

«УТВЕРЖДАЮ»



Проректор по науке ФГАОУ ВО

«Уральский федеральный университет

имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»,

к. ф.-м.н., с.н.с.

Б.В. Кружаев

«\_\_\_» октября 2018 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Розиной Светланы Алексеевны «Эколо-физиологические реакции высшего водного растения *Ceratophyllum demersum* на действие гипертермии и химических факторов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.08 – экология (биология) и 03.01.05 – физиология и биохимия растений

В диссертационной работе Розиной С.А. представлены результаты оригинальных модельных исследований, направленных на оценку ответных реакций высшего водного растения *Ceratophyllum demersum* на действие поллютантов (свинца и СПАВ) и гипертермии (как раздельное, так и одновременное).

**Актуальность темы диссертационной работы.** В связи с усилением антропогенных нагрузок на водные экосистемы все большую значимость приобретают данные об адаптивных возможностях водных макрофитов, являющихся основными продуцентами в гидроэкосистемах. В естественных условиях обитания живые организмы подвергаются, как правило, влиянию комплекса факторов окружающей среды, в том числе и неблагоприятных. Однако к настоящему времени механизмы устойчивости растений к одновременному действию различных стрессоров изучены недостаточно. Это связано со сложностью моделирования действия нескольких факторов и проблемами адекватного разграничения эффектов их влияния при одновременном (комбинированном) действии. В связи с этим актуальность проведенных исследований не вызывает сомнений.

**Новизна проведенных исследований и полученных выводов.** Впервые проведен комплексный анализ эколо-физиологических ответных реакций высшего водного растения *C. demersum* при одновременном действии химических стрессоров и гипертермии и в постстрессовый период. Выявление особенностей протекания стрессовых реакций позволило обнаружить интересные закономерности, проявляющиеся в том, что стадия первичной стрессовой индукции протекает сходно при действии любого из изученных факторов и их комбинации, а фазы адаптации и реабилитации в значительной степени зависят от природы стрессового фактора.

**Теоретическая значимость полученных результатов и выводов.** Материалы диссертационной работы расширяют представления о механизмах влияния поллютантов и гипертермии на высшие водные растения на клеточном уровне и способствуют лучшему пониманию адаптивного потенциала макрофитов при одновременном действии стрессоров химической и физической природы.

### Практическое значение полученных результатов.

Изучение ответных реакций водных растений на действие стрессовых факторов различной природы и их комбинации необходимо для оценки и прогнозирования состояния фитоценозов водных экосистем в условиях техногенного воздействия и климатических изменений. Выявление адаптивных возможностей *C. demersum* в условиях действия химических и физических стрессоров является научной основой для более эффективного использования водных макрофитов в целях биомониторинга и фиторемедиации водных экосистем.

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, выводов, списка использованной литературы (включающего 191 источник, из которых 51 – на английском языке) и приложений.

Во введении обоснована актуальность темы исследований, сформулированы цель, задачи исследования, отражены теоретическая и практическая значимость и защищаемые положения, показана связь темы диссертации с плановыми исследованиями. Показано, что результаты работы прошли широкую апробацию и опубликованы в 22 печатных работах, в том числе 4-х статьях в рецензируемых журналах из перечня ВАК.

В первой главе представлен обзор литературы: последовательно рассмотрены основные повреждающие эффекты гипертермии и таких стрессовых химических факторов как ТМ и СПАВ и описаны ответные адаптационные реакции растительных организмов.

Во второй главе дано описание объекта исследования, представлена схема экспериментов и указаны методы исследования.

В третьей главе представлены результаты исследования и их обсуждение. Глава достаточно хорошо структурирована. Изложение текста логичное и последовательное: сначала рассмотрено изменение физиолого-биохимических характеристик *C. demersum* под влиянием химических и физических стрессоров по отдельности, а затем – наблюдаемые эффекты при их совместном действии.

Вместе с тем, по диссертационной работе имеется много замечаний и вопросов:

1. Название диссертационной работы звучит очень широко, поскольку из химических факторов изучено влияние только двух (свинца и СПАВ) без адекватного обоснования их выбора. Для оценки адаптационных возможностей растений недостаточно использования одной концентрации этих поллютантов; представляется целесообразным предварительное изучение ответных реакций выбранного модельного вида в градиенте их концентраций и комбинаций.

2. В разделе «Актуальность работы» второе предложение логически не связано с первым. Не совсем удачным, на наш взгляд, является выражение «...представления о механизмах влияния ТМ, катионных СПАВ, гипертермии и их различных сочетаний».

3. Выносимые на защиту положения во многом противоречат результатам исследования. Например, второе защищаемое положение: «Комбинированное влияние факторов оказывает большее повреждающее действие на организм *C. demersum*, чем индивидуальное» вступает в противоречие со вторым выводом: «совместное действие гипертермии и поллютантов оказывало меньшее негативное воздействие, чем отдельное их действие».

4. Обзор литературы чересчур лаконичный и достаточно поверхностный. К сожалению, нельзя сказать, что тема исследований глубоко проработана. Мало современных источников (за последние 5 лет). Ссылки в тексте на многие источники даны некорректно: согласно общепринятым правилам, если у статьи или монографии 2 автора, то в тексте указывают обе фамилии, если 3 и более – тогда уже только фамилия первого автора с добавлением «и др.». Например, на стр. 10 – Филенко и др. 2007 (надо Филенко, Михеева, 2007); на стр. 17 – Пучкаев и др., 1992 вместо Пучкаев, Метелица, 1992; Телитченко и др. вместо Телитченко, Остроумов и т.д. У некоторых источников год издания, указанный в текстовой ссылке, отличается от года в библиографическом списке: на стр. 16 – Давлетшин, 2009, а в списке 1998; на стр. 17 – Лосева и др., 1988, а в списке 1983. Вызывает удивление ссылка на стр. 12 (табл. 2) на Малееву, 2004, которой нет в списке. Очевидно, речь шла о работе Малевой М.Г. с соавторами, но в этой статье данные, на которые ссылается автор, отсутствуют.

5. Не совсем корректно описана схема опыта. На стр. 7 автореферата указано, что длительность эксперимента составила 8 суток, причем воздействие стрессовых факторов на растения моделировалось максимум 72 часа (3 суток), а потом уже проводилась реабилитация в течение 192 часов (еще 8 суток?). При этом в самой диссертации на стр. 28 в схеме эксперимента есть примечание, что реабилитация проходила в течение 5 суток.

6. К сожалению, автором не использованы возможности современных методов математической статистики, которыми принято оценивать достоверность результатов многофакторных экспериментов. В описании статистики (стр. 7 автореферата) не указано, каким параметрическим методом анализа рассчитывали достоверность различий. И почему выбрали параметрический метод – оценивали ли нормальность распределения значений? Параметрические методы можно применять только при условии большой выборки, не менее 30 значений для каждого параметра. В таблицах указана достоверность различий (причем, только между контролем и опытом, а между опытными вариантами?), но почему-то нет ошибки среднего или стандартного отклонения, поэтому не понятно, какой разброс значений.

7. Описание использованных методик биохимического анализа также вызывает много вопросов. В работе отмечено, что эксперименты повторяли 5 раз. Однако калибровочные графики, которые приведены в приложениях, «мягко говоря», оставляют желать лучшего. Однозначно, по ним нельзя было определять содержание белка. Калибровочный график для определения содержания фенолов выглядит странно – принято оптическую плотность откладывать по оси ординат, а концентрацию веществ – по оси абсцисс. Не совсем понятно, почему содержание фенольных соединений в листьях растений рассчитано на мг/л. Что помешало автору сделать пересчет на г сырой или сухой массы? Кроме того, не понятно, почему, как указано в методике, калибровку для фенолов строили по бензолу?

8. Не понятно, почему активность каталазы выражена в нкат/л? Литр чего? Почему нельзя было рассчитать ее на г сырой или сухой массы или мг белка?

9. Не корректно описаны методики в разделе «Материалы и методы», особенно по определению содержания фотосинтетических пигментов, например, как понимать такую фразу «каждый экземпляр растения, растертый до состояния кашицы...», без указания массы навески и т.д. Не описано, как рассчитывали долю хлорофиллов в ССК.

10. Очень спорным моментом является выделение экстрактов ферментов в дистиллированной воде, а не в буфере. Известно, что ферменты очень чувствительны ко многим факторам, в частности к изменению pH, вызванному высвобождением клеточного сока растений при растирании, ионам металлов и т.д. Именно поэтому их выделяют в буферные смеси, как минимум, а то и в специальные реакционные смеси.

11. При очень подробном описании процедуры растирания образцов при экстракции белков автор не указывает, какую форму Кумасси голубого использовали для количественного определения белков. Неверно обозначен бычий сывороточный альбумин (почему-то HSA, а не BSA), который использовали для построения калибровочного графика.

12. В третьей главе автор часто ограничивается простой констатацией полученных результатов (выше или ниже контроля и т.д.), но они никак не обсуждаются.

Например, нет никакого объяснения резкого уменьшения содержания МДА через 72 часа инкубации на металле (рис. 9). И как-то неправдоподобно резко уменьшается содержание растворимого белка за 4 часа, при том, что потом оно снова увеличивается (рис. 8). Отсутствует также обсуждение существенного снижения содержания белков при действии СПАВ на коротких экспозициях и при 72 часов.

13. На рис. 19б показано резкое снижение содержания МДА после трехдневной инкубации в условиях гипертермии (ниже контроля в 2,4 раза). В тексте (стр. 55) снижение содержания МДА объясняется «работой АОС по ликвидации АФК», что выглядит неубедительным и вызывает много дополнительных вопросов.

14. Автором сделана правомерная попытка схематизировать ответные реакции макрофита на действие стрессовых факторов. Однако в этих схемах часто фигурируют процессы и явления, которые в данной работе не оценивали. Если это приводится на основе данных других авторов, то необходимо делать ссылки. Вывод о неблагоприятном влиянии свинца на фотосинтез в фазу индуктивного стресса не обоснован (поскольку сам фотосинтез или активность его ферментов не измерялись).

15. Содержание фотосинтетических пигментов и другие физиологические показатели рассчитаны на единицу сырой массы. К сожалению, в работе не указано отношение сырой массы листьев модельных растений к сухой, что затрудняет сопоставление полученных результатов с имеющимися в литературе данными. Известно, что у роголистника это отношение достаточно высокое (более 10), поэтому содержание хлорофилла 3,5 мг/г сырой массы в пересчете на сухой вес дает завышенное значение.

16. Не понятно, почему автор относит к фотосинтетическим пигментам только хлорофиллы: на стр. 38 и 44 – «снижение содержания фотосинтетических пигментов (хлорофиллов) и повышение содержания каротиноидов», на стр. 66 – «содержание фотосинтетических пигментов было ниже...., тогда как содержание каротиноидов .....». Кроме того, автор неверно трактует отношение хлорофилл *a*/хлорофилл *b* как показатель фотосинтетической активности.

17. Судя по рисункам, в эксперименте было применено две временные схемы: первая – 1, 2, 4, 12, 72 часа, а вторая – 12 и 72 часа. Об этом ничего не написано в методической главе. Кроме того, это делает невозможным сравнение изученных показателей, например, изменение содержания водорастворимых и мембранных белков и т.д.

18. Заключительная часть диссертации чересчур лаконичная, состоит всего из трех выводов, которые, хотя в целом соответствуют поставленным задачам, являются недостаточно конкретными и не вытекают из представленных результатов.

19. Текст работы плохо вычитан: много опечаток, неудачных оборотов и даже некорректных выражений:

стр. 12 – в табл. 2 ацетилхолин назван ферментом, однако, это нейромедиатор, по химической природе – амин, а не белок;

стр. 15 – заголовок табл. 3: «Пути детоксикации с помощью биомолекул». Детоксикации – чего?

стр. 24 – «высокое содержание доли хлорофиллов в ССК»;

стр. 28 – схема эксперимента почему-то названа таблицей, в то время как в дальнейшем различные схемы правомерно названы рисунками;

стр. 36 – «Фаза реабилитации отражает возможность макрофитов возвращаться к исходному состоянию эколого-физиологических характеристик»;

стр. 38 и 44 – «синца» (пропущена буква в слове «свинец»);

стр. 44 – «на первых этапах работают нормальные ферменты клетки». Что значит нормальные?

стр. 45 – экспозиция «в среде катионных СПАВ приводит к листопаду» (дефолиации?);

стр. 50 – «Многократное повышение каталазной активности, являющееся индикатором загрязнения окружающей среды»;

стр. 67 – «в тканях» продублировано и т.д.

Подводя итоги, хотелось бы добавить, что осмысление полученных результатов и выводы вызывают много вопросов и сомнений в силу отсутствияенной статистической обработки материалов исследования, некорректного применения методик.

#### **Заключение по диссертационной работе:**

Несмотря на большое количество замечаний, выявленных недостатков и недоработок, диссертация Розиной С.А. является завершенной научно-квалификационной работой, основанной на большом объеме экспериментального материала, и имеет научную и практическую значимость. Основные материалы диссертации опубликованы и апробированы автором. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

В целом диссертационная работа соответствует требованиям пп. 9–11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», принятого Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор, Розина Светлана Алексеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.08 – экология (биология) и 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Отзыв рассмотрен, обсужден и утвержден на расширенном заседании кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Института естественных наук и математики Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (протокол № 7 от 11 октября 2018 г.). Присутствовало 9 человек, в том числе 1 доктор географических наук и 6 кандидатов биологических наук. Голосование: «за» – 5; «против» – 4; «воздержавшихся» – нет.

Кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой экспериментальной биологии и биотехнологий Института естественных наук и математики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19  
Тел. 8 3433899728;  
e-mail: irina.kiseleva@urfu.ru

Киселева Ирина Сергеевна

Подпись Киселевой И.С. заверяю

Доктор географических наук, с.н.с., профессор кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Института естественных наук и математики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19  
Тел. 8 3433899728;  
e-mail: G.G.Borisova@urfu.ru

Борисова Галина Григорьевна

Подпись Борисовой Г.Г. заверяю

Кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Института естественных наук и математики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19  
Тел. 8 3433899728;  
e-mail: maria.maleva@mail.ru



Малева Мария Георгиевна

Подпись Малевой М.Г. заверяю

ПОДПИСЬ Киселевой  
ЗАВЕРЯЮ.

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ УРФУ  
ОЗЕРЕЦ Н.Н.