

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Соломоновой Екатерины Сергеевны на тему «Оценка физиологического состояния микроводорослей с помощью цитометрических и флуоресцентных показателей» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16 - «гидробиология»

Диссертационная работа посвящена развитию новых экспериментальных подходов к экспресс-анализу физиологического состояния морских планктонных водорослей. Интерес к объекту исследования во многом обусловлен основополагающей ролью фитопланктона в функционировании морских экосистем. Микроводоросли – главные продуценты в Океане и создают, по последним оценкам, половину первичной продукции земного шара. Кроме того, их следует считать весьма эффективными продуцентами, учитывая их ничтожную массу в сравнении с массой наземной растительности.

Несмотря на эту общую картину, в каждой конкретной ситуации – в определенный сезон, в той или иной части акватории, на заданной глубине – содержание и физиологическая активность клеток водорослей изменяются в широких пределах в зависимости от сочетания абиотических и биотических факторов среды. Понять эту естественную динамику фитопланктона и выделить ведущую роль того или иного фактора среды невозможно без адекватных методов диагностики состояния клеток. С этой точки зрения, тема исследования актуальна и представляет практический интерес.

В настоящее время экспериментальному биологу доступны самые разные лабораторные методы – биофизические, биохимические, методы микроскопии, молекулярной генетики и т.д. Однако, специфика объекта (одиночные клетки) и специфика судовых экспедиций предъявляют к методам особые требования – это и оперативность получения данных, и статистическая надежность, и универсальность в отношении разных таксономических и размерных групп организмов. И далеко не каждый метод проходит такой «отбор» и закрепляется в мировой практике океанологических исследований.

Более грубые, но при этом высокопроизводительные интегральные методы оценки состояния клеток могут быть предпочтительны в реалиях работы на исследовательском судне или при работе с большим количеством проб фитопланктона в береговой лаборатории. Именно к таким методам следует отнести рассмотренное в диссертации определение цитометрических и флуоресцентных показателей популяций клеток микроводорослей. Соломонова Е.С. экспериментально проанализировала возможность

использования флуоресцеин диацетата для цитометрической диагностики состояния одноклеточных водорослей. Основная часть работы выполнена на модельных системах – альгологически чистых монокультурах водорослей при различных условиях выращивания. Отдельного внимания заслуживают регулярные измерения, проведенные на образцах природного фитопланктона Севастопольской бухты в его естественной сезонной динамике.

Эксперименты проведены по классической схеме при выращивании водорослей в накопительной культуре на искусственно приготовленной питательной среде f/2. Культивирование продолжалось 2-3 недели, в течение которых рост клеток проходил известные этапы (лаг, экспоненциальный) и в конце которых деление клеток останавливалось, и появлялись первые признаки деградации. В данном случае момент окончания роста культуры связан с исчерпанием запасов минерального питания. Изменяемыми параметрами (условиями) в различных сериях опытов стали облученность, температура и содержание азота в исходной среде. Серий опытов было поставлено достаточно много, но никакой путаницы по этому поводу по ходу изложения не возникает. Все опыты подробно описаны и пронумерованы в диссертации.

В процессе роста клеток в культурах (500 мл колба) небольшие объемы суспензий отбирали для лабораторного анализа. В популяции отобранных клеток на проточном цитометре для каждой клетки был измерен ее объем, определена интенсивность флуоресценции флуоресцеина и интенсивность флуоресценции хлорофилла. В качестве дополнительных независимых показателей, которые реагировали на изменение экспериментальных условий, были определены соотношения C/Xla и C/N и относительная переменная флуоресценция хлорофилла после адаптации клеток водорослей к темноте. Такой выбор вполне соответствует цели исследования, поскольку эти показатели широко используются в опытах с культурами водорослей, в частности в опытах, связанных с дефицитом минерального питания и влиянием экстремальной освещенности и температур.

Диссертация Соломоновой Е.С. представляет собой логически завершенный труд с полноценным введением, обоснованными задачами, достаточно объемным и разносторонним обзором литературы по теме, удачным планированием экспериментов и хорошо проиллюстрированными и описанными результатами. Полученные данные сопоставлены с опытом других исследователей, показана новизна предложенных подходов. В выводах адекватно отражены основные результаты работы, а надежность самих результатов подтверждена статистическим анализом. Список публикаций

соискателя по теме диссертации и их содержание соответствуют основным результатам, представленным в тексте диссертации.

Опустив описательные сведения о структуре диссертации, остановлюсь подробнее только на разделе «Заключение». Здесь в краткой форме сформулированы новые, а потому и наиболее интересные результаты работы. Автор резюмирует свои наблюдения и дает рекомендации по использованию на практике комплекса из 4 численных характеристик:

- соотношение живых и мёртвых клеток;
- величина флуоресценции FDA;
- максимальная квантовая эффективность фотосинтеза;
- вариабельность размерного спектра клеток.

Показано, что в совокупности контроль внутриклеточной активности эстераз и величины относительной переменной флуоресценции хлорофилла позволяют «перекрыть» самый большой диапазон в изменении функциональной активности клеток микроводорослей. При этом более консервативными параметрами оказались FDA_f и процент живых клеток. Они показали меньшую видоспецифичность и реагируют на экстремальные условия среды. В то же время, наиболее ранние проявления неблагоприятных факторов среды могут быть обнаружены по изменению показателя F_v/F_m .

Впервые установлено, что температурная зависимость активности внутриклеточных эстераз для нано- и пикопланктона существенно различаются (имеют разный знак температурного коэффициента). Данные особенности объясняют сезонные изменения численности в этих двух размерных группах, обнаруженные автором работы в Севастопольской бухте Черного моря.

Я уверен, что результаты работы будут положительно оценены, а сама технология мониторинга - взята на вооружение океанологами. Кроме того, они будут способствовать внедрению автоматизированной флуоресцентной цитометрии в те отрасли хозяйства, которые связаны с культивированием фототрофных микроорганизмов и поиском оптимальных условий культивирования (фотобиореакторы, очистные сооружения).

Положения, выносимые на защиту, понятны и вполне обоснованы. Замечание имеется лишь к формулировке положения номер 1 (согласно нумерации в автореферате): «Применение маркера ферментативной активности диацетата флуоресцеина (FDA) и проточной цитометрии позволяет получить достоверные и воспроизводимые результаты

для дифференциации клеток микроводорослей на живую и мертвую компоненту, что делает возможным использовать количество жизнеспособных клеток в качестве экспресс-показателя функционального состояния водорослей».

В такой общей формулировке не чувствуется новизны, так как делением популяции микроводорослей на живые и неживые клетки с применением флуоресцентного цитометра исследователи занимаются, как минимум с конца 90-х годов 20-го века. А новизна в работе имеется. По моему мнению, в положении 1 следовало отметить моменты, связанные с расчетом и анализом средней ферментативной активности на клетку и анализом вариабельности цитометрических параметров в клеточных популяциях.

К недостаткам оформления стоит отнести опечатки и различного вида огрехи в подписях к осям на графиках. Например, недостаточное разрешение растрового изображения, из-за чего числа невозможно прочитать (рис. 2.3, рис. 3.2), или отсутствие чисел и делений на оси абсцисс (рис. 3.1). На всех цитограммах - ошибочные подписи единиц измерения по типу «LOG FL1», хотя никакого предварительного логарифмирования единиц измерения там нет. На цитограммах логарифмический только шаг сетки делений, а подписанные значения 10^0 , 10^1 , 10^2 , и так далее, соответствуют «обычным», то есть линейным, единицам измерения интенсивности света.

Есть и другие замечания к содержанию работы:

1. Виды водорослей, задействованных в разных сериях опытов, частично не совпадают. Хотя автор и дает пояснения по поводу выбора тех или иных видов, но в целом это нарушает «стройность» работы и затрудняет ее логическое восприятие.
2. Одним из ожидаемых факторов воздействия на физиологическое состояние клеток был дефицит азота в среде, что само по себе вполне правдоподобно. И, по всей видимости, автор в отдельных случаях стимулирует такой дефицит в культуре, уменьшая количество нитратов в исходной среде культивирования (серия опытов 4 с диатомеей *Phaeodactylum tricorutum*). Однако реальной причиной остановки роста культуры и связанной с ней цепочки физиологических событий может быть не дефицит азота, но, например, дефицит фосфора. В обзоре литературы автор обсуждает также и возможность ингибирования роста собственными метаболитами, выделяемыми клетками в среду. Отношение C/N повышается во многих неблагоприятных условиях, и в каких-то случаях это может

свидетельствовать лишь о накоплении в клетках углеводов и/или жировых веществ при планомерном расходе форм азота, запасенных ранее.

В этой связи хорошо привести в работе прямое доказательство того, что выход культуры на стационар был связан именно с дефицитом азота. Насколько мне известно, автор очень много экспериментирует с *Phaeodactylum tricornutum*. Приводит ли двукратное уменьшение содержания азота в среде f/2 к пропорциональному двукратному уменьшению максимальной биомассы клеток (или численности) в накопительной культуре *Phaeodactylum tricornutum* в сравнении с аналогичным опытом на стандартной прописи среды f/2?

3. Не вполне точное обозначение зеленой флуоресценции как «флуоресценция FDA». В клетках флуоресцируют анионные формы флуоресцеина, в основном дианион, а его эфир FDA флуоресцирует очень слабо. В обзоре литературы также не обсуждается зависимость квантового выхода флуоресценции флуоресцеина от внутриклеточного pH. А в определенной категории работ этой зависимостью специально пользуются для того, чтобы наблюдать за изменениями внутриклеточного pH в ответ на изменение внешних условий.

Квантовый выход флуоресценции использованного красителя уменьшается с увеличением кислотности внутриклеточной среды, и в интервале pH 5.5 ... 7.5 он изменяется примерно в 10 раз. Такой фактор не стоит упускать из виду. Особенно в том случае, когда речь идет не просто о качественной картине «живая» клетка (светится) или «мертвая» (не светится), а когда речь идет о регистрации непрерывного ряда значений, например, среднего значения на клетку FDA_{fl} .

4. Разное название для родственных величин. Значение интенсивности флуоресценции клетки в канале цитометра FL1 (525 нм, флуоресцеин) в основном тексте и в подписях к рисункам названо «ферментативной активностью» (стр. 33), а среднее значение этой же самой величины по всем клеткам – «средним значением аккумулятивной флуоресценции» (стр. 34), в другом месте - «метаболической активностью» (стр. 59), и в выводах – «параметром удельной флуоресценции» (стр. 110). На мой взгляд, для облегчения восприятия следует использовать однородные термины, если уж «аккумулятивная флуоресценция», то аккумулятивная

флуоресценция. А если автор отождествляет ее с активностью ферментов, то в обоих случаях следует говорить об активности ферментов.

Например, «ферментативная активность» (FL1) и «среднее значение ферментативной активности» (FDA_{fl}). Другой однородный вариант – «интенсивность аккумулятивной флуоресценции на клетку» и «средняя интенсивность аккумулятивной флуоресценции на клетку».

Указанные замечания носят рекомендательный характер, не влияют на оценку (трактовку) результатов работы и не портят общего благоприятного впечатления о ней.

Считаю, что представленная к защите диссертационная работа соответствует критериям, установленным пп. 9-14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор Соломонова Е.С. достойна присуждения её ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16 – «гидробиология».

Официальный оппонент:

Конюхов Иван Владимирович

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
Биологический факультет, кафедра биофизики, проблемная лаборатория космической биологии

119234 Москва, Ленинские горы, д. 1с24.

Тел. 8(495)9395150

vanka.kon@gmail.com

Дата 30.09.2021

 /Конюхов И.В./

корресп. реценз. И.В. Конюхов
д.б.н. биол. ф-т МГУ,
акад. РАН ИИП Кемерово



