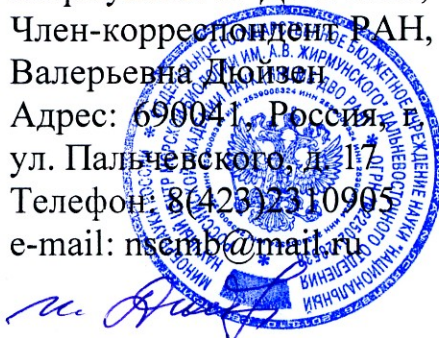


Утверждаю

Исполняющий обязанности директора
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
«Национальный научный центр
морской биологии им. А.В.
Жирмунского» ДВО РАН,
Член-корреспондент РАН, д.б.н. Инесса
Валерьевна Дюйзен
Адрес: 690041, Россия, г. Владивосток,
ул. Пальчевского, д. 1
Телефон: 8(423)2310995
e-mail: nsemb@mail.ru



20 сентября 2021 г.

Отзыв ведущей организации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»
Дальневосточного отделения Российской академии наук (ФБГУН ННЦМБ
ДВО РАН) на диссертационную работу Соломоновой Екатерины Сергеевны,
«Оценка физиологического состояния микроводорослей с помощью
цитометрических и флуоресцентных показателей» представленную на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.16. Гидробиология

Подбор методов для оценки количества и физиологического состояния
микроводорослей как в лабораторных условиях, так и в природной среде
является основой фундаментального альгологического исследования.
Проточная цитометрия, изначально разработанная для подсчета форменных
элементов крови в клинической диагностике, получила широкое применение
в научных исследованиях разной направленности, в том числе, альгологии.
Однако до настоящего времени недостаточно изучены отличия окраски
разных видов водорослей и, соответственно, недостаточно известно, каким

образом таксономический состав водорослей в пробе может влиять на эффективность её окрашивания. Для некоторых видов и даже групп микроводорослей (например, диатомовых) получены плохо воспроизводимые результаты. Метод измерения относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* водорослей обладает высокой чувствительностью и позволяет быстро оценить ряд биофизических характеристик фитопланктона в режиме реального времени. Однако до сих пор слабо изученным остается вопрос влияния физических факторов среды на динамику переменной флуоресценции хлорофилла *a*. Также практически отсутствуют сведения о взаимосвязи относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* с другими показателями. Совершенствование существующих и развитие новых методов прямой детекции стрессового состояния клетки/сообщества водорослей – это актуальная и востребованная прикладная задача.

В связи с вышеизложенным, актуальность и своевременность диссертационной работы Е.С. Соломоновой, цель которой заключается в оценке функциональном состоянии микроводорослей при оптимальных и экстремальных условиях роста с помощью цитометрических и флуоресцентных показателей является несомненной. Для достижения поставленной цели сформулированы конкретные задачи исследования, включающие разработку методологию применения проточной цитометрии и витального маркера диацетата флуоресцеина (FDA) для дифференциации клеток по функциональной активности; определение соотношения активных, неактивных и мертвых клеток в монокультурах одноклеточных водорослей в зависимости от условий выращивания с использованием проточного цитометра. Кроме того, изучение изменчивости флуоресцентных параметров клеток при различных условиях культивирования и оценка возможность их применения для оценки физиологического состояния водорослей; оценка физиологическое состояние микроводорослей по вариабельности объемов клеток. Апробация возможности применения предложенных индикаторов

(показатель удельной флуоресценции FDA на клетку (FDA_{fl}) и количество жизнеспособных клеток) для оценки функционального состояния пико- и нанофитопланктона в прибрежных районах Черного моря.

Научная новизна заключается в том, что стандартизирована процедура окрашивания водорослей флуорохромом диацетатом флуоресцеина (FDA) для оценки доли живых, малоактивных и мертвых клеток в культурах водорослей и в пико- и нанофракциях фитопланктона в прибрежных водах Черного моря. Впервые предложено использовать параметр FDA_{fl} для экспресс-контроля функционального состояния клеток водорослей в культурах и в фитопланктонном сообществе. Обосновано применение относительных показателей переменной флуоресценции хлорофилла *a* для оценки функционального состояния водорослей в условиях накопительного роста культур и при вариабельности света и температуры от оптимальных до экстремальных уровней. Впервые показана связь коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла *a* с флуоресценцией FDA, ростовыми и структурными параметрами ($C/Xл\ a$, C/N) клеток водорослей.

Выявлена высокая степень неоднородности объёмов клеток водорослей в неблагоприятных условиях среды, что позволяет предложить использовать коэффициент вариации (CV), как косвенный показатель функционального состояния микроводорослей.

Получены **новые сведения** о сезонной изменчивости биомассы трех размерных фракций микроводорослей (*Synechococcus*, пикозукариотический фитопланктон, нанофитопланктон) в прибрежных водах Черного моря с помощью проточной цитометрии. Впервые для исследуемого района (воды Севастопольской бухты) рассчитан процент живых клеток пико- и нанофитопланктона и установлен характер изменения интенсивности флуоресценции FDA в выделенных размерных группах водорослей, что позволит использовать эти параметры для экспресс-тестирования физиологического состояния фитопланктона.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты дополняют фундаментальные знания об изменчивости физиологического состояния водорослей, как в процессе лабораторного и промышленного культивирования, так и в природных условиях существования фитопланктонного сообщества. **Практическая значимость работы** заключается в возможном использовании предложенных в работе экспресс маркеров могут для диагностирования стрессового состояния микроводорослей, вызванного воздействием антропогенных факторов или экстремальных условий окружающей среды. Кроме того, результаты настоящей работы могут быть включены в комплекс мер контроля санитарно-биологического состояния прибрежных вод и разработку природно-охранных мероприятий, что будет содействовать обеспечению экологической безопасности региона, поддержанию качества морской среды и качества жизни населения прибрежных территорий, а также могут быть использованы для решения биотехнологических задач при культивировании микроводорослей.

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, выводов и списка литературы. Материалы изложены на 139 страницах, содержит 5 таблиц и 45 рисунков. Список литературы включает 219 источников, из которых 160 на иностранных языках.

Во введении отражены все необходимые элементы работы: обозначена актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, личный вклад соискателя. Все эти аспекты последовательно раскрываются в основном содержании диссертации.

Глава 1 представляет собой обзор по теме кандидатской диссертационной работы, в котором рассмотрены работы по изучению соотношения живых/мёртвых клеток микроводорослей в культурах и в природных сообществах, биохимический и люминесцентный методы определения живых и мёртвых клеток водорослей, относительная

переменная флуоресценция хлорофилла *a*, как экспресс-показатель функционального состояния фитопланктона в условиях культур и природных сообществ фитопланктона, подход к оценке физиологического состояния микроводорослей по размерному составу клеток.

Глава 2 посвящена материалам и методам. В ней указаны объекты изучения – достаточно большой перечень микроводорослей, представителей разных таксономических групп: диатомовых, динофлагеллят, премнезиевых, зеленых и цианобактерий. Описаны методы учета численности клеток водорослей (проточноцитометрический, прямого подсчета под микроскопом, спектрофотометрический). Дано описание метода определения относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*. Приведены условия культивирования водорослей в зависимости от плана экспериментальных работ (в лабораторных условиях и *in situ*) и указаны применяемые статистические показатели и способы обработки статистических данных.

Глава 3 касается оценки физиологически активных и неактивных клеток в культурах микроводорослей и рассматривает соотношение мёртвой и живой компоненты взвеси в культурах микроводорослей в зависимости от стадии роста в разных условиях освещенности. Выявлено, что накопительные культуры *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia* sp. № 3 хорошо окрашивались диацетатом флуоресцеина (FDA) на разных стадиях роста, лучшее время для окраски микроводорослей – 20 минут. Показано, что наряду с живыми, активными клетками водорослей, в культурах присутствует также слабо флуоресцирующая составляющая, частицы которой представляют собой продукт отмирания и лизиса клеток водорослей (фотосинтетически неактивная взвесь). При благоприятных условиях роста объёмная доля этой взвеси составляет 1 – 2 % от общей биомассы водорослей для видов, имеющих ригидные кремне - или целлюлозосодержащие оболочки, и не превышает 0,5 % для клеток, окруженных. В стационарной фазе роста, а также при высоких интенсивностях света, доля мёртвых и

разрушенных клеток возрастает до 10 – 20 % для *C. vulgaris suboblonga* и *P. tricornutum*. Для водорослей *Synechococcus* sp. штамм BS 9001 и *I. galbana* накопление ФНВ существенно меньше, даже на фоне интенсивного лизиса клеток, что говорит о быстрой дезинтеграции и растворении разрушенных фрагментов клеток. Показано, что в условиях длительного стационарного состояния повышение доли фотосинтетически неактивной взвеси, вероятно, связано с высокой плотностью культуры, а не с дефицитом минерального питания.

В главе 4 проведена оценка физиологического состояния водорослей в культурах методами проточной цитометрии и относительной переменной флуоресценции на разных стадиях роста и условиях культивирования. Показано, что освещённость выше насыщающей вызывает примерно пропорциональное снижение F_v/F_m при сохранении максимальной скорости роста. При более высоких уровнях освещенности и температуры переменная флуоресценция хлорофилла *a* падает значительно. В накопительном режиме, при изменении уровня азотного лимитирования величина F_v/F_m начинает отклик при 3-х, 4-х кратном снижении роста, что связано и сопутствующим снижением внутриклеточных пулов азота и хлорофилла. В этом отношении коэффициент переменной флуоресценции хлорофилла *a* может служить параметром контроля использования лимитирующего фактора среды.

Установлено, что величина флуоресценции FDA – более устойчивый параметр по сравнению с коэффициентом переменной флуоресценции хлорофилла *a*. Величины светового и температурного факторов начинают влиять на FDA_l при крайних значениях, имеющих летальный или близкий к ним характер. Это позволяет использовать метод флуоресценции FDA как индикатор жизнеспособности водорослей при экстремальных условиях культивирования.

В главе 5 оценивается вариабельность объемов микроводорослей в зависимости от освещенности и температуры. Выяснено, что коэффициент вариации объемов клеток представляет собой чувствительный параметр при

рассмотрении гибели культуры и может лежать в основе косвенного критерия, используемого для оценки физиологического состояния водорослей. Данный подход в сочетании с проточной цитометрией является быстрым и простым, а также позволяет анализировать состояние микроводорослей без окрашивания флуоресцентными красителями.

В завершающей **6 главе** описаны структурные характеристики и функциональное состояние пико- и нанофитопланктона в прибрежных водах Черного моря, полученные методом проточной цитометрии с окрашиванием флуоресцеин диацетатом. Описана сезонная динамика биомассы пико- и нанофитопланктона и хлорофилла *a*, которая характеризовалась высокими осенними показателями и июньским максимумом. Вклад пикофитопланктона (*Synechococcus* и эукариотические пиководоросли) в суммарную биомассу в среднем составил 20 %. Получена статистически значимая корреляция между содержанием хлорофилла *a*, определяемым стандартным спектрофотометрическим методом, и показателями, определяемыми на проточном цитометре.

Показано, что процент живых клеток не проявлял сезонной вариабельности и в течение года в среднем составил 80 %. Величина флуоресценции FDA на клетку имела достоверную положительную корреляцию с температурой воды в Черном море для *Synechococcus* и пикоэукариотических водорослей и отрицательную взаимосвязь для нанофитопланктона.

В целом диссертация производит благоприятное впечатление, однако при ее прочтении возникает ряд вопросов и замечаний.

Лучше использовать термин «запасание» веществ, так как у водорослей нет избыточного накопления. В проточной цитометрии используются не только витальные красители, как указано в диссертации, но и красители для определения мертвых клеток. Лучше приводить названия бухты на русском языке «Бланес», а не как в тексте «Blanes». В тексте диссертационной работы написано, что «при наступлении естественного апоптоза часть биомассы

переходит в растворенное органическое вещество». Однако при наступлении некроза (клетки могут гибнуть в результате повреждений разной природы) происходит такое же явление, по этому, правильное писать «гибель клеток». Возникает вопрос, почему для построения калибровочной кривой (рисунок 2.2) использовали микроводоросли, а не специальные калибровочные бусины для проточной цитометрии. Не указано в чем растворяли флуоресцеин диацетат. Возможно, в ДМСО. Это вещество указано в перечне условных обозначений и больше нигде. Производитель и каталожный номер флуоресцеин диацетата не указаны. На рисунках 2.3 и 3.1 отсутствует подпись оси абсцисс. По квадрантам FL4+ и FL4- можно судить об автофлуоресценции хлорофилла *a*, а не о содержании фотосинтетических пигментов. Местами флуоресценция указана как флюоресценция, лучше держаться одной формы написания. Так как диссертационная работа во многом посвящена отработке методик, очень полезно было бы привести данные усиления (gain) для фотодетекторов. В условных обозначениях к формуле 2.1 не указано, что обозначает F_v . Лучше писать не «по приросту углерода», а на основе «содержания углерода», не в «период роста», а в «период экспоненциального роста» или «экспоненциальной фазы роста». Рисунок 2.5 представляет собой не схему, а карту-схему. На рисунке 3.1 было бы полезно привести пик неокрашенных клеток. Верно указывать не «накопление FL4-», а увеличение числа событий в квадранте FL4-. Тоже касается и FL1-. На рисунках 3.8 и 4.9 нет подписей А и Б. Боковое светорассеяние – это не FS (forward scattering), оно SS (side scattering), так указано в подписи к рисунку 5.6. По-видимому, это описка, так есть правильные указания прямого и бокового светорассеяния. В подрисуночной подписи к рисункам 5.3 и 5.4 отсутствует расшифровка обозначений А и Б. В подписи к рисунку 5.10 не указано, что обозначает кластер клеток А. На проточном цитометре определяется только численность, а не биомасса.

Сделанные замечания не влияют на положительную оценку диссертационной работы Е.С. Соломоновой и носят дискуссионный или

рекомендательный характер. Работа является завершенным исследованием, имеет важное научное и практическое значение, выполнена на современном методическом уровне, написана грамотным литературным языком, хорошо оформлена. Поставленная автором цель достигнута, задачи успешно решены. Результаты, достоверность которых не вызывает сомнений, получены на основе корректных лабораторных исследований, обработаны статистически, хорошо представлены в таблицах и рисунках. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам, автореферат соответствует содержанию диссертации. Результаты работы прошли апробацию на конференциях международного и российского уровня и представлены в 26 публикациях, в том числе 13 научных статей (из них 12 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и ВАК Украины (опубликованные до января 2015 г.) и 4 в изданиях, входящих в Web of Science и SCOPUS), 13 тезисов конференций. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности гидробиология, а также требованиям пп. 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденное Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. и ее автор Екатерина Сергеевна Соломонова заслуживает присуждения ученой степени кандидата наук по специальности 1.5.16 Гидробиология.

Кандидат биологических наук,
Научный сотрудник лаборатории морской
микробиоты Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Национальный
научный центр морской биологии им. А.В.
Жирмунского» ДВО РАН

Маркина
Жанна Васильевна

Кандидат биологических наук,
Ведущий научный сотрудник лаборатории
морской микробиоты Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки «Национальный научный центр морской
биологии им. А.В. Жирмунского» ДВО РАН

Орлова
Татьяна Юрьевна

подпись *Маркина Ж.В.*
Заверяю: начальник ОДО
Буренина С.Л.



Орлова Т.Ю.

Почтовый адрес: 690041, Россия, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17
Телефон: 8(423)2311423
Сайт: <http://www.imb.dvo.ru>
e-mail: zhannav@mail.ru

Отзыв заслушан и единогласно одобрен на заседании лаборатории морской микробиоты Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения российской академии наук, на котором присутствовали 11 сотрудников.

Протокол № 7 от 10 сентября 2021 г.