

На правах рукописи

СОЛОМОНОВА Екатерина Сергеевна

**ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ ЦИТОМЕТРИЧЕСКИХ И
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ**

03.02.10 – гидробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Севастополь – 2021

Работа выполнена в отделе экологической физиологии водорослей Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН», г. Севастополь

Научный руководитель:

Финенко Зосим Зосимович – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела экологической физиологии водорослей Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», г. Севастополь.

Официальные оппоненты:

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

Конюхов Иван Владимирович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры биофизики биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, г. Москва.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН), г. Владивосток.

Защита состоится «20» октября 2021 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д900.009.01 при ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН», по адресу: 299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2. E-mail: dissovet@ibss-ras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», по адресу: 299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2, или на сайте: <https://ibss-ras.ru/science/dissertation-council/announcement/1386/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук

Поспелова Наталья Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. К важнейшим компонентам водных экосистем относится фитопланктон, как основной первичный продуцент органического вещества, основа всех трофических взаимодействий. Количественная оценка обилия фитопланктона и его функционального состояния требуется для решения целого ряда задач, связанных с оценкой условий формирования, динамики и распределения первичной продукции в море, загрязнения и процессов самоочищения вод, а также, в целом, проблемы биологической продуктивности водоёмов. Планктонные водоросли, продукция которых лежит в основе функционирования всей пелагической пищевой цепи, обладают высокой скоростью воспроизводства и, быстро реагируя на изменения в экосистеме, могут служить чувствительным индикатором воздействия на неё различных факторов (Agustí, Sánchez, 2002; Марушкина, 2005; Wang et al., 2013).

Избыточное накопление биологически ценных веществ в клетках, наблюдаемое в качестве адаптивного ответа водорослей на стрессовые условия роста, делает их перспективным объектом массового промышленного культивирования, а получение максимального выхода описываемых веществ является весьма актуальной биотехнологической задачей ввиду их высокой экономической привлекательности (Heldal et al., 2003; Нука et al., 2013). Однако, существует трудность в постоянном контроле физиологического состояния культивируемого объекта, так как необходимо создать такие стрессовые условия, которые обеспечат максимальный выход ценных веществ, но при этом не приведут к гибели водорослей.

Функциональное состояние водорослей, их продукционный потенциал, чаще всего оценивают с помощью ростовых и фотосинтетических показателей, а также концентрации и соотношения основных внутриклеточных компонентов, в частности, отношений между органическим углеродом и хлорофиллом *a* (C/Хл) и азотом (C/N) (Финенко и др., 2011; Шоман, Акимов, 2013). Определение этих характеристик требует длительных и трудоемких измерительных процедур, и поэтому они не могут служить экспресс-индикаторами в случае рутинных полевых исследований, что затрудняет отслеживание влияния быстротекущих воздействий окружающей среды.

В последнее время активно разрабатываются экспресс-методы оценки функционального состояния фитопланктона и его продукционного потенциала. К таким методам относятся метод проточной цитометрии, использующий различные витальные красители и метод регистрации показателей переменной флуоресценции хлорофилла *a* (Owens, 1991; Falkowski, Kolber, 1995; Antal et al., 2001; Pogosyan, Matorin, 2005). Вместе с тем, автоматизация цитометрических исследований предъявляет более высокие требования к подготовке проб, условиям окраски их флуорохромами и методике проведения измерений. 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 (Agustí, Sánchez, 2002; Garvey, Moriceau, Passow, 2007; Onji, Sawabe, Ezura, 2000), что может указывать на наличие некоторых неучтенных факторов, контролирующих гидролиз красителей в клетках.

Метод измерения относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* водорослей обладает высокой чувствительностью и позволяет быстро оценить ряд биофизических характеристик фитопланктона в режиме реального времени (Falkowski, Kolber, 1995; Geider et. al., 1993). Однако до сих пор слабо изученным остается вопрос влияния физических факторов среды на динамику переменной флуоресценции хлорофилла *a* (Falkowski, Kolber, 1995; Fujiki, Taguchi, 2002). Несмотря на интенсивные исследования флуоресцентных характеристик, сведения о взаимосвязи относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* с основными структурными внутриклеточными соотношениями водорослей и их скоростью роста практически отсутствуют.

В связи с этим, совершенствование существующих и развитие новых методов прямой детекции стрессового состояния клетки/сообщества водорослей – это актуальная и востребованная прикладная задача, на решение которой направлена данная работа.

Цель работы - оценить физиологическое состояние микроводорослей при оптимальных и экстремальных условиях роста с помощью цитометрических и флуоресцентных показателей.

Для реализации поставленной цели требуется решение следующих **задач**:

1. Разработать методологию применения проточной цитометрии и витального маркера диацетата флуоресцеина (FDA) для дифференциации клеток по функциональной активности.

2. Определить соотношение активных, неактивных и мертвых клеток в монокультурах одноклеточных водорослей в зависимости от условий выращивания с использованием проточного цитометра.

3. Изучить изменчивость флуоресцентных параметров клеток при различных условиях культивирования и оценить возможность их применения для оценки физиологического состояния водорослей.

4. Оценить физиологическое состояние микроводорослей по вариабельности объемов клеток.

5. Апробировать возможность применения предложенных индикаторов (показатель удельной флуоресценции FDA на клетку (FDA_{fl}) и количество жизнеспособных клеток) для оценки функционального состояния пико- и нанопланктона в прибрежных районах Черного моря.

Научная новизна. Стандартизирована процедура окрашивания водорослей флуорохромом диацетатом флуоресцеина (FDA) для оценки доли живых, малоактивных и мертвых клеток в культурах водорослей и в пико- и нанопланктонных фракциях 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/Хл *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*, пикоэукариотический 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 и практическая значимость работы. 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.

Предложенные в работе экспресс маркеры могут быть использованы для диагностирования стрессового состояния микроводорослей, вызванного воздействием антропогенных факторов или экстремальных условий окружающей среды.

Результаты настоящей работы могут быть включены в комплекс мер контроля санитарно-биологического состояния прибрежных вод и разработку природно-охраных 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.

Методы исследования. В работе использовали стандартные методы культивирования микроводорослей, цитофлуориметрический метод с использованием витального красителя FDA, метод измерения относительных показателей переменной флуоресценции хлорофилла *a*, метод световой микроскопии, метод газо-адсорбционного хроматографического анализа на CHN-анализаторе для определения содержания органического углерода и азота в клетках водорослей. Статистическая обработка данных выполнялась с помощью стандартных программных пакетов “Microsoft Exel 7.0”, “Statistica-5” и “Grapher-12”.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. 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.
2. Величина флуоресценции FDA является более консервативным параметром по сравнению с переменной флуоресценцией хлорофилла *a*; значительное снижение значения этого параметра связано с необратимой потерей функциональной активности клеток водорослей и их гибели, что позволяет использовать данный показатель в качестве маркера жизнеспособности водорослей при экстремальных условиях культивирования.
3. Высокая неоднородность объёмов клеток в культурах водорослей свидетельствует об ухудшении их физиологического состояния.
4. Функциональное состояние пико- и нанофитопланктона в прибрежных водах Черного моря в годовом цикле характеризуется относительной стабильностью. Сообщество отвечает на резкие изменения среды сменой видовых комплексов.

Достоверность полученных результатов обеспечивается значительным объемом собранного и обработанного материала (2340 проб), большим количеством логично спланированных экспериментов, адекватных поставленным целям и задачам, использованием современных методов обработки экспериментальных данных, использованием компьютерных программ статистической обработки цифровых массивов.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на всероссийских и международных научных конференциях: международной научно-практической конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем «Понт Эвксинский VI» (г. Севастополь, 21–24 сент. 2009 г.), международной конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем «Актуальные проблемы ботаники и экологии» (г. Ялта, 21-25 авг. 2010 г.), международной конференции молодых ученых «Биология: от молекулы до биосферы» (г. Харьков, 21-25 нояб. 2010 г.), международной Пущинской школы – конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» по морской биологии (г. Пущино, 18-22 апр. 2011 г.), международной научно-практической конференции молодых ученых «Понт Эвксинский - 2011» (г. Севастополь, 24-27 мая 2011 г.), международной конференции молодых ученых «Биоразнообразие. Экология. Адаптация. Эволюция» (г. Одесса, 13-17 июня 2011), международном научно-техническом семинаре «Системы контроля окружающей среды -2012» (г. Севастополь, 24-28 сент. 2012), международной конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем «Актуальные проблемы ботаники и экологии» (г. Щелкино, 18 – 22 июня 2013 г.), международной научно-практической конференции молодых ученых «Понт Эвксинский - 2013» (г. Севастополь, 1-4 окт. 2013 г.), VII школа-семинар для молодых учёных и специалистов «Актуальные проблемы экологической

безопасности Азово-Черноморского региона – 2014», посвящённая 85-летию со дня рождения академика Г. Г. Поликарпова (Севастополь, 2 – 6 сент. 2014 года), международная научно-практическая конференция «Биоразнообразие и устойчивое развитие» (г. Симферополь, 15-19 сент. 2014), International scientific conference in memoriam of the 80th anniversary of professor M. V. Gusev «Physiology and biotechnology of oxygenic photoautotrophic microorganisms: looking into the future» (Moscow, p. 27–30 May 2014.), Всероссийская научно-практическая конференция «Морские биологические исследования: достижения и перспективы» (г. Севастополь, 19-23 сент. 2016 г.), Всероссийская молодежная гидробиологическая конференция «Перспективы и проблемы современной гидробиологии» (п. Борок, 10-13 нояб. 2016 г.), всероссийской научной конференции «Комплексные исследования Мирового океана» (г. Москва, 10-14 апр. 2017 г.).

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием. Тема, цель, задачи, объект, методы и программа исследования определены автором совместно с научным руководителем. Основной комплекс экспериментальных работ, обобщение, анализ и интерпретация полученных результатов, формулировка выводов и основных защищаемых положений выполнены автором самостоятельно, при направляющем участии научного руководителя.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 26 печатных работ, 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. Права соавторов публикаций не нарушены.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, выводов и списка литературы. Материалы изложены на 138 страницах, содержит 5 таблиц и 45 рисунков. Список литературы включает 219 источников, из которых 160 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, д.б.н. З. З. Финенко за помощь и поддержку на протяжении всех этапов работы. Особую признательность автор выражает А.И. Акимову, к.б.н. В. С. Муханову, Н. Ю. Шоман за плодотворное сотрудничество при проведении ряда исследований. Автор считает своим долгом выразить признательность И. М. Мансуровой за предоставленные данные по содержанию хлорофилла *a* и Н. Ю. Родионовой за предоставленные данные по гидрохимии, всем сотрудникам отдела экологической физиологии водорослей за постоянное внимание к работе и ценные замечания, за помощь в проведении экспериментов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 Обзор литературы. В настоящей главе проанализированы экспресс-показатели, по которым возможно оценить физиологическое состояние микроводорослей в условиях культур и при исследовании морских альгоценозов. В разделе 1.1 приводятся данные о количестве живых и мертвых клеток микроводорослей в культурах, в разных районах Мирового океана,

включая Севастопольскую бухту. Раздел 1.2 посвящён методологическим аспектам определения живых и мертвых клеток фитопланктона. В разделе 1.3 рассмотрено применение относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* для оценки функционального состояния фотосинтетического аппарата водорослей. В разделе 1.4 рассматриваются вопросы, связанные с вариабельностью размерного спектра клеток водорослей и возможностью использования данного параметра для оценки их физиологического состояния. Описан круг вопросов, нерешенных исследователями ранее.

Глава 2 Материал и методы исследований. В качестве *объекта исследования* были выбраны культуры одноклеточных планктонных водорослей разных таксономических групп из коллекции отдела экологической физиологии водорослей ФИЦ ИнБЮМ РАН. Апробацию метода витальной окраски водорослей диацетатом флуоресцеина на фитопланктоне и исследование сезонной динамики биомассы, хлорофилла *a* и флуоресцентных показателей клеток пико и нанофитопланктона проводили на модельной станции, расположенной в Севастопольской бухте. Пробы отбирали в поверхностном слое моря (0,1 м) раз в неделю с января по декабрь 2014 г. В работе использованы данные по содержанию биогенных элементов в Черном море, полученные в отделе аквакультуры и морской фармакологии.

Методы измерений. Общую численность водорослей в культурах и в природных пробах воды определяли на проточном цитометре Cytomics™ FC 500 в кластере на 2-х параметрических цитограммах по прямому светорассеиванию (FS) и флуоресценции клеток в красной (FL4, 675 нм) и оранжевой (FL2, 575 нм) спектральных областях на безразмерных логарифмических шкалах (Муханов и др., 2016). Оранжевая флуоресценция фикоэритрина использована для идентификации пикоцианобактерий рода *Synechococcus* (Marie et al., 2005; Муханов и др., 2016). Концентрацию клеток рассчитывали по скорости протока пробы (60 мкл мин⁻¹), времени счёта (100-360 с) и количеству клеток, зарегистрированных в этот промежуток времени. Контроль качества измерений численности производили с помощью калибровочных флуоросфер (Flow-Check™, Beckman Coulter) с известной концентрацией в пробе. Относительный размер клеток микроводорослей определяли в кластерах по прямому (FS) на линейных шкалах и пересчитывали в микрометры с помощью калибровки (Соломонова, Акимов, 2012).

Биомассу исследуемых размерных групп пикофитопланктона и нанофитопланктона в единицах углерода рассчитывали с использованием коэффициентов, определенных в работах (Heldal et al., 2003) для *Synechococcus*, для пикоэукариотов (Worden et al., 2004) и (Verity et al., 1992) для нанофитопланктона, соответственно.

Для оценки доли метаболически активных клеток водорослей использовали витальный краситель диацетат флуоресцеина (FDA), являющимся маркером активности ферментов группы эстераз в живых клетках. Окраску суспензии клеток проводили в соответствии с (Dorsey, 1989). Ферментативную активность и содержание пигментов в клетках оценивали на 2-параметрических цитограммах по флуоресценции FDA (канал FL1, 525 нм) и автофлуоресценции

(FL4, 675 нм) на безразмерной логарифмической шкале. Рассчитывали средние значения флуоресценции FDA на клетку, обозначив её, как FDA_{fl} .

Относительную переменную флуоресценцию хлорофилла *a* оценивали после 15-ти минутной адаптации водорослей в темноте. В суспензиях клеток флуоресценцию при открытых (F_o) и закрытых (F_m) реакционных центрах и относительную переменную флуоресценцию $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ измеряли при помощи высокочувствительного флуориметра «МЕГА-25», разработанного на кафедре биофизики МГУ имени М.В. Ломоносова (Погосян и др., 2009). Использовали следующее ранжирование фотосинтетической активности (ФА) по величинам F_v/F_m : менее 0,1 – фотосинтетически неактивные (нежизнеспособные) клетки; 0,1-0,29 – низкая ФА; 0,30-0,49 – средняя ФА; 0,50-0,59 – высокая ФА; более 0,60 – максимальная ФА (Franklin et al., 2009).

Содержание органического углерода и азота в клетках водорослей определяли методом газо-адсорбционного хроматографического анализа на CHN-анализаторе (Grasshoff et al., 1983).

Концентрацию хлорофилла *a* в пробах определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Specord UV-VIS (Karl Zeiss Jena). Расчет концентрации пигмента проводили по общепринятой формуле (Jeffrey, Humphrey, 1975).

Удельную скорость роста микроводорослей в разных фазах накопительной культуры рассчитывали по приросту углерода или численности клеток в пробе (Финенко, Ланская, 1971).

Численность и линейные размеры клеток *Chaetoceros affinis*, *Skeletonema costatum* определяли методом прямого счета в капле объемом 0,01 мл под световым микроскопом ZEISS PrimoStar (Владимирова и др., 62). Объем клеток вычисляли по методу геометрического подобия на основе измерений линейных размеров не менее 100-300 клеток (Sun, Liu, 2003; Брянцева и др., 2005).

Условия проведения экспериментов. Лабораторные исследования. В экспериментах использовали альгологически чистые культуры, которые выращивали на среде $f/2$ (Guillard, Ryther, 1962) при непрерывном освещении люминесцентными лампами (Philips TLRS 20W/54765) холодного свечения. Освещённость измеряли люксометром Ю-116. Для перевода освещённости в энергетические единицы принимали, что 1 клк = $17,2 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (Парсонс и др., 1982). Для цитометрического анализа из культивационных сосудов отбирали аликвоты объемом 3 мл в 3-х повторностях. Все эксперименты ставили в 2-х повторностях. Было разработано 6 серий опытов. Общий объем проведенных экспериментов составил 42 опыта. Количество обработанных проб 2340.

Первая серия экспериментов. Для исследования динамики физиологически активных и неактивных клеток культуры *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia* sp. № 3 выращивали в колбах объемом 500 мл в течение 21 суток, при температуре 20 °С и освещённости $103 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Вторая серия экспериментов. Для оценки соотношения мёртвой и живой компоненты в культурах водорослей в зависимости от стадии роста и освещённости, *Chlorella vulgaris suboblunga*, *Phaeodactylum tricornutum* выращивали в накопительном режиме при интенсивностях света $258 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$

и $17 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, температуре 18-20 °С. Исследовано действие освещенности $900 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ после адаптации *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Synechococcus* sp. штамм BS 900, к освещенности $20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Время экспозиции составило 24 часа.

Третья серия экспериментов. Для оценки функционального состояния микроводорослей методами проточной цитометрии и относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*, *Chlorella vulgaris suboblonga* выращивали 22 дня при освещенности $43 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. После разведения культуры средой f/2 переставляли на три освещенности 20, 50 и $250 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и наблюдали рост водорослей в течение 12 суток.

Четвертая серия экспериментов. Исследовали адаптационные изменения водоросли *Phaeodactylum tricornutum* и флуоресцентных показателей в различных условиях среды. Культуру выращивали при температуре 20 °С и интенсивности света $34 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в течение 14 суток с двукратно уменьшенным содержанием азота относительно исходной среды f/2. Для исследования влияния светового фактора *P. tricornutum* адаптировали к нескольким уровням интенсивности света в диапазоне от 14 до $1720 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при температуре 20 °С в колбах в течение периода времени, достаточного для нескольких делений клеток при данной освещенности (3-7 сут.). Температурную акклимацию в диапазоне от 3 до 27 °С при интенсивности света $34 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ проводили в течение периода времени достаточного для стабилизации роста при данной температуре (3-6 сут.).

Пятая серия экспериментов. Для исследования вариабельности размерного спектра клеток водорослей *Chaetoceros affinis*, *Skeletonema costatum*, *Heterocapsa triquetrum*, *Prorocentrum pusillum* выращивали в накопительном режиме при интенсивностях света 43 и $206 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и температуре 19-20 °С. *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlorella vulgaris suboblonga* адаптировали к температурам 10 °С и 20 °С при интенсивности света $34 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Продолжительность опытов составила от 5 до 25 суток, в зависимости от исследуемого вида. Для оценки изменчивости размеров клеток водорослей на основании коэффициента вариации использовали шкалу А.С. Мамаева (Мамаев, 1968).

Статистическая обработка данных. Рассчитывали стандартные отклонения (SD), ошибки средней (m), достоверность различий выборочных средних с помощью парного t-критерия (α), коэффициенты корреляции (R).

Глава 3 Динамика численности живых, активных и мёртвых клеток микроводорослей
3.1 Оценка доли физиологически активных и неактивных клеток в культурах микроводорослей. Стандартизирована процедура окрашивания клеток флуорохромом диацетатом флуоресцеина (FDA) для дифференциации клеток с разной функциональной активностью, позволяющая использовать соотношение живые/мертвые клетки как параметр оценки физиологического состояния водорослей. Измененный протокол окрашивания апробирован на двух видах водорослей *P. tricornutum* и *Nitzschia* sp. № 3. Оптимальное время окраски составило 20 минут, поскольку при этом достигалась максимальная интенсивность окраски клеток и её наименьшая

вариабельность. Наши результаты хорошо согласуются с опубликованным протоколом 20-минутной окраски FDA разных видов микроводорослей при их исследовании с помощью эпифлуоресцентной микроскопии (Onji, 2000) и, следовательно, такой подход возможен для определения доли живых клеток в природных популяциях. В экспоненциальной фазе роста доля мёртвых и малоактивных клеток не превышала 10 % в обеих культурах, тогда как в конце стационарной фазы она возрастала почти до 100 % у *Nitzschia* sp. № 3 и 70 % – у *P. tricornutum* (рисунок 1).

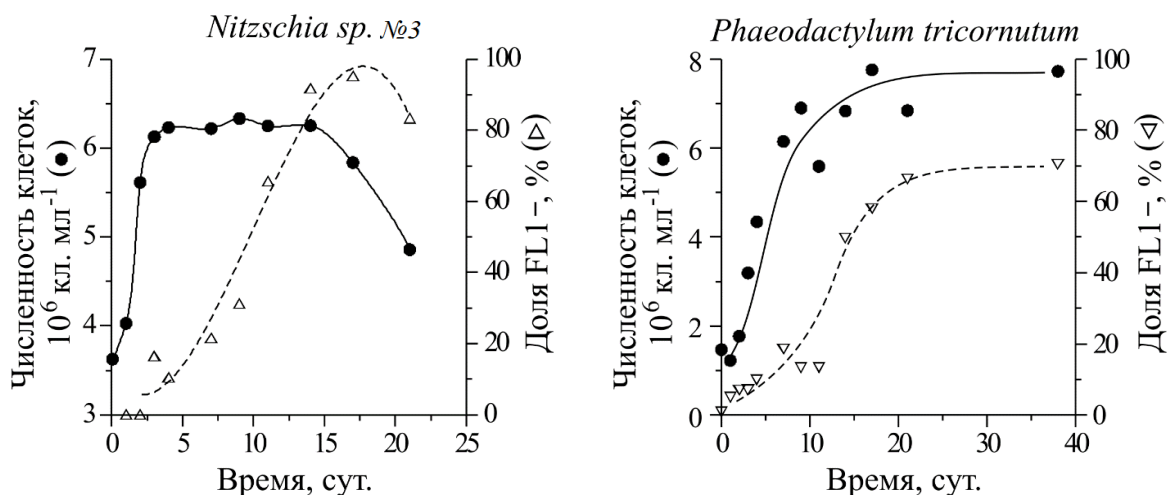


Рисунок 1 – Динамика общей численности и доли малоактивных и мёртвых клеток (FL1–) в накопительных культурах микроводорослей

Однако такой подход, не даёт четкого представления о количестве мёртвых клеток, так как в большей степени культура, при ухудшении условий выращивания, представляет «субпопуляцию» из мертвых и малоактивных клеток. Решить эту задачу позволил метод оценки доли живых и мертвых клеток по интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* клеток в красной (FL4, 675 нм) области спектра.

3.2 Соотношение мёртвой и живой компоненты взвеси в культурах микроводорослей в зависимости от стадии роста в разных условиях освещённости. Для определения количества мёртвых (фотосинтетически неактивных) клеток и их динамики проведены эксперименты, в которых оценивали связь ФНВ (фотосинтетически неактивная взвесь) с плотностью культуры и световыми условиями. На рисунке 2 представлена цитограмма, показывающая распределение частиц в культуре *P. tricornutum*, где каждая точка соответствует регистрируемому событию в координатах рассеяния (FS) и красной автофлуоресценции (FL4, 675 нм). Исследуемая культура может быть разделена на две группы частиц: частицы с высоким (область А) и низким (область Б) содержанием пигментов, различающиеся по размерной структуре. Область А в данном случае соответствует клеткам водорослей, а также, возможно, крупным фрагментам клеток, содержащим неразрушенные пигменты. В области Б регистрируются бесхлорофилльные остатки или же фрагменты клеток водорослей (фотосинтетически неактивная взвесь).

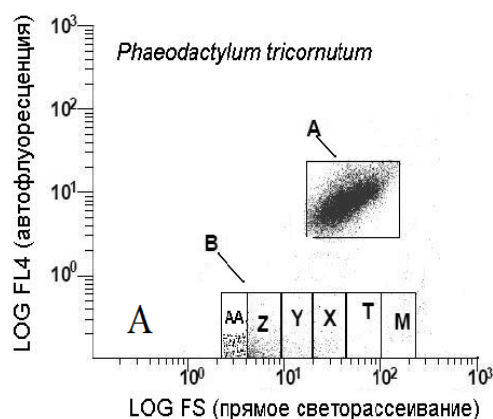


Рисунок 2 – Кластер клеток *P. tricorutum* в координатах: прямое светорассеивание (FS) и автофлуоресценция (FL4)

При выращивании *P. tricorutum* и *C. vulgaris suboblunga* при низкой освещенности, относительная доля ФНВ составляет 1-2 % в начальной и экспоненциальной фазах роста (рис. 3). По мере увеличения плотности культуры доля ФНВ возрастает. При освещенности $258 \text{ мкЭ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ отмечено более высокое процентное содержание ФНВ на всех стадиях роста и существенное накопление ФНВ на поздних стадиях роста культур.

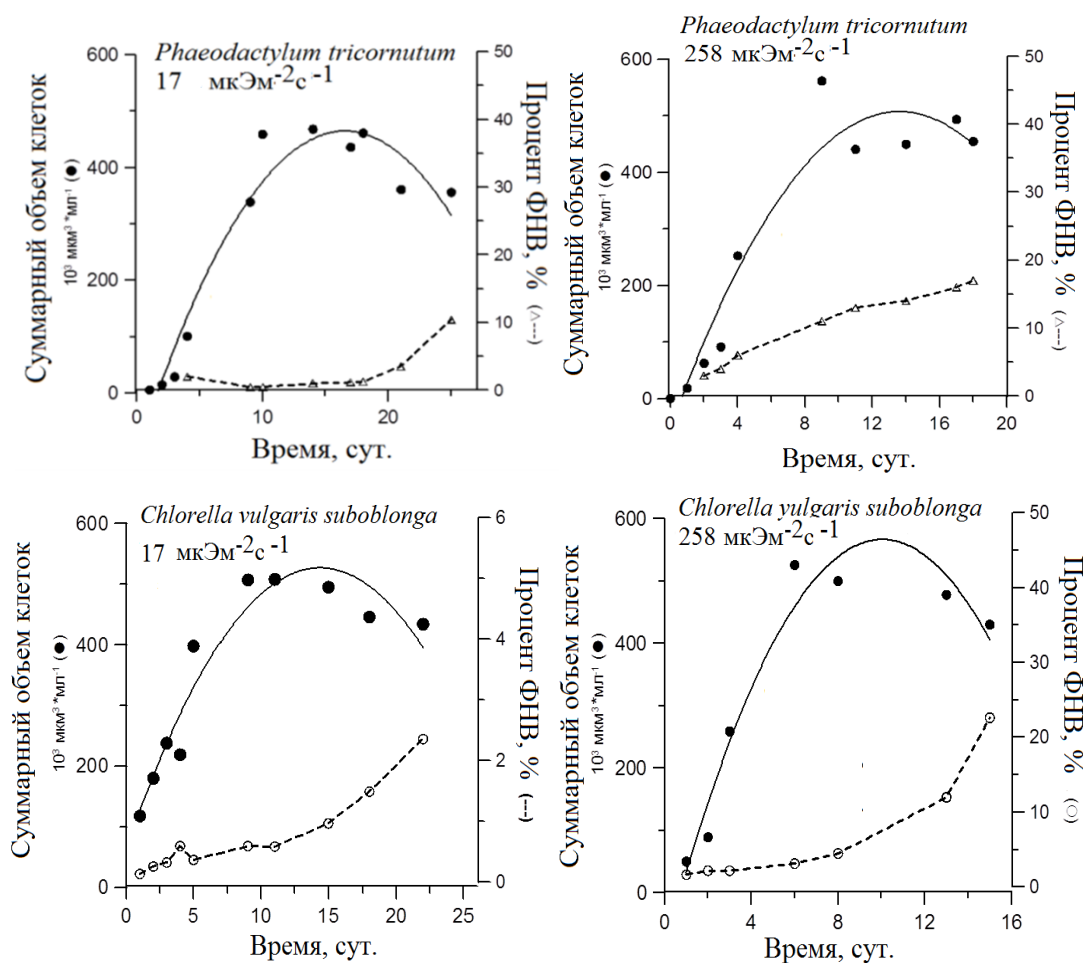


Рисунок 3 – Динамика изменения суммарного объема клеток водорослей и процента ФНВ в процессе роста *P. tricorutum* и *C. vulgaris suboblunga* при двух освещенностях

Возможно, используемый уровень освещённости ($258 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) избыточный для этих видов, в 3-5 раз превышая I_k (интенсивность света, насыщающая рост клеток), что и является возможной причиной увеличения смертности водорослей, приводящей к повышению концентрации ФНВ.

Проведено исследование влияния высокой освещённости ($900 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) на изменение суммарного объёма клеток и объёма частиц ФНВ водорослей *P. tricornutum*, *I. galbana* и *Synechococcus* sp. штамм BS 9001 (рис. 4). Действие света $900 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ во всех случаях приводило к ингибированию роста клеток и возрастанию доли ФНВ, однако степень воздействия различается для отдельных видов. У *P. tricornutum* наблюдалось увеличение прироста биомассы клеток при экспозиции на высоком свете, а доля ФНВ возросла до 25 % относительно общей биомассы клеток в течение суток. У *I. galbana* и *Synechococcus* sp. штамм BS 9001 отмечалось уменьшение суммарного объёма клеток водорослей при увеличении доли ФНВ.

Индукцируемое светом ингибирование роста водорослей и лизис клеток показывает различную устойчивость исследованных видов к экстремальной освещённости. В то же время, для них характерна различная степень накопления разрушенных компонент клеток и мёртвых клеток. Так, *P. tricornutum* характеризуются наличием жёстких структур в составе клеточных оболочек, в связи с чем, лизис клеток приводит к образованию и накоплению клеточных фрагментов устойчивых к разложению и дезинтеграции. У клеток *I. galbana* отсутствует клеточная оболочка, окружающая цитоплазматическую мембрану, а клетки *Synechococcus* sp. штамм BS 9001 характеризуются ультратонким строением клеточной стенки, поэтому в условиях лизиса ФНВ составляет в культурах данных видов до 2 % от исходной концентрации клеток.

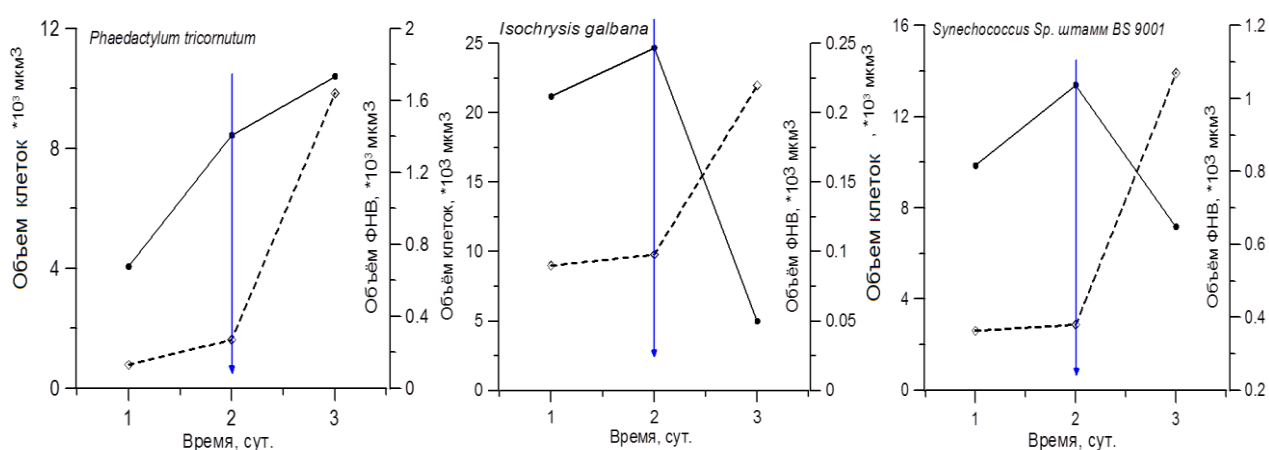


Рисунок 4 – Динамика суммарного объёма клеток водорослей и суммарного объёма частиц ФНВ при изменении световых условий с $20 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ (1-2 сутки) на $900 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ (2-3 сутки). Синей стрелкой обозначено начало изменения световых условий

Таким образом, в накопительных культурах водорослей присутствуют клетки с разной функциональной активностью: активные, малоактивные и мертвые. По мере роста культур и перехода их в глубокую стационарную фазу роста доля малоактивных и мёртвых клеток возрастает до 70-100 %. Процент мёртвых клеток при оптимальных условиях роста (в экспоненциальной фазе)

составляет 1-2 % от общей биомассы водорослей для видов, имеющих ригидные кремне - или целлюлозосодержащие оболочки, и не превышает 0,5 % для клеток, окруженных цитоплазматической мембраной. При неблагоприятных условиях роста доля мёртвых и разрушенных клеток возрастает до 30 % для видов, имеющих клеточную оболочку, и оказывается существенно меньше для видов без неё. Доля малоактивных клеток в разные моменты роста культур составляет от 40 % до 80 %.

Глава 4 Оценка физиологического состояния водорослей в условиях культур. 4.1 Оценка функционального состояния водорослей методами проточной цитометрии и относительной переменной флуоресценции хлорофилла. В подразделе исследована возможность применения удельной флуоресценции диацетата флуоресцеина (FDA_{fl}) (проточная цитометрия) и относительной переменной флуоресценции хлорофилла a (Fv/Fm) для оценки физиологического состояния *Chlorella vulgaris suboblonga* в условиях накопительной культуры.

Максимальные значения параметров (удельная скорость роста, Fv/Fm , FDA_{fl}) получены в экспоненциальной фазе роста, на 2–3 сут., после лаг-периода, связанного с разведением культуры. Затем наблюдалось быстрое падение удельной скорости роста водорослей и параметра Fv/Fm . Значения FDA_{fl} оставались высокими до наступления стационарной фазы роста. По мере развития стационарной фазы на фоне снижения концентрации клеток происходило более быстрое падение показателя FDA_{fl} , однако не столь значительное, как для параметров Fv/Fm и μ соответственно.

Между удельной скоростью роста водорослей и параметром Fv/Fm наблюдается положительная корреляционная связь ($R^2=0,9$). Достоверной линейной связи между удельной скоростью роста и FDA_{fl} не наблюдалось, что, возможно, связано с тем, что при отсутствии роста клетки водорослей остаются живыми, но малоактивными. Это подтверждает тот факт, что после разведения стационарной культуры свежей средой в 20 раз наблюдали рост водорослей и восстановление параметров Fv/Fm и FDA_{fl} на трех освещённостях: насыщающей фотосинтез ($250 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) и двух лимитирующих ($20 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ и $50 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) (рис. 5).

После периода восстановления значения FDA флуоресценции остаются высокими в течение эксперимента, с тенденцией к снижению в условиях стационарной фазы при $250 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ и повышению в экспоненциальной фазе роста при $20 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$.

Полученные результаты показывают, что применяемые нами методы обеспечивают адекватную оценку физиологического состояния водорослей. Параметр Fv/Fm тесно связан со скоростью роста водорослей и является чувствительным индикатором их функционального состояния. Величина относительной переменной флуоресценции хлорофилла быстро восстанавливается после периода неблагоприятных условий, если водоросли при этом не теряли своей жизнеспособности. FDA флуоресценция - более консервативный параметр, его заметные изменения связаны с необратимой потерей функциональной активности клеток и их гибели.

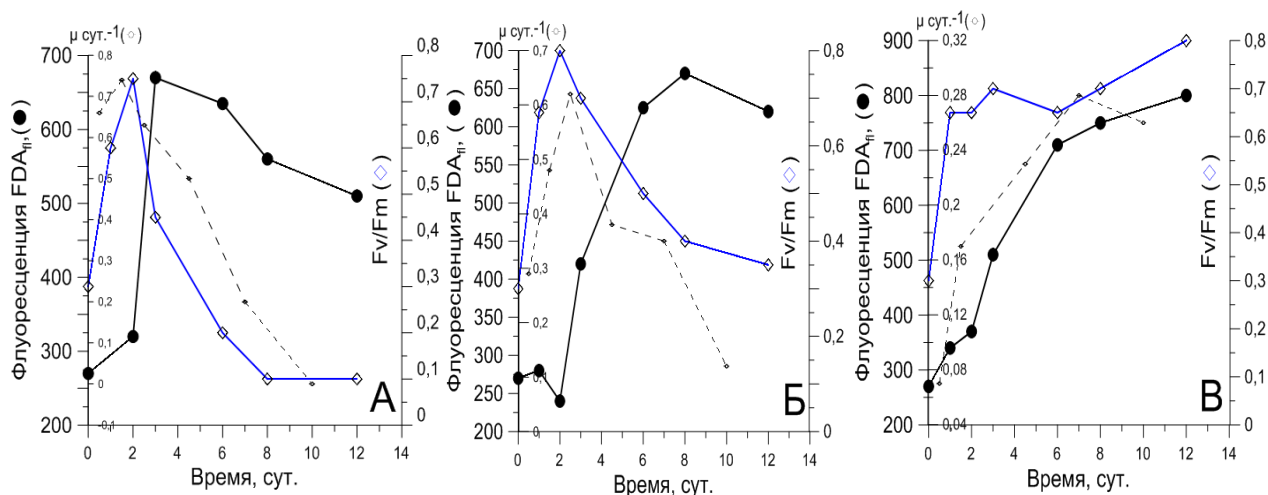


Рисунок 5 – Показатели удельной скорости роста, FDA_{fl} и Fv/Fm *C. vulgaris suboblonga*, адаптированной к освещенностям $250 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (А), $50 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (Б) и $20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (В)

4.2 Исследование изменчивости параметров флуоресценции при различных условиях культивирования *Phaeodactylum tricornutum*. Исследована ответная реакция флуоресценции хлорофилла *a* водорослей, связанная с квантовым выходом первичных фотохимических реакций (Fv/Fm), и аккумулятивной флуоресценции FDA_{fl} (активность внутриклеточных эстераз) в связи с изменением освещенности, температуры и биогенной обеспеченности по азоту с целью обоснования возможности использования этих параметров как индикаторов физиологического состояния водорослей.

Результаты экспериментов показали с одной стороны устойчивость коэффициента переменной флуоресценции в широком диапазоне световых и температурных условий, а с другой высокую реактивность этого параметра под влиянием экстремальных значений этих факторов. В диапазоне интенсивности света от 14 до $150 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ у *P. tricornutum* сохранялись высокие значения квантовой эффективности ФС2 ($0,63-0,70$). Повышение освещенности от 150 до $600 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ приводило к снижению значений коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла до $0,45-0,55$, при освещенности выше $900 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ наблюдалось еще более быстрое снижение величины Fv/Fm до $0,2-0,3$ и это сопряжено с ингибированием роста водорослей и фотоокислением хлорофилла. Флуоресценция FDA_{fl} слабо зависела от освещенности в диапазоне от 14 до $900 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. При $1200 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ наблюдалось снижение данного показателя, однако, не столь значительное, как для коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла *a* (рис. 6).

Значения удельной флуоресценции FDA_{fl} и коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла *a* *P. tricornutum* сохранялись на высоком, относительно постоянном уровне в диапазоне температур $5-24 \text{ }^\circ\text{C}$ (рис. 7). При температуре $27 \text{ }^\circ\text{C}$ культура деградирует, что приводит к остановке роста; при этом снижается как ферментативная активность, так и эффективность переноса энергии ФС2. Пролонгированное воздействие этой температуры имело летальный характер.

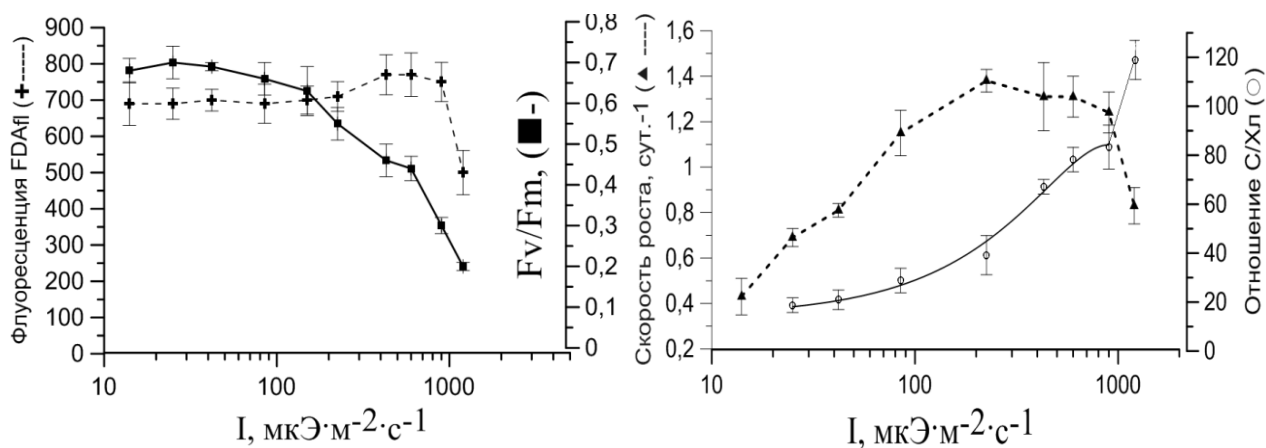


Рисунок 6 – Зависимость параметров FDA_{fl} активности, F_v/F_m , удельной скорости роста и отношения C/Xl от интенсивности света у *P. tricornutum*.

При $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ длительное культивирование приводило к замедлению скорости роста и снижению максимальной эффективности фотосинтеза, что, однако, не сказывалось на жизнеспособности водорослей и, в отличие от $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, имело обратимый характер.

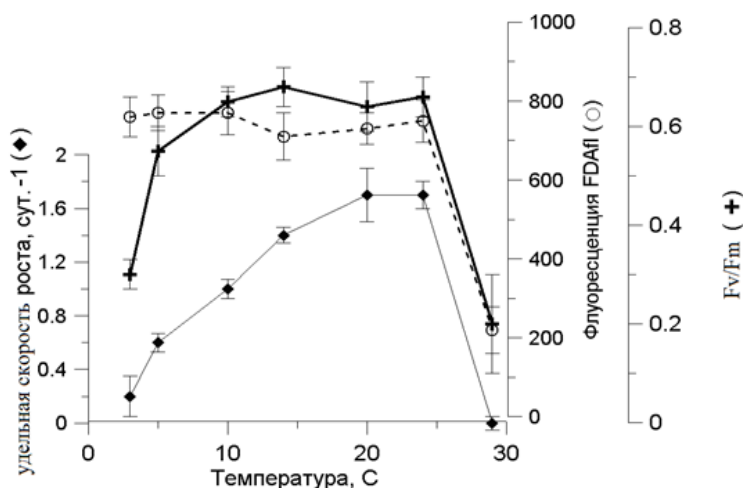


Рисунок 7 – Зависимость удельной скорости роста, F_v/F_m , флуоресценции FDA от температуры у *P. tricornutum*.

В накопительном режиме культивирования, при изменении уровня азотного лимитирования величина F_v/F_m начинает отклик при 3-х, 4-х кратном уменьшении скорости роста, что связано и с сопутствующим снижением внутриклеточных пулов азота и хлорофилла (рис. 8). Величина FDA_{fl} сохраняла высокие значения в широком диапазоне накопительного режима, вплоть до полной остановки роста и последующего лизиса клеток на поздней стадии стационарной фазы. В разделе 4.1 для *C. vulgaris suboblonga* также показано, что падение активности внутриклеточных эстераз происходит лишь на поздних стадиях стационарной фазы роста и лизиса культуры.

Таким образом, величина флуоресценции FDA - более устойчивый параметр по сравнению с коэффициентом переменной флуоресценции хлорофилла *a*. Относительно высокий уровень ферментативного гидролиза в клетках сохраняется при значительном исчерпании внутриклеточных запасов

азота, остановки скорости роста и синтеза хлорофилла. Величины светового и температурного факторов начинают влиять на FDA_{fl} при крайних значениях, имеющих летальный или близкий к ним характер. Это позволяет использовать параметр FDA_{fl} как индикатор жизнеспособности водорослей при экстремальных условиях культивирования.

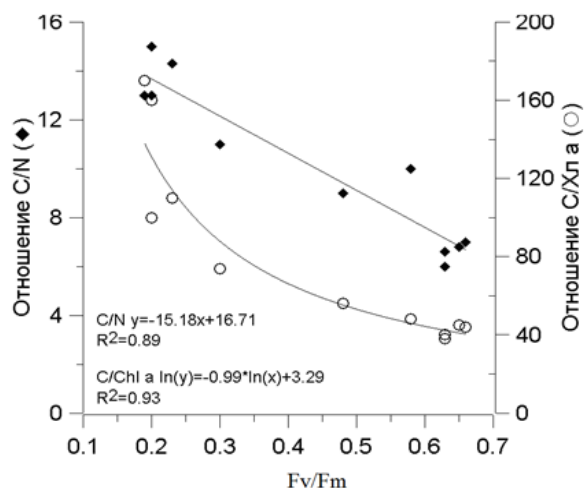


Рисунок 8 – Связь между отношениями C/N, C/Хл и Fv/Fm .

Глава 5 Оценка физиологического состояния микроводорослей по вариабельности размерного спектра клеток. Исследована размерная гетерогенность накопительных культур (*Chaetoceros affinis*, *Skeletonema costatum*, *Heterocapsa triquetrum*, *Prorocentrum pusillum*, *Chlorella vulgaris suboblonga*, *Phaeodactylum tricornutum*) на разных этапах их роста и при разных световых и температурных условиях культивирования. Отмечено, что изменение объёмов клеток водорослей не является существенным показателем, указывающим на деградацию культур или потерю их жизнеспособности. Коэффициент вариации объёмов клеток представляет собой более чувствительный параметр при рассмотрении гибели культуры и может лежать в основе косвенного критерия, используемого для оценки физиологического состояния водорослей. Высокие значения гетерогенности объёмов клеток культур получены в стационарной фазе роста, при освещённости $206 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, и при температуре $10 \text{ }^\circ\text{C}$, что свидетельствует о переходе водорослей из состояния гомеостаза в стрессовое состояние и о возрастании количества мёртвых и неактивных клеток. Стрессовые условия приводят к деструктивным изменениям в мембранах хлоропласта – слипанию фотосинтетических мембран, увеличению интрамембранного пространства, а также к разбуханию пластид, прогрессирующей вакуолизации, результатом чего является деплазмолиз и изменение формы клеток (Bray et al, 1993; Porova et al., 2004).

Глава 6 Структурные характеристики и функциональное состояние пико- и нанофитопланктона в прибрежных водах Черного моря. Результаты исследований с тестовыми видами микроводорослей, представленные в предыдущих разделах, показали, что при потере водорослями своей жизнеспособности, клетки в большей степени не отмирают, возрастает доля малоактивных клеток, процент мёртвых клеток не велик и зависит от морфологических особенностей вида и степени воздействия факторов среды.

Обоснованный на монокультурах одноклеточных водорослей подход использования количества жизнеспособных клеток и параметр FDA_{fl} в качестве индикаторов функционального состояния водорослей апробировали на природном фитопланктоне, в частности для оценки физиологического состояния пико- и нанофракций (рис. 9).

В период исследований в прибрежных водах, доля жизнеспособных клеток пико и нанофитопланктона изменялась от 70 до 100 %, составляя в среднем 80 %, что указывает на отсутствие сезонной её вариабельности. Следует отметить, что FDA окрашивает не только живые, активные клетки, но и малоактивные, находящиеся в покоящейся стадии, с неразрушенной цитоплазматической мембраной. Флуоресценция таких клеток значительно слабее по сравнению с живыми активными клетками.

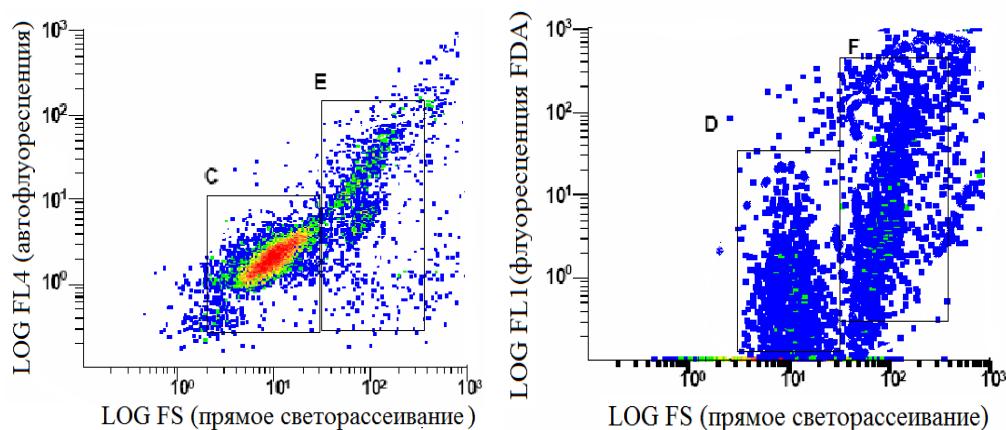


Рисунок 9 – Типичные цитограммы неокрашенных (слева) и окрашенных FDA (справа) проб фитопланктона (С–пикофракция, Е–нанофракция, D и F клетки пико- и нано фитопланктона окрашенные FDA).

Отмечено, что рассматриваемые в работе абиотические факторы среды (интенсивность света, содержание биогенных элементов в среде) не оказывали существенного влияния на величину флуоресценции FDA, за исключением температуры: в теплый период года в черноморском биоценозе наиболее активен пикофитопланктон, в то время как холодный период года благоприятен для развития нанофитопланктона (рис. 10).

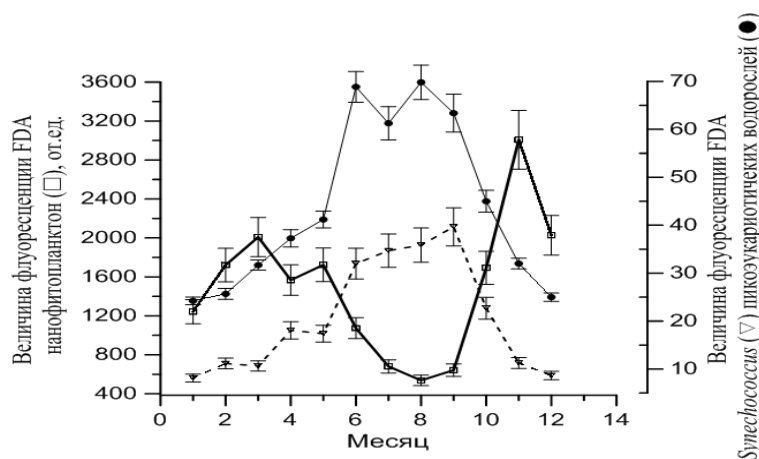


Рисунок 10 – Сезонный ход величины флуоресценции FDA выделенных групп фитопланктона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа расширяет имеющиеся представления о возможностях оценки и контроля функционального состояния микроводорослей в культурах и при исследовании морских биоценозов. Комплексное применение методов проточной цитометрии, относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* 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 сообщества фитопланктона (на примере пико- и нано-фракций) на протяжении всего годового цикла его развития в прибрежном районе Черного моря. Сравнительные исследования, выполненные в настоящей работе, показали, что такие параметры как FDA_{fl} , Fv/Fm и количество жизнеспособных клеток в популяции могут быть использованы в качестве перспективных маркеров в целях диагностики состояния первично-продукционного звена водных экосистем.

ВЫВОДЫ

1. Успешно апробирован в экспериментах с модельными культурами водорослей и в полевом исследовании сообществ черноморского пико и нанофитопланктона метод окрашивания водорослей диацетатом флуоресцеина (FDA) для дифференциации клеток с разной функциональной активностью, который позволил впервые использовать параметр удельной флуоресценции (FDA_{fl}) для экспресс контроля функционального состояния водорослей.

2. В культурах водорослей присутствуют клетки с разной функциональной активностью: активные, малоактивные и мертвые. Процент мёртвых клеток при оптимальных условиях роста составляет 1-2 % от общей биомассы водорослей для видов, имеющих ригидные кремне - или целлюлозосодержащие оболочки, и не превышает 0,5 % для клеток, окруженных цитоплазматической мембраной. При неблагоприятных условиях роста доля мёртвых и разрушенных клеток возрастает до 30 % для видов, имеющих клеточную оболочку и существенно меньше для видов без неё. Доля малоактивных клеток в разные моменты роста культур составляет от 40 % до 80%.

3. Показана возможность применения параметра FDA_{fl} и максимальной квантовой эффективности фотосинтеза (Fv/Fm) как возможных индикаторов контроля физиологического состояния водорослей в широком градиенте условий среды: от оптимальных до экстремальных условий. При высокой интенсивности света и высокой температуре, а также в условиях азотного лимитирования коэффициент переменной флуоресценции хлорофилла значительно снижается, тогда как величина флуоресценции FDA - более устойчивый параметр. Высокий уровень эстеразной активности в клетках сохраняется при исчерпании внутриклеточных запасов азота, и практически

при отсутствии скорости роста водорослей и синтеза хлорофилла *a*. Действие светового и температурного факторов на флуоресценцию FDA проявляется только при крайних значениях, имеющих летальный или близкий к ним характер, что позволяет использовать этот показатель как индикатор жизнеспособности водорослей при экстремальных условиях.

4. В стационарной фазе роста при высокой интенсивности света и низкой температуре наблюдается высокая степень гетерогенности клеточных объемов водорослей. Коэффициент вариации объема клеток водорослей может служить показателем физиологического состояния популяции.

5. Доля жизнеспособных клеток в пико и нанофитопланктоне в прибрежных водах Черного моря составила в среднем 80 %, что указывает на относительную стабильность функционирования сообщества в годовом цикле. В теплый период года в черноморском альгоценозе наиболее активен пикофитопланктон, в то время как холодный период благоприятен для развития нанофитопланктона.

ОСНОВНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science:

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.

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ и ВАК Украины

(опубликованные до 1 января 2015 г):

5. **Соломонова Е.С.** Вариабельность размеров у некоторых видов черноморских диатомей / **Е.С. Соломонова** // Экология моря. – 2009. – Вып. 78. – С. 81-86.
6. **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.

7. **Соломонова Е.С.** Влияние температуры и света на вариабельность размеров клеток микроводорослей/ **Е.С. Соломонова** // Рибне господарство України. – 2011. – Т. 5. – С. 28-32

8. **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.

9. **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.

10. **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.

11. **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.

12. **Соломонова Е.С.** Подход к оценке жизнеспособности микроводорослей по вариабельности размерного спектра клеток / **Е.С. Соломонова** // Ботанический журнал. – 2017. – Т. 5. – С. 617-628.

13. **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.

Материалы и тезисы конференций

14. **Соломонова Е.С.** Вариабельность размеров некоторых видов диатомовых при одинаковых и различных условиях освещения/ **Е.С. Соломонова** // Pontus Euxinus: тез. VI Всерос. науч.-практ. конф. молодых учёных (с междунар. участием) по проблемам водных экосистем, г. Севастополь, 21–24 сент. 2009 г. – Севастополь, 2009. – С. 90–91.

15. **Соломонова Е.С.** Определение жизнеспособности клеток в культурах микроводорослей с использованием проточной цитометрии/ **Е.С. Соломонова** // Актуальные проблемы ботаники и экологии: сб. тез. междунар. конф. молодых ученых, г. Ялта, 21–25 сент. 2010 г. –Ялта, 2010. – С. 397–398.

16. **Соломонова Е.С.** Оценка доли физиологически активных клеток в накопительных культурах с помощью проточной/ **Е.С. Соломонова** // Біологія: відмолекули до біосфери: сб. тез. междунар. конф. молодых ученых, г. Харьков, 21–25 нояб. 2010 г. – Харьков, 2010.– С. 290–291.

17. **Соломонова Е.С.** Исследование функционального состояния *Chlorella vulgaris suboblonga* методами проточной цитометрии и переменной флуоресценции / **Е.С. Соломонова**, А.И. Акимов // Pontus Euxinus: тез. VIII Всерос. науч.-практ. конф. молодых учёных (с междунар. участием) по проблемам водных экосистем, г. Севастополь, 1–4 окт. 2013 г. – Севастополь, 2013. – С. 138-139.
18. **Соломонова Е.С.** Исследование фотосинтетической неактивной взвеси в культурах некоторых видов водорослей /**Е.С. Соломонова**, А.И. Акимов // Актуальные проблемы ботаники и экологии: сб. тез. междунар. конф. молодых ученых, г. Щелкино, 18–22 июня 2013 г. – Щелкино, 2013. – С. 270–271.
19. **Соломонова Е.С.** Сезонная динамика физиологически активных клеток в природном сообществе фитопланктона Черного моря /**Е.С. Соломонова** // Биоразнообразии и устойчивое развитие: Материалы 3 й междунар.науч.-практ. конф., г. Симферополь, 15–19 сент. 2014 г.– Симферополь, 2014. – С. 337–339.
20. **Solomonova E.S.** Effect of the light on the enzymatic activity of the cells *Chlorella vulgaris suboblonga* and *Phaeodactylum tricornutum* / **E.S. Solomonova** // Physiology and biotechnology of oxygenic photoautotrophic microorganisms: looking into the future: International scientific conference immemorial of the 80-th anniversary of M.V. Gusev, Moscow, 27–30 may 2014. – Moscow, 2014. – С. 4.
21. **Соломонова Е.С.** Оценка состояния водорослей методами проточной цитометрии и переменной флуоресценции / **Е.С. Соломонова**, Н.Ю. Шоман // Морские биологические исследования: достижения и перспективы: тез. всерос. науч.-практ. конф. учёных (с междунар. участием), приуроченной к 145-летию Севастопольской биологической станции, г. Севастополь, 19–23 сент. 2016 г. – Севастополь, 2016. – Т. 2. – С. 447–450.
22. **Соломонова Е.С.** Влияния света и температуры на коэффициент переменной флуоресценции и FDA активность, их сопоставление с ростовыми характеристиками, внутриклеточным содержанием хлорофилла на примере водоросли *Phaeodactylum tricornutum*/ **Е.С. Соломонова**, А.И. Акимов, Н.Ю. Шоман // Перспективы и проблемы современной гидробиологии: тез. докл. всерос. молод. гидробиологическая конф., г. Борок, 10-13 нояб.2016 г. – Ярославль, 2016. – С. 195- 197.
23. **Соломонова Е.С.** Оценка жизнеспособности микроводорослей по варибельности размерного спектра клеток при акклимации к различной температуре / **Е.С. Соломонова** // Перспективы и проблемы современной гидробиологии: тез. докл. всерос. молод. гидробиологическая конф., г. Борок, 10–13 нояб.2016 г. – Ярославль, 2016. – С. 193–195.
24. **Соломонова Е.С.** Оценка функционального состояния культуры *Phaeodactylum tricornutum* в условиях накопительного роста методами проточной цитометрии и переменной флуоресценции / **Е.С. Соломонова**, А.И. Акимов, Н.Ю. Шоман // Комплексные исследования Мирового океана: сб. тез. II всерос. научной конференции, г. Москва 10–14 апр. 2017 г. – Москва, 2017. – С. 417–421.

Научное издание

Соломонова Екатерина Сергеевна

**Оценка физиологического состояния микроводорослей с помощью
цитометрических и флуоресцентных показателей**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Подписано в печать 18.05.2021