

**МИНОБРНАУКИ РОССИИ**  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**«Федеральный исследовательский центр  
«Пушинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук»**  
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д.3.  
Тел./факс: (4967)73-26-36, e-mail: [info@pncbi.ru](mailto:info@pncbi.ru), <https://www.pncras.ru>  
ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983, ИНН/КПП 5039002841/503901001

08.09.2023 № 191-01-2115/518

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»

ДИРЕКТОР ФИЦ ПНЦБИ РАН

д.ф.-м.н. П.Я. Грабарник

  
« 07 » сентября 2023



**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» на диссертационную работу Лелекова Александра Сергеевича «Количественные закономерности роста микроводорослей в культуре и параметры управления процессом фотобиосинтеза», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Микроводоросли являются продуцентами ряда полезных веществ, включая антиоксиданты, красители, витамины, криоконсерванты, осмопротекторы и, наконец, всю биомассу клеток. Они являются удобными моделями при изучении процессов фотосинтеза, перспективными объектами для возможного использования в системах



очистки сточных вод, загрязненных органическими соединениями и как преобразователи солнечной энергии в энергоноситель – молекулярный водород. Сотни лабораторий во всем мире занимается их исследованиями. Рынок одних только БАД составляет несколько миллиардов долларов. Однако в нашей стране производство микроводорослей находится все еще в упадке по сравнению с СССР. Именно поэтому разработка простых и эффективных моделей роста микроводорослевых популяций в лабораторных и промышленных культиваторах – фотобиореакторах – является своевременной и **актуальной**.

**Целью** работы А.С. Лелекова являлась разработка теоретических основ моделирования фотосинтеза микроводорослей в культуре. Для достижения поставленной цели диссертант решал задачи по оценке применимости существующих подходов моделирования роста микроводорослей; разработке динамической модели роста микроводорослей с учетом смены лимитирующего фактора; формулировке принципов моделирования при рассмотрении роста как совокупности энергообменных реакций; верификации полученных моделей на экспериментальных данных, а также по верификации моделей в экспериментах и оценке предельной продуктивности микроводорослей в условиях южного берега Крыма.

Диссертация А.С. Лелекова построена по стандартной схеме и состоит из введения, семи глав, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка использованной литературы.

**Первая глава** посвящена обзору опубликованных в литературе кинетических моделей роста культуры микроводорослей. В первом разделе автор описывает параметры роста культуры микроводорослей. Во втором разделе рассматривается рост культур в закрытых и открытых системах. Обзор состояния работ в этой области даёт достаточно полную картину результатов исследований, опубликованных в мировой литературе вплоть до 70-80х годов прошлого века, но, к сожалению, не более поздних работ. В частности, рис. 1.1, взятый из литературы прошлого века, не может представлять современное понимание устройства Z-схемы фотосинтеза. Описание первичных процессов поглощения квантов и разделения зарядов при фотосинтезе не соответствует действительному; оно основано на понимании 70-х годов XX века. Литературный обзор вместо описания имеющихся современных моделей роста микроводорослевых популяций очень часто ограничивается словами «...имеется множество моделей...». Недостатком этих разделов, как и всего текста диссертации является то, что автор заменяет практически все общепринятые обозначения в описании роста микроорганизмов



(одинаково используемые для аэробных и анаэробных, хемогетеротрофных и фототрофных микроорганизмов) на свои собственные нестандартные обозначения. Это существенно затрудняет чтение и анализ описываемого материала. Не очень понятно, зачем автор разделяет понятия накопительной и периодической культуры. Ведь если накопительная культура пересеивается даже раз в год, она проходит те же стадии регулярно, т.е. является по определению периодической. К тому же, фазы роста описаны некорректно, как и причина лаг-фазы.

Третий раздел обзора описывает модели светозависимого роста микроводорослевых популяций. Четвёртый раздел описывает особенности поглощения минеральных компонентов — азота, фосфора и минерального углерода микроводорослями, а также моделированию их потребления. Эти разделы также дают представление о состоянии разработок в данной области. Однако и здесь автор ограничился описанием моделей, опубликованных около полвека назад, и это не позволяет сделать вывод о том, что автор знаком с современной литературой. В этих разделах описаны механизмы использования минеральных компонентов и углерода, которые распространены также среди хемотрофных микроорганизмов, хотя и с использованием других генетических структур. Было бы логично, если бы автор показал отличительные особенности микроводорослей в сравнении с другими микроорганизмами, в частности, хемоавтотофами, способными к ассимиляции минерального углерода. Однако такое сравнение в диссертации отсутствует.

В пятом разделе описано моделирование содержания пигментов в биомассе от интенсивности света. В этом же разделе описано моделирование влияния температуры на скорость роста микроводорослей. Здесь, имеет место тот же недостаток: рассмотрены модели, не учитывающие современные представления о регуляции синтеза каротиноидов и хлорофиллов в клетках микроводорослей и цианобактерий.

В целом литературный обзор производит противоречивое впечатление. С одной стороны, автор показывает, что он хорошо знаком с литературой, использованной при написании обзора. С другой стороны, ни в одном из разделов не использованы современные представления о механизмах, лежащих в основе процессов, происходящих внутри клетки, а сама популяция рассматривается как «черный ящик» без учета современных знаний — подход, активно использовавшийся полвека назад. Об этом же свидетельствует и цитируемая литература, в которой практически не встречается ссылок на современные (моложе 5–10 лет) работы о моделях, основанных на внутриклеточных механизмах, исключая собственные труды автора диссертации и труды Тренкеншу. Тем



не менее, вытекающие из обзора цель и задачи актуальны и сегодня. Их решение может оказаться новым вкладом в моделирование микроводорослевых популяций.

**В главе 2** «Материал и методы исследований» описана установка для лабораторного культивирования с двумя фотобиореакторами, биотехнологический модуль для выращивания при естественном освещении и другие аппараты и методы. Заслужой автора следует считать создание как лабораторного, так и оборудования для открытого воздуха для выращивания микроводорослей. Культивационное оборудование создано с учетом современных представлений о фотобиореакторах. Оно позволяет проводить как периодическое, так и хемостатное культивирование. Из описания следует, что сбор информации от датчиков проводится автоматизированно. К сожалению, автор не указал способ сопряжения датчиков с компьютером и используемое программное обеспечение. При описании разработанного ФБР нет сравнения с уже описанными в литературе ФБР, причем Россия по-прежнему остается в числе лидирующих стран в этой области. Описание других стандартных подходов сделано удовлетворительно, хотя в данном разделе остался неосвещенным вопрос об измерении мутности культуры. Автор совершил опisku, указав, что стремится к снижению вклада мутности в измерение оптической плотности. Это связано с тем, что измерение на указанной длине волны является не турбидиметрией, а нефелометрией, поскольку на 750 нм изучаемые микроводоросли не поглощают свет, т.е. именно мутность показывает, какова концентрация клеток.

**В главе 3** «Динамические модели роста накопительной культуры микроводорослей» автор рассматривает предложенные им модели роста микроводорослей. В общем случае на классической S-образной накопительной кривой выделяется минимум два участка: область неограниченного (нелимитированного) роста и область лимитирования. Поэтому автор предлагает описывать зависимость скорости синтеза биомассы от концентрации лимитирующего субстрата линейными сплайнами: в первом случае скорость синтеза биомассы прямо пропорциональна концентрации лимитирующего субстрата, а при некоторой пороговой концентрации скорость синтеза достигает максимума. Этот подход, безусловно, упрощает моделирование.

Данный подход автор применяет при описании динамики плотности культур микроводорослей. Им рассмотрено также использование логистической функции и показано, что она описывает кривую роста не совсем точно. В связи с этим возникает вопрос: почему автором не использовалось широко применяемое в последнее время уравнение Гомпертца (Gompertz), которое описывает полностью всю кривую роста. Оно, конечно выглядит сложнее, чем линейный сплайн, но при наличии современных



компьютерных программ это неудобство не приводит к большим затратам времени. В любом случае сравнение полученных моделей и описанной логистической функции с уравнением Гомпертца было бы полезно, в литературном обзоре, в данном разделе или в обсуждении результатов. В этой же главе рассмотрены усложнённые модели, учитывающие потерю биомассы, рассматривающие стационарную фазу с колебаниями концентрации микроводорослей, описывающие динамику роста при отсутствии непрерывной подачи углекислоты, при синтезе пигментов в условиях стресса. Все полученные модели удовлетворительно описывают экспериментальные данные, несмотря на то, что в ряде случаев логика построения моделей вызывает вопросы.

**В главе 4** «Моделирование энергообмена микроводорослей на макромолекулярном уровне организации» автор формулирует методологические основы моделирования роста культур микроводорослей. При этом основополагающим подходом является разделение процессов массо- и энергообмена. В этом подходе ключевым моментом является учет энергии, пришедшей клеткам в виде света. Автор отмечает, что при фотосинтезе образуются 2 вида энергоносителей: АТФ и НАДФН (третий вид переносчика энергии — трансмембранный градиент электрохимического потенциала протонов автором не рассматривается). Само по себе выделение энергоносителей в отдельное множество метаболитов справедливо, хотя и не является изобретением автора диссертации. Недостатком изложения является некорректное использование термина «макроэрги», к которым автор относит и НАДФН (хотя и с оговоркой, что это, строго говоря, не макроэргическое соединение). Вообще, вольности в терминологии и обозначениях, свойственные автору, не способствуют восприятию его текста читателем.

Далее автор рассматривает зависимость скорости роста культур от скорости потока субстрата, описывает случай ограничения скорости синтеза биомассы внутриклеточными потоками и переходит к описанию роста культур линейными сплайнами. Этот подход позволяет существенно упростить модель. При этом модель хорошо описывает участок возрастания скорости фотосинтеза при возрастании интенсивности света и участок насыщения фотосинтеза светом. Также система сплайнов хорошо описывает участок роста при избытке нитратов и участок при их исчерпании. Модель на основе сплайнов позволяет описывать и температурные зависимости. В этой же главе автор сформулировал принципы, на которых должно строиться моделирование роста интенсивных культур.

**В главе 5** «Светозависимый рост микроводорослей в культурах невысокой плотности» предложены выражения, позволяющие описывать зависимости удельной скорости роста микроводорослей, соотношения резервная/структурная биомасса и



плотности культуры, содержания хлорофилла *a* от интенсивности света для турбидостатных культур. Полученные три модели в целом соответствуют известным экспериментальным данным. Ключевым аспектом предлагаемого подхода является то, что световую кривую нельзя рассматривать как единое целое и необходимо разделять её на участки (области). С ростом облучённости происходит смена лимитирующего фактора, что выражается в изменении функциональной зависимости удельной скорости роста  $\mu$  от интенсивности света. В соответствии с предлагаемой двухкомпонентной моделью на кривой можно выделить не менее трёх участков: световое лимитирование, метаболическое лимитирование, а также область насыщения.

Здесь мы делаем следующие замечания. Диапазоны сверхвысоких (выше  $500 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ ) и малых облучённостей (ниже «компенсационного пункта» фотосинтеза) автором не рассматривались. Максимальные удельные скорости фото- и биосинтеза можно считать постоянными только в области невысокой интенсивности света, при которой эффективность преобразования световой энергии максимальна. При рассмотрении логики, ведущей к построению моделей, остается невыясненным, чем метаболическое лимитирование отличается от области насыщения, ведь когда свет перестает быть лимитирующим фактором, остается только метаболическое лимитирование, которое и приводит к насыщению скорости фотосинтеза.

**В главе 6 «Моделирование динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей»** автором предложены модели кинетики поглощения азота, трансформации азота внутри клеток, динамики азотистых соединений в накопительной культуре и хемостате. На основе этих конкретных вариантов автор разрабатывает общую модель динамики азотистых соединений в хемостате.

Основополагающим тезисом при создании моделей, описывающих азотный метаболизм, автор предлагает разделение внутриклеточного азота на структурный и резервный. При этом не приводится ни одного примера резервных форм азота в микроводорослевой клетке и остается непонятным, что автор имеет в виду под этим термином. Согласно современным представлениям, после перехода азотсодержащих субстратов внутрь клетки (независимо от механизма перехода), основными переносчиками азота к реакциям, требующим азота, являются глутаминовая кислота, глутамин, аспарагиновая кислота и карбамоилфосфат. Они циклически переносят азот к потребляющим его реакциям. Является ли азот переносчиков резервным азотом в понимании автора? Резервных азотных соединений, аналогично крахмалу, гликогену как депо углерода в клетках, нет, хотя имеются данные о наличии резервных белков в



растениях, данные об их наличии у микроводорослей автору рецензии неизвестны. Есть и деградировавшие белки, например, D1 белок фотосистемы 2. Безусловно, при недостатке азота фикобилипротеиды, являющиеся функциональной частью фотосинтетического аппарата у цианобактерий, разлагаются (цианобактерии меняют цвет с синезеленого на бурый) и дают азот другим структурным компонентам (белки, нуклеиновые кислоты, хлорофиллы и гем-содержащие белки с кофакторами). Считает ли автор эти соединения резервной формой азота? При продолжительном азотном голодании начинается разложение хлорофиллов с деградацией фотосинтетического аппарата (прежде всего антенн). В этом смысле антенны фотосинтетического аппарата являются резервной формой азота? Возникает естественный вопрос: насколько правомерно выделение части азота в резервную фракцию? Можно предположить, что такие модели не обоснованы биохимически, если под резервным веществом подразумевается азот. В то же время они могут быть полезны, если применять их к другим резервным веществам.

Автор начинает главу 7 «Рост микроводорослей в оптически плотных культурах» с модели связи оптической плотности культуры и ее биомассы. Им получено нелинейное выражение (формула (7.7)), которое достаточно хорошо описывает связь оптической плотности с концентрацией биомассы в пределах последней от 0 до 3 г/л. Этот результат, несомненно, имеет практическое значение. Однако следует отметить, что получен он весьма некорректным способом. Связь оптической плотности культуры с концентрацией светорассеивающих частиц и поглощением ими света на разных длинах волны принадлежит к области весьма сложных оптических явлений, которые изучаются специальной дисциплиной — нефелометрией. Теория рассеивания световых волн требует сложного математического аппарата (см. в качестве примера расчета рассеивания в одномерном случае: Cornet JF, Dussap CG, Cluzel P, Dubertret G. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium spirulina-platensis in photobioreactors .2. identification of kinetic-parameters under light and mineral limitations. *Biotechnol. Bioeng.* 1992;40:826-34). Формулу (7.7), полученную автором, следует рассматривать скорее как

феноменологическую закономерность вида  $D = k \ln \left( \sum_{n=0}^N c_n B^n \right)$ , где коэффициент  $k$  включает в себя и минус перед логарифмом, и основание логарифма, а максимальная степень  $N$  подбирается по экспериментальным данным, как и величины  $c_n$ .

Далее в этой главе автор рассматривает линейный рост микроводорослей в плотной культуре. При этом ранее на стр. 21 автор отмечает: «На сегодняшний день механизм явления линейного роста неизвестен...» Непонятно, что имеет в виду автор под термином



«механизм». Происхождение линейного роста давно и хорошо известно. Соотношение прироста биомассы  $\Delta X$  и потребления субстрата  $\Delta S$  описывается известным выражением:  $\Delta X = Y\Delta S$ , где  $Y$  — выход биомассы из субстрата. Если весь подаваемый субстрат (например, свет для фототрофных микроорганизмов или кислород для хемотрофных микроорганизмов) полностью потребляется культурой (в условиях лимитирования), то  $\Delta S = Const \times \Delta t$ . Если  $Y$  постоянен в течение некоторого времени, то  $X(t) = X(0) + Const \times t$  — прямая линия. Этот случай описан почти полвека назад (Печуркин, Терсков, Анализ кинетики роста и эволюции микробных популяций (в управляемых условиях). Наука. 1975, с. 38). Автор приводит сложный вывод для  $\mu$  и связанных с ней величин с отсылкой на предполагаемое изменение биохимического состава клеток во время линейного роста. Как видно из сказанного, зависимость  $\mu(t)$  получается из простых соображений, а биохимические механизмы, обеспечивающие её, могут быть самыми разными, в том числе в форме простой кинетической регуляции. Полученные автором экспериментальные данные о взаимозависимости удельной скорости роста и содержания хлорофилла в клетках важны для раскрытия механизмов влияния условий среды на кинетику роста клеточной популяции. Важным для получения предсказания максимальной продуктивности является знание максимального выхода биомассы и количества потреблённого клетками лимитирующего субстрата. Определение второй величины в случае света как лимитирующего субстрата является непростой задачей, что автор обсуждает в данной главе.

В следующем разделе **главы 7** автор оценивает максимальную продуктивность микроводорослей в условиях культивирования в естественных условиях Крыма. Расчет проводился на основе литературных данных, по экспериментальным данным энергетической эффективности микроводорослей и собственной экспериментальной оценке падающей световой энергии, причем с учетом ночной потери биомассы. Эти данные не вызывают вопросов, безусловно являются новыми, и их можно отнести в заслугу автора. При моделировании динамики макромолекулярного состава биомассы микроводорослей в условиях естественного освещения, представленном в этой же главе, автор использовал разработанный им подход, основанный на приближении данных набором отрезков прямых. На основе полученных данных автор делает вывод, что после восхода солнца рост микроводорослей в плотной культуре обусловлен только увеличением резервной части биомассы, структурная часть при этом за четыре часа практически не изменяется. Этот вывод является новым, хотя требует дополнительного



осмысления, поскольку он согласуется не со всеми известными экспериментальными данными.

В заключительной части главы 7 автор приводит расчеты возможной продуктивности микроводорослей при снабжении культур углекислотой из воздуха, причём углекислота является лимитирующим фактором. Полученные данные созвучны расчетам, проведенным Цоглиным и суммированным в книге «Биотехнология микроводорослей» (Цоглин, Пронина, 2012).

**Обсуждение результатов** написано скупое. Математическая схема, лежащая в основе разработанных автором моделей, может иметь приложения не только к фотосинтетикам, но и к другим организмам. Автор мог бы использовать это для более широкого обоснования значимости своих результатов.

Сделанные замечания не снижают в целом научно-практической значимости и правомерности основных защищаемых положений и выводов, которые четко сформулированы и соответствуют целям и задачам проведенного исследования. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.2. Биофизика. Содержание реферата отражает основные положения диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук.

Диссертационная работа Лелекова Александра Сергеевича «Количественные закономерности роста микроводорослей в культуре и параметры управления процессом фотобiosинтеза» является законченной научно-квалификационной работой, освещающей вопросы роста микроводорослей в культуре и представляющей основные параметры управления процессом фотосинтеза и отвечает требованиям п. 9-14 Постановления Правительства РФ № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор Лелеков Александр Сергеевич достоин присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Отзыв подготовлен доктором биологических наук (специальность – 03.02.03. Микробиология), зав. лабораторией биотехнологии и физиологии фототрофных организмов, директором Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Цыганковым Анатолием Анатольевичем.



Отзыв заслушан и утверждён на заседании институтского семинара ИФПБ РАН.  
Присутствовали 20 человек, в том числе 6 докторов наук, 10 кандидатов наук, 4  
сотрудника без степени. Протокол № 3 от 7 сентября 2023 г.

Доктор биологических наук,

Зав. лаб. биотехнологии и физиологии фототрофных организмов,

директор ИФПБ РАН



А. А. Цыганков

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный  
исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН)

Адрес: 142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д.3.

Тел. 8(4967)73-26-36

Подпись Цыганкова А. А. заверяю  
Начальник отдела кадров [redacted]  
07.09.2023

