цифра 25%. Подобные расчеты для *Synechococcus* дают 25%, хотя автор пишет о 2 % от начальной концентрации клеток, хотя данная пропорция, в принципе, не имеет смысла. Если же взять % ФНВ от конечной суммарной биомассы клеток, то полученные 25% равны такой же величине для *P. tricornutum*, и тогда не ясно, на чем основаны рассуждения автора о причинах различий в уровне разрушенных клеток между этими культурами. Из рис. 9 абсолютно не следует, как автор судил о физиологическом

состоянии разных размерных фракций фитопланктона. Если на цитограммах монокультур явно выделяются две области с активными и неактивными клетками, то какие критерии использовал автор в случае с цитограмм природных популяций с едиными размытыми областями точек, не ясно.

8. В отзыве главного научного сотрудника лаборатории биологии водных беспозвоночных Федерального государственного учреждения науки Лимнологического института СО РАН, доктора биологических наук **Бондаренко Нины Александровны**, в качестве пожелания для автора на будущее, отмечается, что третье предложение во втором выводе нужно переписать корректнее.

9. В отзыве главного научного сотрудника лаборатории экологии планктона Федерального государственного учреждения науки Института океанологии им. П. П. Ширшова РАН, доктора биологических наук **Демидова Андрея Борисовича**, отмечается, что замечания по тексту автореферата можно отнести к следующему. Из главы 6 остается неясным, с чем автор связывает отсутствие сезонных изменений доли жизнеспособных клеток пико- и нанофитопланктона, при том, что на рис. 10 прослеживается четкий сезонный ход флуоресценции FDA. Также, остается непонятным, почему интенсивность света и концентрация биогенных элементов не оказывает существенного влияния на величину флуоресценции FDA. По-видимому, в полном тексте диссертации дано объяснение этим результатам, и высказанное замечание может считаться несущественным.

10. В отзыве старшего научного сотрудника лаборатории морской биоты ФГБУН НИЦМБ ДВО РАН, кандидата биологических наук **Стоник Инны Валентиновны**, в качестве небольших недостатков работы отмечено, что в автореферате используются понятия «активные», «малоактивные» и «неактивные» клетки. Следовало бы пояснить, что автор понимает под этим терминами. В работе указано, что коэффициент вариации объемов клеток можно рассматривать как косвенный критерий для оценки физиологического состояния водорослей. При этом отмечается, что стрессовые условия приводят к

деструктивным процессам в клетке, включая вакуолизацию и связанную с ней деплазмолиз и изменение формы клеток. Однако, если не учитывать экстремальные условия, в автореферате не рассматриваются какие-либо биологические процессы и закономерности, связанные с зависимостью физиологического состояния микроводорослей от коэффициента вариации объемов клеток. Из главы 5, очень кратко изложенной в автореферате, также остается неясным, каковы особенности этой зависимости для представителей разных таксономических групп, используемых как модельные объекты в проведенных автором экспериментах. По всей вероятности автор рассматривает эти вопросы более подробно в диссертации.

В целом, в отзывах отмечается, что диссертационная работа Соломоновой Е.С. имеет важное значение для современной гидробиологии. Она посвящена разработке и валидированию методологии анализа популяционного состава и функциональной диагностики природных сообществ и лабораторных культур микроводорослей. В работе показана возможность применения флуоресцентных характеристик клеток водорослей в широком градиенте факторов среды – интенсивности света, температуры, обеспеченности азотом. Результаты исследования Е.С. Соломоновой вносят значительный вклад в решение задачи автоматизации исследований одноклеточных оксигенных фототрофов (микроводорослей) — ключевых первичных продуцентов акваэкосистем и важнейших объектов фотобиотехнологии. Автором разработан ряд методических подходов, автоматизирующих регистрацию детальной информации о клеточных популяциях микроводорослей во всей её полноте. Полученные результаты устраняют важное «узкое место», лимитирующие масштабы и точность исследований в области популяционной экологии водных экосистем. Результаты диссертационной работы Е.С. Соломоновой важны и для биотехнологии, поскольку позволяют получить в сжатые сроки исчерпывающую информацию о состоянии промышленных культур микроводорослей, например, в фотобиореакторах. В работе задействован комплекс современных методов исследования функционального состояния водорослей (проточная

цитофлуориметрия и РАМ-флуориметрия хлорофилла а) и адекватные, поставленным задачам, методы статистической обработки цифрового материала. Что касается замечаний, высказанных в отзывах ведущей организации и оппонентов, то они в основном носят технический и рекомендательный характер и не могут повлиять на общее положительное впечатление от проделанной работы. В целом, диссертационная работа выполнена на высоком профессиональном уровне и соответствует специальности 1.5.16 – гидробиология и профилю диссовета Д 900.009.01, а ее автор, Соломонова Е.С., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их компетентностью в вопросах, которым посвящена настоящая диссертационная работа.

Область интересов доктора биологических наук Куликовского Максима Сергеевича – молекулярная эволюция и филогения микроводорослей, их состав, морфология и систематика в разнотипных водоемах России и других регионах мира, он изучает физиологические особенности микроводорослей с использованием банка культур.

Область научных интересов кандидата биологических наук Конюхова Ивана Владимировича также связана с изучением функционального состояния фитопланктона. Он исследует ответные реакции фотосинтетического аппарата микроводорослей на действие стрессоров по данным индукции флуоресценции хлорофилла а.

Ведущая организация – ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН) – является крупным научным центром по изучению экологии, биоразнообразия и биоресурсов водных организмов. Лаборатория морской биоты занимается исследованием биоразнообразия микроводорослей дальневосточных морей РФ, мониторингом вредоносных водорослей и биотоксичности морских акваторий дальневосточных морей, культивированием морских микроводорослей и микроорганизмов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана методика применения проточной цитометрии и витального маркера диацетата флуоресцеина (FDA) для дифференциации клеток с разной функциональной активностью, позволяющая использовать параметр удельной флуоресценции (FDAfl) для экспресс контроля функционального состояния водорослей;

предложены экспресс-индикаторы: параметр FDAfl, соотношение живых и мертвых клеток, максимальная квантовая эффективность фотосинтеза (F_v/F_m), вариабельность размерного спектра клеток, для контроля физиологического состояния водорослей в широком градиенте условий среды: от оптимальных до экстремальных условий;

доказано, что флуоресценция FDA (или параметр FDAfl) устойчива к воздействию внешних факторов, если лимитирование роста водорослей имеет обратимый характер;

установлено, что в течение года в прибрежных водах доля жизнеспособных клеток пико и нанофитопланктона изменялась от 70 до 100 %, составляя в среднем 80 %, что указывает на её слабо выраженную сезонную вариабельность;

отмечено, что в теплый период года в водах Черного моря наиболее активен пикофитопланктон, в то время как холодный период благоприятен для развития нанофитопланктона.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

получены новые данные о возможностях оценки и контроля функционального состояния микроводорослей в культурах и при исследовании морских биоценозов. Комплексное применение методов проточной цитометрии, относительной переменной флуоресценции хлорофилла а и стандартных методов определения ростовых показателей водорослей и их основных внутриклеточных компонентов позволило выделить ряд экспресс-индикаторов, которые обеспечивают интегральную характеристику состояния культур водорослей, выращенных в различных условиях, а также природного

фитопланктона (на примере пико- и нано-фракций) на протяжении всего годового цикла его развития в прибрежном районе Черного моря;

предложено, что такие параметры, как FDA_{fl} , F_v/F_m и количество жизнеспособных клеток в популяции могут быть использованы для: (а) оперативной интегральной оценки состояния и функционирования фитопланктонного сообщества в связи с естественным (абиотические факторы) и антропогенным влиянием; (б) индикации летальных воздействий на клетки водорослей; (в) контроля санитарно-биологического состояния природных вод; что позволит избежать применения трудоемких и длительных традиционных методов оценки и повысить качество и оперативность диагностирования стрессовых состояний фитопланктона;

отмечено, что разработанные подходы оценки физиологического состояния микроводорослей важны для биотехнологии, поскольку позволяют получить в сжатые сроки исчерпывающую информацию о состоянии промышленных культур водорослей, например, в фотобиореакторе.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

определены экспресс-индикаторы физиологического состояния водорослей, которые могут быть использованы для диагностирования стрессового состояния фитопланктона, вызванного воздействием факторов среды;

определены перспективы практического использования предложенных в работе маркеров, позволяющие получить в сжатые сроки исчерпывающую информацию о состоянии промышленных культур водорослей, например, в фотобиореакторе;

представлены методические рекомендации для использования таких показателей оценки физиологического состояния микроводорослей, как количество жизнеспособных клеток и величина удельной флуоресценции FDA на клетку.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

экспериментальные работы по культивированию микроводорослей и обработки проб *осуществлены* на основании традиционно используемых методик, включающих исследования морфофизиологических характеристик микроводорослей;

теория согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации или по смежным отраслям;

идея базируется на обобщении передового опыта теории и практики ведущих российских и зарубежных исследований в области диагностики функционирования фитопланктона при стрессовом воздействии факторов среды и антропогенной нагрузки;

использованы сравнения авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике;

установлено соответствие и специфика полученных автором данных с представленными сведениями в известных работах других авторов;

использованы тщательно спланированные схемы проведения экспериментов, современные методы исследования, а также адекватные методы статистической обработки экспериментальных данных.

Личный вклад соискателя состоит в том, что автором проведен анализ имеющейся в литературе информации по проблематике представленной диссертационной работы, проведен комплекс экспериментальных работ, обобщение, анализ и интерпретация полученных результатов, сформулированы выводы. Диссертантом подготовлена рукопись диссертации и статьи соответствующей тематики, результаты работы доложены на симпозиумах и конференциях.

В ходе защиты диссертации были высказаны критические замечания относительно используемой соискателем терминологии, целесообразности использования экспресс-индикатора для оценки состояния микроводорослей по вариабельности их клеточных размеров, о необходимости генетической идентификации вида, технические замечания к иллюстративному материалу, стилистические неточности.

Соискатель Соломонова Е.С. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и замечания, согласилась с рядом замечаний, привела собственную аргументацию относительно выбора объектов исследования, доказала целесообразность и практическую значимость использования предложенных экспресс-индикаторов для оценки состояния микроводорослей.

На заседании 20.10.2021 диссертационный совет принял решение: за развитие новых экспериментальных подходов к экспресс-анализу физиологического состояния планктонных микроводорослей и решение научных задач, имеющих теоретическое и практическое значение для развития гидробиологических исследований присудить Соломоновой Екатерине Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении электронного тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 13 докторов наук, участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за - 14, против - 0.

Председатель
диссертационного совета



Рябушко Виталий Иванович

Ученый секретарь
диссертационного совета



Поспелова Наталья Валериевна

20.10.2021

