

На правах рукописи



САЧАВСКИЙ АЛЕКСАНДР АЛЕКСАНДРОВИЧ

**УПРАВЛЯЕМОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СООБЩЕСТВ
МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Научный руководитель: доктор технических наук, доцент,
Калёнов Сергей Владимирович

Официальные оппоненты: **Дедыш Светлана Николаевна**, доктор биологических наук, федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной экологии и филогеномики бактерий Института микробиологии им. С.Н. Виноградского;

Кригер Ольга Владимировна, доктор технических наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», профессор факультета биотехнологий

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск.

Защита диссертации состоится «24» июня 2026 г. в 14.00 часов на заседании объединённого диссертационного совета 99.2.028.02, созданного на базе ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», по адресу: 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68, Зал заседаний Ученого Совета (А-330).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» и на сайте https://www.kstu.ru/event.jsp?id=179453&id_cat=141.

Автореферат разослан «___» апреля 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
99.2.028.02



Хабибрахманова
Венера Равилевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Метанотрофные бактерии (МОБ) или метанотрофы широко представлены в большинстве природных зон, в которых даже в небольших количествах присутствует метан и кислород. Метанотрофы, в силу специфического метаболизма и способности расти на недорогом и доступном сырье, которым является метан, зарекомендовали себя в качестве продуцентов широкого спектра соединений. Наиболее перспективными из них являются белки, полигидроксиалканоаты, полисахариды, липиды, а также малые органические молекулы, к которым относят метанобактин и эктоин. Исследования, направленные на повышение темпов наработки биомассы метанооксиляющих бактерий и содержания в ней целевых веществ, указывают на сильную зависимость результатов культивирования от минерального состава среды и газовой фазы. Соотношение метана к кислороду, источник и концентрация азота, а также содержание меди, железа и ряда микроэлементов требуют тщательной оптимизации для обеспечения условий роста, способствующих наибольшей продуктивности метанотрофных микроорганизмов.

Большой интерес исследователей в последние годы привлекает применение метанотрофных сообществ, состоящих как из метанотрофных, так и не окисляющих метан микроорганизмов-спутников, что также исключает сложности, связанные с выделением и поддержанием чистой культуры МОБ. В составе метанооксиляющих ассоциаций гетеротрофные микроорганизмы вступают с МОБ в тесные синтрофные взаимодействия, стимулируют активность образующей сообщество культуры, повышают продуктивность культивирования, а также потребляют продукты окисления метана, снижая их ингибирующий эффект, что увеличивает стабильность процесса наработки микробной биомассы. В связи с этим актуальной научно-исследовательской задачей является повышение продуктивности консорциумов, как полученных из накопительных культур, так созданных из известных отдельных культур (синтетические сообщества). Таким образом, потребность в разработке подходов к подготовке посевного материала заданного видового состава для повышения продуктивности процесса направленного культивирования метанооксиляющих сообществ с целью получения биомассы, богатой такими соединениями с добавленной стоимостью, как белок и полигидроксибутират, обуславливает актуальность данной работы.

Степень разработанности темы. В настоящее время ряд метанотрофных бактерий интенсивно внедряется в различные сферы биотехнологии. *Methylococcus capsulatus* и другие бактерии, преимущественно относимые к МОБ I типа, рассматриваются как перспективный источник белка. Основы получения высокобелкового сырья из метанотрофов, а также возможные перспективы его применения, были заложены в работах Градовой Н.Б., Лалова В.В., а также исследований, выполненных на базе ГосНИИсинтезбелок. Существующие на рынке белковые кормовые добавки UniProtein (UniBio, Дания) и FeedKind (Calysta Inc., США) на основе метанотрофных сообществ обладают доказанной эффективностью и потенциально могут применяться в пищевой промышленности. В свою очередь, метанооксиляющие консорциумы МОБ II типа (рода *Methylosinus* и *Methylocystis*) внедряются в биотехнологические производства в качестве продуцентов полигидроксиалканоатов.

Были подробно изучены видовые составы природных метанотрофных сообществ и накопительных культур, в результате чего стало возможным оценить распространение тех или

иных гетеротрофов в соответствии с наличием конкретных метаноокисляющих бактерий в ассоциации. Тем не менее, работы, направленные на выявление закономерностей влияния конкретных неметанотрофных микроорганизмов на продуктивность сообщества, единичны и носят поисковый характер. Вопросы целенаправленного конструирования синтетических сообществ с прогнозируемыми свойствами, а также оптимизации состава питательных сред и параметров культивирования для продуктивной наработки биомассы с высоким содержанием целевых продуктов в промышленно значимых масштабах остаются недостаточно проработанными и требуют системного подхода.

Таким образом, **целью данной работы** являлась разработка комплексного подхода к конструированию высокопродуктивных синтетических метанотрофных консорциумов и оптимизация режимов их управляемого культивирования для эффективной биоконверсии метана в целевые продукты с добавленной стоимостью с технико-экономической оценкой масштабируемых технологических схем их получения.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести отбор и изучить состав быстрорастущих метанотрофных сообществ из природных источников с последующим выделением чистых культур метанотрофных и неметанотрофных микроорганизмов;
2. Определить оптимальные параметры (температура, pH, источник азота) культивирования выделенных и коллекционных штаммов метанотрофов;
3. Разработать и апробировать метод конструирования синтетических консорциумов, основанный на количественной оценке влияния неметанотрофных бактерий на накопление биомассы в бинарных системах, с последующей сборкой многоуровневых (трёхкомпонентных) сообществ;
4. Осуществить скрининг и отбор трёхкомпонентных синтетических сообществ, характеризующихся максимальными показателями накопления биомассы;
5. Оптимизировать состав питательных сред и условия культивирования отобранных синтетических сообществ для достижения максимальных значений удельной скорости роста, содержания белка и полигидроксibuтирата;
6. Провести культивирование созданных синтетических сообществ в периодическом и непрерывном режимах в стерильных и нестерильных условиях с определением основных кинетических и технологических показателей процесса;
7. Изучить способность чистых культур и синтетических сообществ метанотрофов к внеклеточному восстановлению ионов серебра и формированию наночастиц как возможный индикатор их метаболической активности и физиологического состояния;
8. Разработать принципиальные технологические схемы получения целевых продуктов (высокобелковой биомассы и биомассы с высоким содержанием полигидроксibuтирата) на основе сконструированных сообществ и провести предварительный анализ технико-экономических показателей разработанных процессов для оценки их потенциала при масштабировании.

Научная новизна.

Выделен и идентифицирован новый перспективный штамм-продуцент биомассы с высоким содержанием белка *Methylococcus capsulatus* KS-24, который депонирован в Коллекции UNIQEM под регистрационным номером UQM 42109. Данный штамм

характеризуется высокой для чистых метанотрофных культур удельной скоростью роста ($0,23 \text{ ч}^{-1}$), а также широким температурным оптимумом, что расширяет его потенциал для промышленного использования.

Разработан метод создания синтетических метанотрофных сообществ, основанный на анализе парных взаимодействий метанооксиляющих бактерий с сопутствующей гетеротрофной микрофлорой. Установлено, что оценка бинарных ассоциаций позволяет предсказывать синергию в более сложных трёхкомпонентных системах, что даёт возможность целенаправленно конструировать устойчивые сообщества с повышенной продуктивностью. В частности, созданные ассоциации превосходят чистые культуры по удельной скорости роста на 22-25 %, а исходные накопительные сообщества – на 10-17 %.

Выявлены ключевые факторы (концентрации Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , соотношение и концентрация $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, C/N, доля метана в газовой смеси), позволяющие направленно повышать продуктивность наработки биомассы (на 25-27 % по сравнению со стандартными средами) и долю в ней целевых соединений: в зависимости от выбранного синтетического сообщества содержание сырого протеина достигает 76,5 % от АСВ, а полигидроксibuтирата – 39,7 %.

Доказана принципиальная возможность длительного непрерывного культивирования синтетических метанотрофных сообществ (до 21 суток) в нестерильных условиях на техническом метане: доля микроорганизмов разработанных ассоциаций сохранялась на уровне не менее 71-85 %, а доля времени устойчивого протекания процесса в заданных параметрах составила 78-82 %.

Впервые выявлена способность чистых культур *M. capsulatus* и *M. trichosporium*, а также сконструированных на их основе сообществ к внеклеточному биосинтезу наночастиц серебра в условиях фотоиндукции. Показано, что выход и характеристики наночастиц зависят от метаболической активности продуцента и могут служить индикатором физиологического состояния клеток.

Теоретическая и практическая значимость.

Выявленные закономерности влияния состава питательной среды и параметров культивирования на распределение метаболических потоков в синтетических сообществах дополняют фундаментальные знания о физиологии метанотрофов и их взаимодействии с гетеротрофными спутниками.

Предложенный подход к конструированию синтетических метанотрофных сообществ, основанный на количественной оценке парных взаимодействий метанооксиляющих бактерий с гетеротрофными спутниками, позволяет прогнозировать синергетический эффект в многокомпонентных системах, что открывает новые возможности для направленного конструирования и управляемого культивирования метанотрофных ассоциаций.

Для метанотрофного сообщества на основе *Methylococcus capsulatus* KS-24 подобраны условия, обеспечивающие содержание сырого протеина 72-76 % в биомассе от АСВ при продуктивности по $2,61 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{ч})$ в нестерильных условиях на техническом метане; для сообщества на базе *Methylosinus trichosporium* разработана двухстадийная схема, позволяющая накапливать полигидроксibuтират до 38,1 % от АСВ.

Экспериментально доказанная возможность длительного непрерывного культивирования созданных сообществ в нестерильных условиях и на техническом метане вносит вклад в понимание устойчивости метанотрофных ассоциаций. Доля микроорганизмов, образующих синтетическое сообщество, сохраняется на уровне не менее 79 %, а

продуктивность процесса остаётся сопоставимой со стерильным культивированием, что создаёт предпосылки для снижения капитальных и эксплуатационных затрат при промышленной реализации.

Оценочные технико-экономические расчёты показали, что себестоимость высокобелковой биомассы, полученной с использованием синтетического метанотрофного сообщества, на 10,5 % ниже, чем для накопительного сообщества при аналогичном процессе, что является конкурентным преимуществом на рынке производства кормового белка. Для пилотного масштаба получения бактериальной биомассы с высоким содержанием полигидроксibuтирата определены первичные экономические показатели, служащие ориентиром для дальнейшего практического внедрения.

Выявленная способность метанотрофов к внеклеточному биосинтезу наночастиц серебра расширяет представления о потенциале данной группы микроорганизмов и может служить основой для разработки новых подходов к оценке их физиологического состояния, поскольку интенсивность синтеза наночастиц коррелирует с метаболической активностью клеток. В условиях фотоиндукции образуются наночастицы размером 5-20 нм, обладающие антимикробной активностью в отношении грамотрицательных патогенов (минимальная ингибирующая концентрация составила 25-75 мг/л), что открывает перспективы использования метанотрофных культур и сообществ в технологиях получения наноматериалов.

Разработанный и утверждённый лабораторный регламент на процесс получения бактериальной биомассы подтверждает готовность результатов, изложенных в диссертационной работе, к практическому использованию и масштабированию.

Методология и методы исследования.

Методология исследования заключалась в системном подходе, включающем последовательные этапы выделения и идентификации ключевых компонентов природных метанотрофных сообществ, количественном сравнении межвидовых взаимодействий в бинарных ассоциациях, направленном конструировании синтетических сообществ, оптимизации условий культивирования с использованием методов математического планирования эксперимента, а также оценке биотехнологического потенциала созданных консорциумов в непрерывных процессах в условиях, приближенных к промышленным.

В работе использован комплекс микробиологических, молекулярно-биологических, аналитических и статистических методов. Микробиологические методы включали отбор природных образцов, получение накопительных культур, выделение чистых культур микроорганизмов методами предельного разведения и высева на агаризованные среды, культивирование в планшетах, колбах и биореакторе в периодическом и непрерывном режимах. Для идентификации микроорганизмов проводили секвенирование гена 16S рРНК, стабильность состава синтетических сообществ исследовали методом высокопроизводительного секвенирования ампликонов на платформе PacBio с биоинформатической обработкой. Аналитические методы включали определение абсолютно сухого веса биомассы, сырого протеина, белка, нуклеиновых кислот, полигидроксibuтирата, сахаров, а при исследовании биосинтеза наночастиц серебра применяли спектрофотометрию, динамическое рассеяние света, сканирующую электронную микроскопию и стандартные методы определения антимикробной активности.

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием стандартных методов вариационной статистики. Эксперименты по определению ростовых характеристик, культивированию бинарных и тройных сообществ, а также оптимизации состава питательной среды проводили в трёх биологических повторностях. Аналитические измерения выполняли в трёх повторностях. Для каждого набора данных рассчитывали среднее арифметическое значение и стандартное отклонение. Достоверность различий между средними значениями оценивали с помощью t-критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$. Для математического планирования экспериментов, построения поверхностей отклика и анализа полученных данных использовали программный пакет Statistica 12 (StatSoft, США).

Положения, выносимые на защиту.

1. Метод направленного конструирования синтетических метанотрофных консорциумов на стадии подготовки инокулята, основанный на количественной оценке парных взаимодействий метанотрофных бактерий и гетеротрофных спутников позволяет получать стабильные сообщества, превосходящие по ростовым характеристикам чистые и накопительные культуры, что является эффективным и универсальным инструментом повышения продуктивности культивирования метанотрофных микроорганизмов;

2. Оптимизация состава питательной среды и параметров культивирования позволяет направленно регулировать метаболические потоки в синтетических метанотрофных сообществах, обеспечивая эффективную наработку биомассы, а также повышение доли в ней целевых соединений;

3. Разработанная технологическая схема получения высокобелковой биомассы и сырья для выделения полигидроксibuтирата при использовании синтетических метанотрофных сообществ обладает конкурентными преимуществами, заключающимися в повышенной продуктивности и стабильности процесса, что подтверждено первичными технико-экономическими расчётами.

Личный вклад автора заключается в формировании цели и задач диссертации, проведении процесса культивирования и аналитических исследований, обработке, анализе и обсуждении полученных результатов, формулировке выводов, написании публикаций, участии в международных и всероссийских конференциях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.6. «Биотехнология» по п. 2 (в части: «Оптимизация процессов биосинтеза»); п. 3 (в части ««Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов для получения биомассы, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений» а также «создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения»).

Степень достоверности. Достоверность обеспечивается большим массивом воспроизводимых экспериментальных данных, полученных посредством применения современных методов и оборудования. Результаты подтверждены с использованием методов статистической обработки и оценки погрешности результатов, а также согласуются с известными литературными данными.

Апробация результатов. Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на международных и всероссийских конференциях: «19th International

Multidisciplinary Scientific Geoconference SGEM 2019» (София, 2019); «XVIII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием» (Казань, 2023); «21 век: фундаментальная наука и технологии. Материалы XXXV международной научно-практической конференции» (Бенгалор, 2024); «Актуальные аспекты и перспективы развития современной биотехнологии. Сборник докладов II Международной научной конференции» (Белгород, 2025); «Перспективные материалы и высокоэффективные процессы обработки. Сборник научных трудов по материалам IV Всероссийской молодежной конференции» (Саратов, 2025).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них 2 статьи в рецензируемых научных изданиях перечня ВАК Минобрнауки России, 1 статья в издании, входящем в международные реферативные базы данных Scopus и Web of Science, 4 статьи в журналах, входящих в базу данных РИНЦ, 9 публикаций в сборниках международных и всероссийских научных конференций. Результаты диссертационной работы, регламентирующие алгоритм создания синтетических метанотрофных сообществ, защищены в качестве результатов интеллектуальной деятельности в форме ноу-хау.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность научному руководителю д.т.н., профессору Калёнову Сергею Владимировичу за неоценимую помощь в работе, заведующему кафедрой биотехнологии д.т.н., профессору Панфилову В.И., коллективу кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева за практическую помощь и поддержку при написании диссертации. Особая благодарность д.б.н., профессору Градовой Н.Б. за ценные консультации и рекомендации при обсуждении результатов работы.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 224 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, выводов, списка литературных источников, включающего 353 наименования, 43 таблиц, 23 рисунков, 4 приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цели и задачи исследования, изложена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Сформулированы положения, выносимые на защиту. Изложены методология и методы исследования, степень достоверности и апробация результатов работы.

В первой главе приведён исчерпывающий обзор литературы по теме исследования. Представлена общая информация о распространении метанотрофных микроорганизмов и их роли в глобальном цикле углерода. Детально описаны метаболические пути окисления и ассимиляции метана основными группами метанотрофных бактерий. Подробно рассмотрены основные области применения метанооксиляющих микроорганизмов в биотехнологии, приведённые примеры метанотрофов и сообществ на их основе для получения таких соединений, как белки, полигидроксиалканоаты, экзополисахариды, метанол, а также ряда других веществ. Проведён анализ влияния состава ростовых сред, включая газовую фазу, на рост метанооксиляющих бактерий и ассоциаций, а также содержание в получаемой биомассе целевых веществ, имеющих потенциал применения в биотехнологии. Приведена информация о составе метанооксиляющих ассоциаций и характерных особенностях их культивирования. В завершении главы обозначены основные актуальные направления исследований и сделан

вывод необходимости создания и оптимизации быстрорастущих синтетических метанотрофных композиций с целью повышения продуктивности культивирования метанотрофных микроорганизмов.

Во второй главе изложена экспериментальная часть, описаны объекты, оборудование и реактивы, методы исследования. Подробно изложены методики получения накопительных культур, выделения чистых культур, их идентификации (секвенирование 16S рРНК), определения ростовых характеристик, конструирования бинарных и тройных синтетических метанотрофных сообществ, оптимизации состава сред (однофакторный и двухфакторный эксперименты), проведения периодического и непрерывного культивирования (в том числе в нестерильных условиях), аналитические методы (определение абсолютно сухого вещества (АСВ), белка, полигидроксibuтирата (ПГБ), нуклеиновых кислот, сахаров), методы исследования наночастиц (УФ-спектроскопия, динамическое рассеяние света (ДРС), сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)) и определения их антимикробной активности.

В третьей главе приведены основные результаты работы и их обсуждение.

Получение накопительных метанотрофных сообществ и выделение чистых культур.

В результате обогащения образцов, отобранных из трёх природных источников, на различных селективных минеральных средах и температурных режимах было получено пять стабильных быстрорастущих накопительных метанотрофных культуры с максимальной удельной скоростью роста до $0,2 \text{ ч}^{-1}$. Из данных сообществ суммарно было выделено и идентифицировано пять изолятов метаноокисляющих бактерий, относящихся к родам *Methylomonas*, *Methylosinus*, *Methylocystis* и *Methylococcus*, а также 24 изолята неметанотрофных, в том числе метилотрофных, микроорганизмов-спутников, устойчиво представленных в значимых количествах в накопительных культурах (таблица 1). Все изоляты были идентифицированы методом 16S-рРНК по родовой принадлежности на основании сравнения с ближайшими аналогами из базы GenBank.

Таблица 1 – Метанотрофные и неметанотрофные культуры

№ накопительной культуры	Выделенный метанотрофный изолят (шифр)	Неметанотрофные участники сообщества (шифр)
1	<i>Methylomonas</i> sp. (M1)	<i>Methylobacterium</i> sp. (Met1); <i>Chryseobacterium</i> sp. (H1); <i>Ralstonia</i> sp. (H2); <i>Microvirga</i> sp. (H3); <i>Leifsonia</i> sp. (H4)
2	<i>Methylocystis</i> sp. (M2)	<i>Methylobacterium</i> sp. (Met2); <i>Burkholderia</i> sp. (H5); <i>Chryseobacterium</i> sp. (H6); <i>Brucella</i> sp. (H7); <i>Stenotrophomonas</i> sp. (H8); <i>Pseudomonas</i> sp. (H9)
3	<i>Methylosinus</i> sp. (M3)	<i>Methylorubrum</i> sp. (Met3); <i>Burkholderia</i> sp. (H10); <i>Azospirillum</i> sp. (H11); <i>Cohnella</i> sp. (H12); <i>Brevibacillus</i> sp. (H13); <i>Cupriavidus</i> sp. (H14)
4	<i>Methylocystis</i> sp. (M4)	<i>Methylorubrum</i> sp. (Met3); <i>Burkholderia</i> sp. (H10); <i>Brevibacillus</i> sp. (H13); <i>Azospirillum</i> sp. (H11); <i>Nocardia</i> sp. (H15)
5	<i>Methylococcus</i> sp. (M5)	<i>Methylobacterium</i> sp. (Met4); <i>Chryseobacterium</i> sp. (H16); <i>Ralstonia</i> sp. (H17); <i>Brevibacillus</i> sp. (H18); <i>Acinetobacter</i> sp. (H19); <i>Bacillus</i> sp. (H20)

Изолят *Methylococcus capsulatus*, выделенный из заболоченной почвы и депонированный в Коллекции UNIQEM, как штамм *Methylococcus capsulatus* KS-24. Данный штамм характеризуется высокой для чистых метанотрофных культур удельной скоростью роста и широким температурным оптимумом, что определяет его биотехнологический потенциал в качестве продуцента высокобелковой биомассы. Для проведения дальнейших этапов работы также были взяты четыре коллекционные метанотрофные чистые культуры родов, аналогичных выделенным метанооксиляющим микроорганизмам: *Methylomonas methanica* B-2110, *Methylosinus trichosporium* B-2118, *Methylocystis parvus* B-2129 и *Methylococcus capsulatus* B-2990.

Определение базовых ростовых характеристик метанотрофных культур. Для каждого из выделенных метанотрофных изолятов, а также дополнительно взятых для дальнейшего исследования коллекционных штаммов, были определены базовые ростовые характеристики, включающие оптимальные значения температуры, pH, а также источника азота в среде, что позволило проводить создание синтетических сообществ в наиболее подходящих для каждой культуры условиях и являлось предварительным шагом в процессе оптимизации культивирования метанотрофных сообществ (таблица 2).

Таблица 2 – Ростовые характеристики метанотрофных культур

Метанотрофная культура	Температура (оптимум), °C	pH (оптимум)	Предпочтительный источник азота
<i>Methylomonas</i> sp (M1)	35-40 (37,5)	6,5-7,5 (7,0)	NH ₄ ⁺
<i>Methylocystis</i> sp. (M2)	25-30 (27,5)	5,5-7,0 (6,5)	NO ₃ ⁻
<i>Methylosinus</i> sp. (M3)	25-30 (27,5)	6,0-7,0 (6,5)	NO ₃ ⁻
<i>Methylocystis</i> sp. (M4)	25-30 (27,5)	6,0-7,0 (6,5)	NO ₃ ⁻
<i>Methylococcus capsulatus</i> KS-24 (M5)	35-45 (40,0)	5,5-6,0 (5,75)	NH ₄ ⁺
<i>M. methanica</i> B-2110 (M6)	25-35 (32,5)	6,5-7,5 (7,0)	NH ₄ ⁺
<i>M. trichosporium</i> B-2118 (M7)	25-30 (27,5)	5,5-7,0 (6,5)	NO ₃ ⁻
<i>M. parvus</i> B-2129 (M8)	25-30 (27,5)	6,0-7,0 (6,5)	NO ₃ ⁻
<i>M. capsulatus</i> B-2990 (M9)	40-45 (42,5)	5,5-6,0 (5,75)	NH ₄ ⁺

Оптимальные для роста чистых культур метанотрофов условия сводятся к трём базовым комбинациям факторов: температура в диапазоне от 32,5 до 37,5 °C, нейтральный pH и аммонийный источник азота для бактерий рода *Methylomonas*; повышенные температуры в диапазоне от 40 до 42,5 °C, более кислый pH среды около 5,75 и также аммонийный азот для рода *Methylococcus*; температура от 25 до 30 °C, pH с оптимумом при 6,5 и нитратный азот для метанотрофов родов *Methylosinus* и *Methylocystis*. Также была установлена способность к фиксации атмосферного азота рядом исследованных метанотрофов, однако скорость роста в данном случае была значительно меньше по сравнению с использованием минеральных солей.

Создание синтетических метанотрофных сообществ. Разработанный метод конструирования синтетических сообществ базируется на количественной оценке влияния каждого гетеротрофного спутника на накопление биомассы в составе бинарной ассоциации с метанотрофом. Культивирование пар, состоявших из выделенных или коллекционных

метанотрофов с изолированными неметанотрофными спутниками во всех возможных сочетаниях проводили в течение трёх последовательных пассажей в 12-луночных культуральных планшетах на среде и условиях, оптимальных для роста метанотрофа, с последующим измерением оптической плотности суспензии. Показатель влияния рассчитывали, как разность двоичных логарифмов нормализованных значений оптической плотности ассоциации и чистой культуры. Пороговым значением для признания эффекта значимым принимали величину $\geq 0,25$, что соответствует увеличению концентрации биомассы приблизительно на 20 % относительно чистой культуры. Наиболее выраженный положительный эффект зафиксирован для бинарных сообществ, приведённых в таблице 3.

Таблица 3 – Наиболее продуктивные бинарные сообщества по сравнению с чистыми культурами

Метанотроф	Спутник	Прирост биомассы, %	Метанотроф	Спутник	Прирост биомассы, %
<i>Methylomonas</i> sp.	<i>Microvirga</i> sp.	38	<i>M. methanica</i> B-2110	<i>Ralstonia</i> sp.	27
	<i>Brevibacillus</i> sp.	42		<i>Methylorubrum</i> sp.	48
<i>Methylocystis</i> sp.	<i>Microvirga</i> sp.	39	<i>M. trichosporium</i> B-2118	<i>Ralstonia</i> sp.	51
<i>Methylosinus</i> sp.	<i>Ralstonia</i> sp.	31		<i>Azospirillum</i> sp.	42
	<i>Brevibacillus</i> sp.	34		<i>Brevibacillus</i> sp.	61
<i>Methylocystis</i> sp.	<i>Brevibacillus</i> sp.	45		<i>Cupriavidus</i> sp.	98
<i>M. capsulatus</i> KS-24	<i>Brevibacillus</i> sp.	79	<i>M. parvus</i> B-2129	<i>Microvirga</i> sp.	33
	<i>Cupriavidus</i> sp.	45		<i>Brucella</i> sp.	28
	<i>Ralstonia</i> sp.	62	<i>M. capsulatus</i> B-2990	<i>Brevibacillus</i> sp.	45
	<i>Brevibacillus</i> sp.	68		<i>Ralstonia</i> sp.	36

Примечание – в таблице приведены только пары для каждого из метанотрофов с наибольшим приростом по биомассе; полная матрица скрининга представлена в диссертационной работе.

В результате скрининга установлено, что наибольшее число положительных взаимодействий наблюдалось для метанотрофов родов *Methylococcus* и *Methylosinus*. Бактерии родов *Brevibacillus*, *Ralstonia*, *Cupriavidus* и *Azospirillum* в различной степени демонстрировали стимуляцию роста большинства исследуемых метанооксиляющих культур. Отмечено, что положительный эффект большинства спутников сохранялся после трёх последовательных пересевов, что свидетельствует об устойчивости формируемых бинарных ассоциаций. Наблюдаемый эффект обусловлен способностью гетеротрофных спутников потреблять токсичные промежуточные продукты окисления метана, а также повышать активность метанмонооксигеназы метанотрофов. Отрицательное влияние наблюдалось редко и преимущественно в присутствии актиномицетов рода *Nocardia* (снижение концентрации биомассы достигало 60-80 %), а также для некоторых пар с *Pseudomonas* sp.

На основе бинарных ассоциаций, показавших максимальный прирост биомассы (≥ 20 % относительно чистой культуры), были составлены тройные комбинации, включающие два наиболее эффективных гетеротрофных спутника. В результате культивирования таких

сочетаний получено семь устойчивых синтетических консорциумов, сохранявших исходный состав после трёх последовательных пересевов. Наибольшей продуктивностью характеризовались две трёхкомпонентные ассоциации: MC5 (*M. capsulatus* KS-24, *Brevibacillus* sp., *Ralstonia* sp.) и MC7 (*M. trichosporium*, *Ralstonia* sp., *Cupriavidus* sp.). При переходе от скрининга в планшетах к периодическому культивированию в колбах положительный эффект синтетических сообществ по сравнению с чистыми культурами сохранялся, хотя его абсолютная величина снизилась. Тем не менее, оба консорциума продолжали значительно превосходить чистые культуры по удельной скорости роста на 22-25 %. Для сообщества MC5, созданного на основе штамма, выделенного из накопительной культуры, преимущество над исходной ассоциацией составило 17 % по удельной скорости роста и 13 % по концентрации биомассы. Таким образом, целенаправленное конструирование синтетических сообществ разработать более продуктивный по сравнению как с чистыми, так и накопительными культурами, подход к культивированию метанотрофных микроорганизмов.

Оптимизация состава сред. Для двух сконструированных и отобранных композиций посредством серии однофакторных экспериментов в периодическом режиме была проведена оптимизация концентрации Cu^{2+} и Fe^{2+} (рисунок 1), Ca^{2+} , Mg^{2+} и метанола в питательной среде, а также доли CH_4 подаваемой газовой смеси (рисунок 2).

Cu^{2+} и Fe^{2+} входят в состав активного центра метанмонооксигеназ метанотрофов и определяют их способность окислять метан до метанола. Сообщество MC5 продемонстрировало большую потребность в ионах меди в среде по сравнению с MC7, при этом обратную картину наблюдали по отношению к ионам железа. Значительное ингибирование медью в высоких концентрациях наблюдали для обоих исследуемых сообществ.

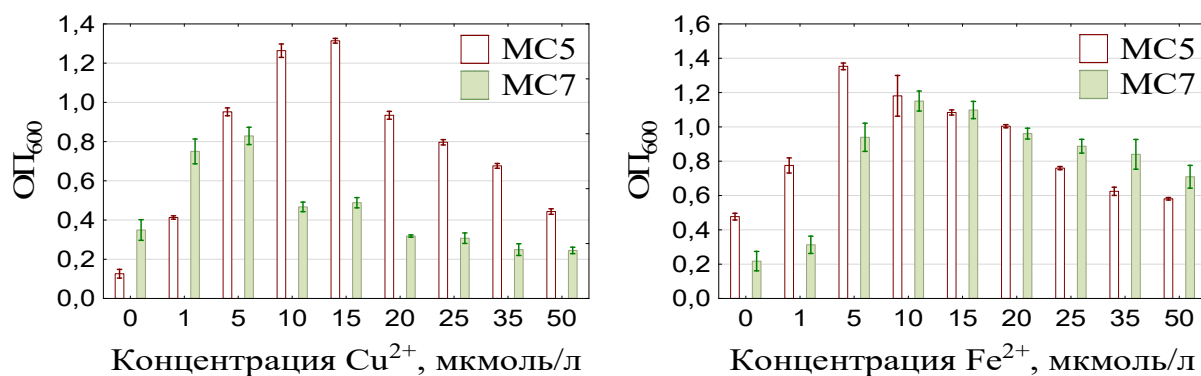


Рисунок 1 – Оптимизация концентрации Cu^{2+} и Fe^{2+}

Также была подтверждена необходимость добавления ионов кальция в состав питательной среды. Так, при содержании кальция в концентрации 10 μM /л и меньше практически полностью останавливало рост сообщества MC5. Оптимальная концентрация данного иона в среде находится в диапазоне от 80 до 120 μM /л для MC5 с ингибированием при избытке компонента, и 60-100 μM /л для MC7. Влияние ионов магния было не столь выраженным, на исследуемом диапазоне концентраций ингибирования повышенными концентрациями практически не обнаруживалось, но его необходимость в среде подтверждается значительным снижением роста в случае его отсутствия. Оптимальное содержание магния для MC5 составило 400-600 μM /л, а для MC7 практически идентичная оптическая плотность суспензии сообщества сохранялась в широком диапазоне от 200 до 700 μM /л. Небольшие концентрации

метанола, а именно от 10 до 20 ммоль/л, незначительно стимулировали рост сконструированных метанотрофных сообществ, однако дальнейшее увеличение концентрации данного соединения в ростовой среде значительно подавляло накопление биомассы в ходе культивирования. Было установлено, что при содержании метана от 25 до 30 % для MC5 и 30 % для MC7 от объёма метановоздушной смеси исследуемые сообщества демонстрируют наибольший уровень накопления биомассы в суспензии. При доле метана в смеси больше 40 % наблюдали линейное снижение оптической плотности культивируемых синтетических сообществ, что обусловлено лимитом процесса по кислороду, количество которого недостаточно для осуществления полного окисления подаваемого субстрата.

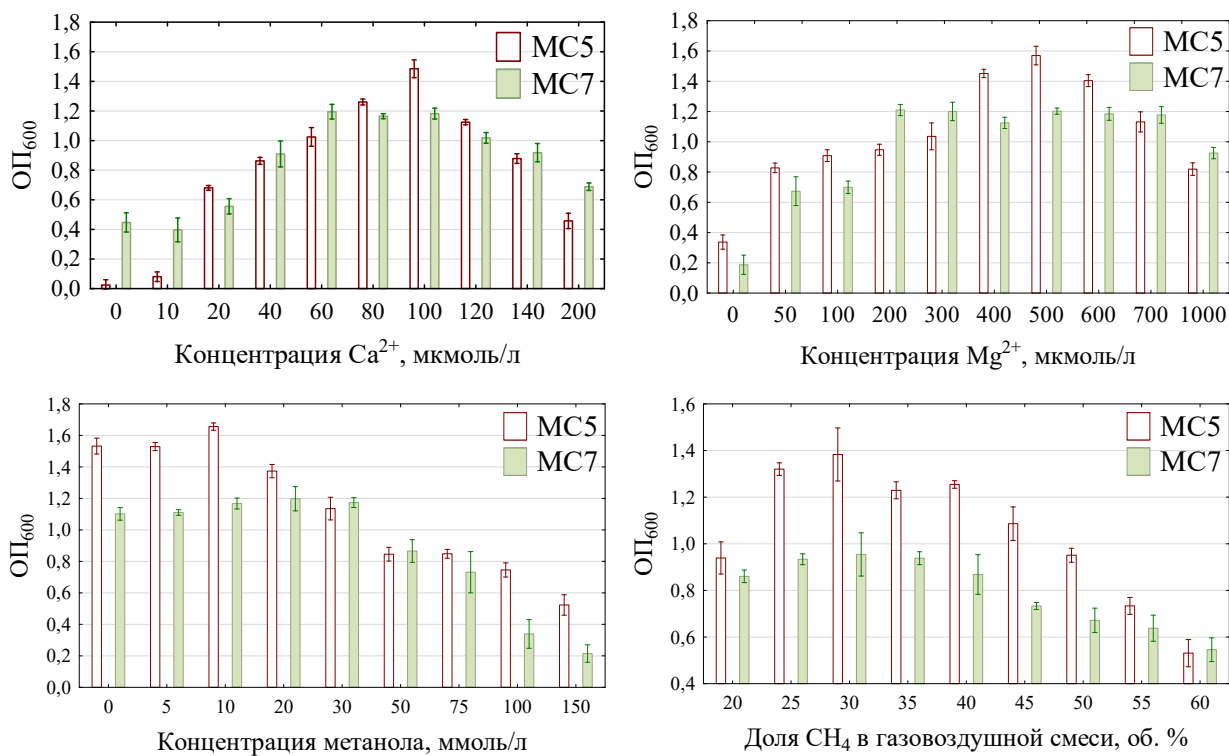


Рисунок 2 – Однофакторная концентраций Ca²⁺, Mg²⁺, метанола и доли метана

Для нахождения оптимального источника азота и его концентрации был применён анализ поверхности отклика (рисунок 3).

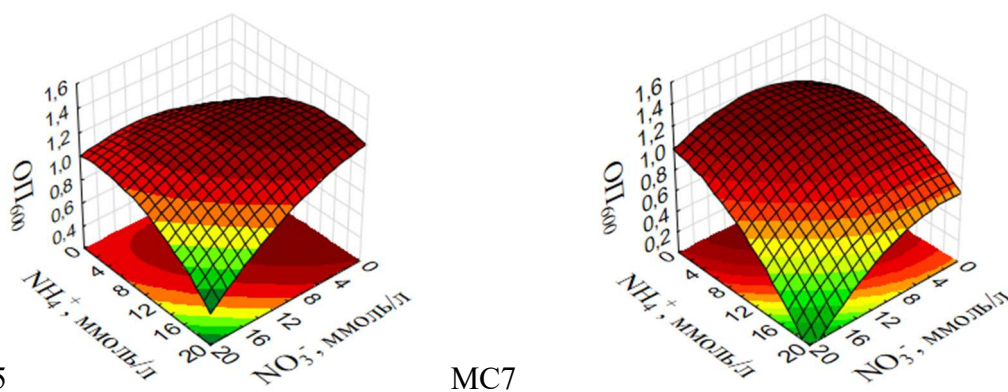


Рисунок 3 – Влияние концентрации и источника азота на рост метанотрофного сообщества

На основании экспериментов в соответствии с центральным композиционным планом и составлением уравнения регрессии была установлена необходимость применения комбинированного источника минерального азота для каждого из синтетических сообществ с целью наибольшего накопления биомассы: оптимальное мольное соотношение $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ в среде составило 1:6,5 и 4,2:1 для МС5 и МС7 соответственно.

Итогом этапа оптимизации стала разработка индивидуальных составов питательных сред и условий культивирования в периодическом режиме, увеличивающих показатель накопления биомассы синтетических сообществ. Таким образом, оптимизированные среды для культивирования сообществ имели следующий состав:

- Для композиции МС5 (*Methylococcus capsulatus* KS-24, *Brevibacillus* sp., *Ralstonia* sp.) в расчёте на 1 литр среды: 0,20 г KNO_3 ; 0,70 г NH_4Cl ; 0,12 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,015 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,272 г K_2HPO_4 ; 0,717 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 0,5 мг $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$; 2,81 мг $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 2,09 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 мг H_3BO_3 ; 0,01 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 мг $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,003 мг $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,002 мг $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,003 мг Na_2MoO_4 ; 0,2 мл метанола; 27,5% доля CH_4 в газовой смеси.

- Для композиции МС7 (*Methylosinus trichosporium*, *Ralstonia* sp, *Cupriavidus* sp.) в расчёте на 1 литр среды: 0,53 г KNO_3 ; 0,07 г NH_4Cl ; 0,06 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,272 г K_2HPO_4 ; 0,717 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 0,5 мг $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$; 0,56 мг $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 3,48 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 мг H_3BO_3 ; 0,01 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 мг $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,003 мг $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,002 мг $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,003 мг Na_2MoO_4 ; 0,5 мл метанола; 30,0% доля CH_4 в газовой смеси.

Результаты сравнительного культивирования в периодических условиях продемонстрировали значительное увеличение как максимальной удельной скорости роста в экспоненциальной фазе для обеих сконструированных ассоциаций и чистых культур, так и максимального накопления биомассы сообществом по итогам этапа (таблица 4).

Таблица 4 – Результаты оптимизации условий культивирования синтетических сообществ

Метанотрофная ассоциация	ГАСВ/Л (стандартная среда)	ГАСВ/Л (оптимизированная среда)	μ_{max} (стандартная среда), ч^{-1}	μ_{max} (оптимизированная среда), ч^{-1}
МС5	0,48±0,01	0,66±0,03	0,24	0,32
МС7	0,33±0,02	0,45±0,01	0,15	0,20

Проведенная оптимизация позволила увеличить максимальную концентрацию биомассы на 25-27 % и достичь максимальной удельной скорости роста $0,32 \text{ ч}^{-1}$ для сообщества МС5. Для сообщества МС7 прирост концентрации биомассы превысил 20 %, а μ_{max} составила $0,20 \text{ ч}^{-1}$.

Аналогично установлены оптимальные составы сред, способствующие максимальному накоплению в биомассе белков и полигидроксibuтирата. Обнаружено, что состав среды, подходящий для накопления биомассы, в значительной степени соответствует наибольшему содержанию белка в метанооксиляющих сообществах. Заметные отличия были обнаружены в значениях концентрации меди, магния и метанола для разработанного метанотрофного сообщества МС5 в котором содержание сырого протеина увеличилось до $76,45 \pm 0,28 \%$. Для синтетического сообщества МС7 процесс оптимизации позволил значительно увеличить

накопление полигидроксibuтирата, содержание которого достигало $39,70 \pm 1,25$ % от АСВ биомассы в условиях дефицита или полного отсутствия источников минерального азота в ростовой среде при максимальной удельной скорости роста сообщества $0,07 \text{ ч}^{-1}$.

Культивирование синтетических сообществ в непрерывном режиме. Ключевым этапом работы стала проверка эффективности созданных синтетических сообществ в условиях, максимально приближенных к промышленным – при культивировании в непрерывном режиме в течение не менее 21 дня для каждого эксперимента, дальнейшее увеличение срока культивирования зачастую приводило к значимому снижению стабильности и продуктивности процесса, что выражалось в резком падении концентрации биомассы. Испытания проводили на лабораторном биореакторе при оптимизированных для каждого сообщества составах сред и параметрах процесса. Оценивали влияние чистоты метана (99,9 % и 96,75 %) и стерильности на продуктивность и стабильность культивирования, а также время выхода на устойчивый хемостат. Варианты культивирования, имеющие наибольший потенциал для масштабирования, приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Ключевые показатели непрерывного культивирования синтетических сообществ

Показатель	МС5	МС7	МС7
Условия культивирования	Нестерильные; технический метан; среда для наработки биомассы	Стерильные; технический метан; среда для наработки биомассы	Нестерильные; технический метан; среда для накопления ПГБ
Скорость разбавления D, ч^{-1}	0,27	0,10	0,04
Концентрация АСВ, г/л	$9,67 \pm 1,15$	$4,29 \pm 0,56$	$1,94 \pm 0,35$
Продуктивность по биомассе, $\text{кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{ч})$	$2,61 \pm 0,31$	$0,429 \pm 0,056$	$0,078 \pm 0,014$
Содержание целевого продукта, % от АСВ	$72,09 \pm 1,55$ (сырой протеин)	$13,58 \pm 0,80$ (ПГБ)	$38,13 \pm 1,41$ (ПГБ)
Доля участников исходного сообщества, %	> 79	–	> 71
Работа в устойчивом режиме, %	82	75	78
Время выхода на непрерывный режим, ч	26,0	24,5	36,5

Важным преимуществом, обнаруженным в ходе культивирования, стало то, что в большинстве проведённых экспериментов отмечается сравнительно небольшое время выхода процесса на стабильный режим культивирования после засева в биореактор, а также высокая стабильность самого культивирования, что выражено в проценте времени, при котором синтетические сообщества демонстрировали указанную продуктивность и долю в биомассе целевых соединений.

Для синтетического сообщества МС5 в стерильных условиях на чистом метане при скорости разбавления $0,27 \text{ ч}^{-1}$ концентрация биомассы достигла $10,06 \text{ г/л}$, содержание сырого протеина – 73,7 %. Замена чистого метана на технический, а также переход к нестерильным условиям не приводили к существенному снижению показателей: концентрация биомассы сохранялась на уровне $9,7\text{-}9,8 \text{ г/л}$, содержание белка – 72–73 %. Использование среды,

оптимизированной для повышенного содержания белка, позволило увеличить его долю до 75,6 %, однако сопровождалось снижением концентрации биомассы и увеличением времени выхода на стабильный режим. По сравнению с сообществом на основе *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 продуктивность культивирования при внедрении этапа создания синтетического сообщества на стадии подготовки инокулята оказалась выше на 23 %. Для сообщества МС7 на среде, оптимизированной для накопления биомассы, в стерильных условиях на техническом метане продуктивность составила 0,429 кг/(м³·ч), что превышает средние литературные значения для смешанных культур на основе *M. trichosporium* (0,150-0,350 кг/(м³·ч)), при содержании ПГБ 13,6 % от АСВ. При переходе на среду для синтеза ПГБ в стерильных условиях содержание полимера возрастало до 34-35 %, в нестерильных условиях на техническом метане достигнуто максимальное значение 38,13 % от АСВ.

Анализ видового разнообразия сообществ в ходе длительных непрерывных экспериментов в нестерильных условиях показал сохранение доминирования исходных микроорганизмов: доля участников созданного синтетического консорциума составляла не менее 79 % для МС5 и 71 % для МС7 от общей популяции. Таким образом, было подтверждено, что разработанный метод конструирования позволяет получать не просто продуктивные, но и структурно устойчивые системы, способные противостоять давлению контаминирующей микрофлоры.

Биосинтез наночастиц серебра. Установлено, что *Methylococcus capsulatus* и *Methylosinus trichosporium*, а также сконструированные на их основе синтетические сообщества, способны к внеклеточному восстановлению наночастиц серебра. Наиболее интенсивно данный процесс протекает при воздействии ионов Ag⁺ на активно растущий инокулят в условиях фотоиндукции. Образующиеся наночастицы имеют сферическую форму, а минимальный диаметр (5-7 нм с учётом оболочки) зафиксирован в суспензии культуры *M. trichosporium*. Полученные наночастицы проявили выраженную антимикробную активность в отношении грамотрицательных бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa* (минимальная ингибирующая концентрация 25-75 мАg⁺/л для *M. capsulatus* и 50-150 мАg⁺/л для *M. trichosporium*). Выявленная зависимость интенсивности биосинтеза от физиологического состояния продуцента расширяет представления о метаболическом потенциале метанотрофов и открывает перспективы для разработки экспресс-методов оценки их активности. Поскольку образование окрашенных наночастиц серебра сопровождается появлением характерной полосы поверхностного плазмонного резонанса, легко регистрируемой визуально или спектрофотометрически, данный феномен может служить быстрым индикатором жизнеспособности и метаболической активности культуры, что особенно актуально при оптимизации условий культивирования, скрининге продуктивных штаммов и оперативном контроле состояния биомассы в биотехнологических процессах.

В четвёртой главе на основе экспериментальных данных разработаны принципиальные технологические схемы получения целевых продуктов с проведением оценочных технико-экономических показателей при масштабировании. На основе полученных экспериментальных данных для сообщества МС5 разработана принципиальная технологическая схема получения высокобелковой биомассы (рисунок 4). На первом этапе, поддерживаемые чистые культуры родов *Methylococcus*, *Brevibacillus* и *Ralstonia* объединяют для создания инокулята синтетического сообщества, которое в дальнейшем культивируют на

оптимизированной среде в масштабируемых условиях сначала в колбах, а впоследствии в инокуляторе для получения посевного материала с концентрацией до 8 г/л по сухому весу биомассы. Основным этапом непрерывного культивирования при скорости разбавления $0,27 \text{ ч}^{-1}$, подаче метановоздушной смеси с долей CH_4 25 % и расходом $1,25 \text{ м}^3/(\text{м}^3 \text{ мин})$ ведут в течение 21 суток в нестерильных условиях с использованием технического метана на концентрате среды аналогичного состава. Суспензия на выходе из биореактора с концентрацией 9,6-9,7 г/л попадает на тарельчатый сепаратор, где происходит её сгущение до 200 г АСВ/л с последующей промывкой водой для удаления остаточных солей и метаболитов и повторным сепарированием. Промытую биомассу с целью обеспечения микробиологической безопасности и возможности применения в качестве кормового продукта и направляют на стадию инактивации, проводимую острым водяным паром в трубчатом инактиваторе при $121 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 15 минут. Инактивированную биомассу сушат на распылительной сушилке до получения продукта с остаточной влажностью не более 10 %.

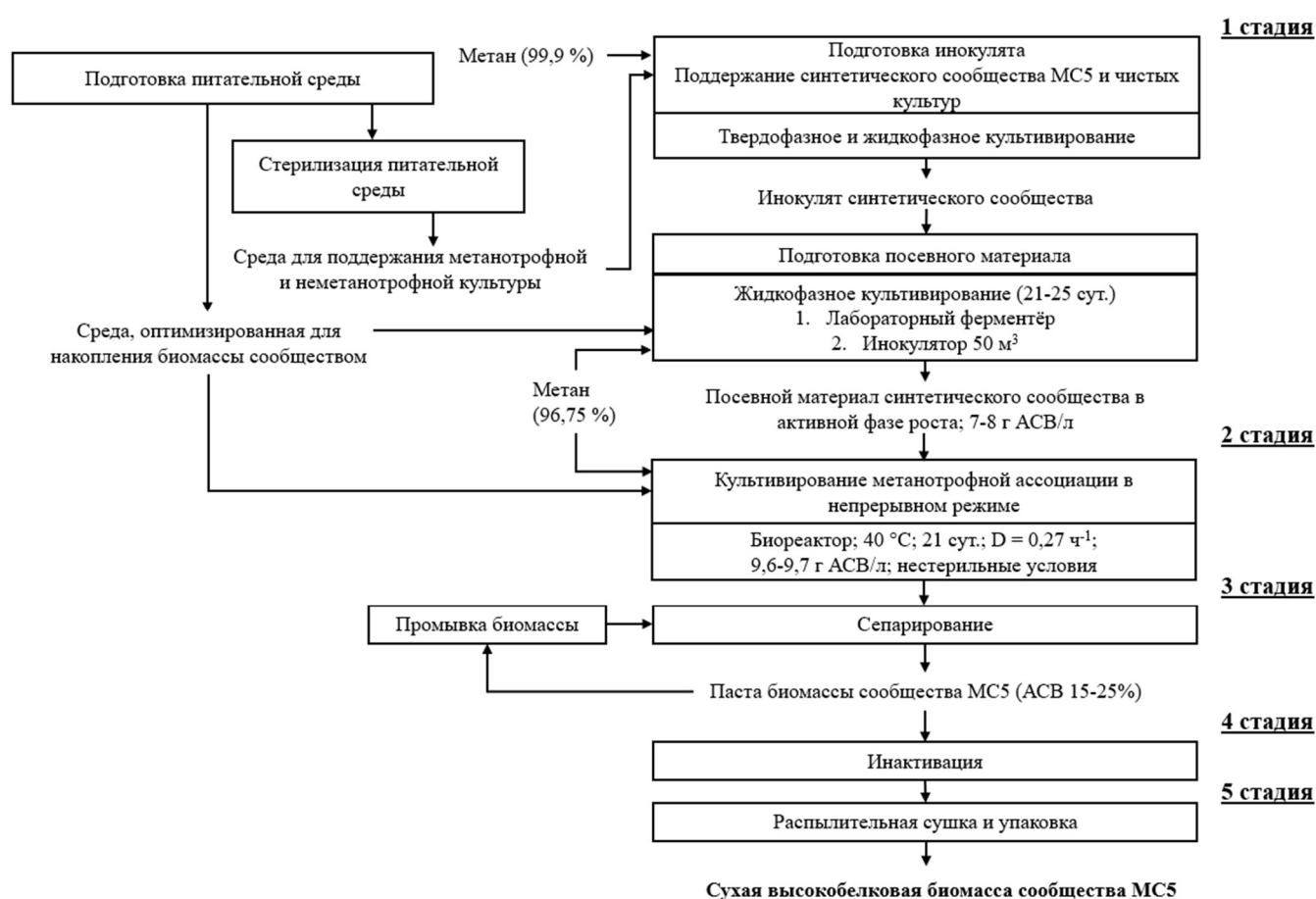


Рисунок 4 – Блок-схема получения высокобелковой биомассы сообщества MC5

Для сообщества MC7, предназначенного для получения биомассы с высоким содержанием полигидроксибутирата, обоснована двухстадийная схема, позволяющая разделить фазы накопления биомассы и индукции синтеза полимера (рисунок 5).

На первой стадии культивирование подготовленного синтетического сообщества, состоящего из *Methylosinus trichosporium*, *Ralstonia* sp. и *Cupriavidus* sp. проводят в стерильных условиях на среде, оптимизированной для роста, в биореакторе при скорости разбавления $0,10 \text{ ч}^{-1}$. Концентрация биомассы на выходе из первой стадии достигает 4,29 г АСВ/л. Культуральная

жидкость непрерывно поступает на вторую стадию, где в нестерильных условиях на среде с дефицитом азота и скоростью разбавления $0,04 \text{ ч}^{-1}$ происходит накопление полигидроксibuтирата до 38,1 % от АСВ. Вследствие различия скоростей протока на первой и второй стадиях культивирования, суммарный рабочий объём ферментёров, задействованных в процессе накопления полигидроксibuтирата, превышает объём биореакторов стадии роста в 2,5 раза при сохранении постоянного объёмного потока среды. Расход подаваемой газовой смеси на обоих этапах составляет $0,75 \text{ м}^3/(\text{м}^3 \text{ мин})$. На тарельчатом сепараторе получают влажную пасту биомассы с высоким содержанием ПГБ, которую в дальнейшем сушат на лиофильной сушилке до влажности не более 5 % для сохранения нативной структуры целевого биополимера.

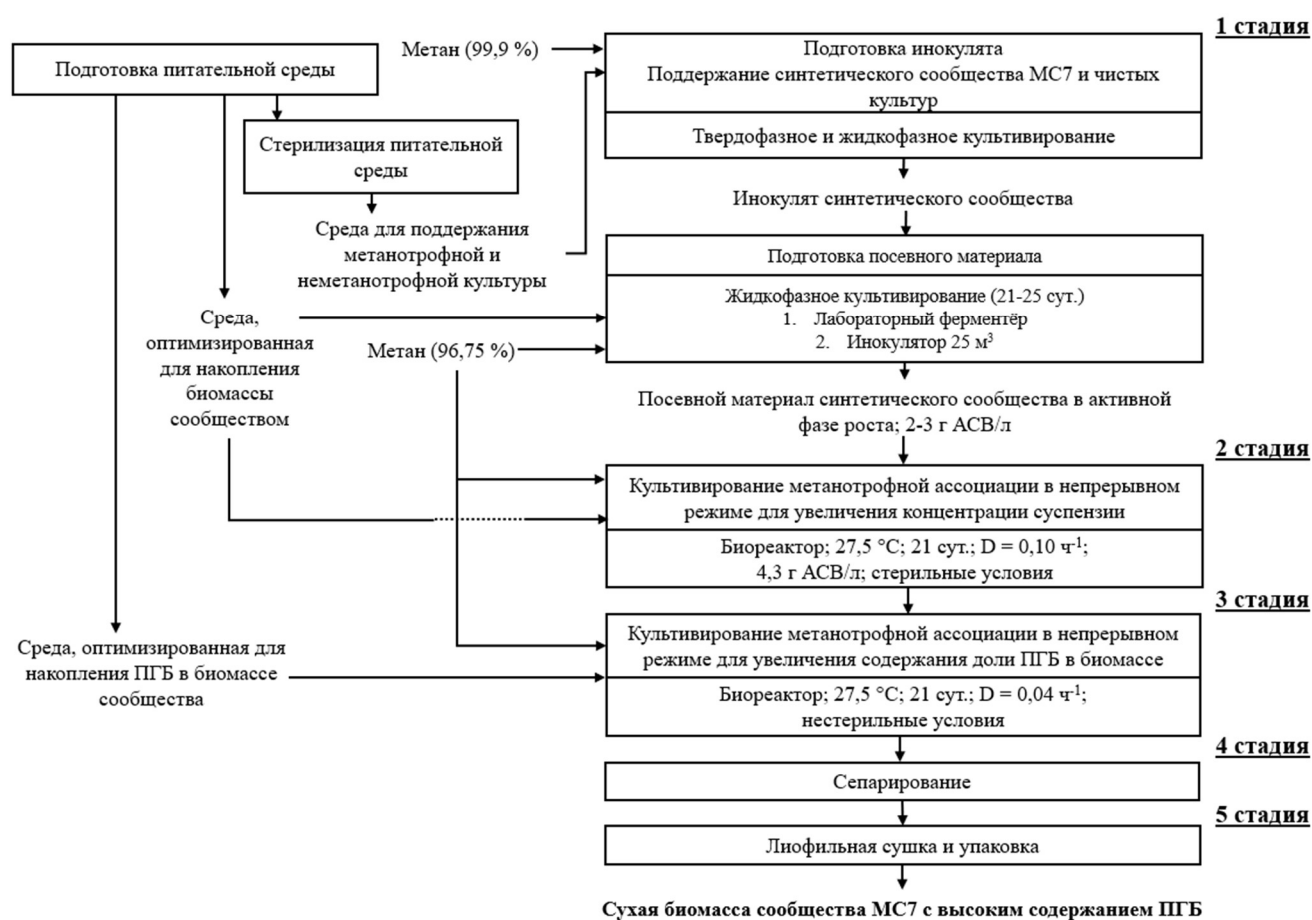


Рисунок 5 – Блок-схема получения биомассы сообщества МС7 с высоким содержанием полигидроксibuтирата

Таким образом, предложенные технологические схемы учитывают стадию создания синтетических метанотрофных сообществ как ключевой этап их культивирования, что напрямую влияет на экспериментально подтверждённую способность сохранять высокую продуктивность и стабильность процесса в полностью или частично нестерильных условиях на техническом метане в течение длительного времени. Данные особенности напрямую снижают капиталоемкость производства и эксплуатационные расходы, что делает разработанные синтетические сообщества экономически более привлекательными для промышленной реализации по сравнению с процессами на основе чистых культур метанотрофов, а также более управляемыми относительно накопительных сообществ.

Расчёт технико-экономических показателей масштабируемых схем. Оценочный технико-экономический расчёт заключался в подборе оборудования (в том числе резервного), подходящего для реализации разработанной схемы, оценке капитальных затрат и амортизации, затрат на сырьё, энергоресурсы, а также оплату труда персонала. В результате определяли себестоимость производства биомассы синтетических сообществ в соответствии с разработанными масштабируемыми схемами (таблица 6).

Таблица 6 – Ключевые технико-экономические показатели

Показатель	Сухая биомасса сообщества МС5	Сухая биомасса сообщества МС7
Годовой объём производства, т	10000	1000
Циклов культивирования в год	15	15
Капитальные вложения, млн руб.	4943	5591
Годовые затраты на сырьё и материалы, млн руб.	1147	870
Себестоимость 1 кг сухой биомассы, руб.	194,4	1630

При использовании синтетического сообщества МС5 на стадии подготовки инокулята себестоимость 1 кг высокобелковой биомассы составила 194,4 руб., что на 10,5 % ниже оценки для известного аналога на основе *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874; который был сформирован вокруг накопительного сообщества в нестерильных условиях, а себестоимость белка была снижена на 11,8 %. В случае создания сообщества МС7 для дальнейшего получения полигидроксibuтирата в пилотном масштабе себестоимость 1 кг биомассы с содержанием ПГБ 38 % оценена в 1630 руб., что является базовым ориентиром для дальнейшей оптимизации. Следует подчеркнуть, что данные показатели получены для пилотной установки, работающей при атмосферном давлении. Значительный потенциал для дальнейшего снижения себестоимости связан с переходом к процессам при избыточном давлении и оптимизации подачи газовой фазы. Полученные результаты служат основой для технико-экономической оценки и масштабирования процессов биоконверсии метана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе реализован комплексный подход к управляемому культивированию метанооксиляющих сообществ, включающий этапы от выделения природных консорциумов до технико-экономического обоснования промышленного масштабирования. Предложенные технологические решения могут служить базой для создания промышленных процессов переработки метана в продукты с добавленной стоимостью.

Перспективы развития темы связаны с масштабированием разработанного подхода к целенаправленному конструированию синтетических метанотрофных консорциумов на основе широкого круга метанооксиляющих бактерий, включая перспективные промышленные штаммы-продуценты. Приоритетными задачами являются оптимизация массообменных процессов (в том числе за счёт применения избыточного давления) и отработка непрерывных режимов культивирования в биореакторах большего объёма с использованием природного газа.

Продемонстрированная в работе стабильность созданных сообществ в нестерильных условиях и на техническом метане закладывает основу для перехода к технологиям, способным обеспечить экономически эффективное получение кормового белка и биоразлагаемых полимеров из метаносодержащего сырья.

ВЫВОДЫ

1. Из природных источников получено пять быстрорастущих накопительных метанотрофных сообществ с удельной скоростью роста $0,13-0,20 \text{ ч}^{-1}$. Выделено и идентифицировано 5 изолятов метаноокисляющих бактерий (роды *Methylomonas*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylococcus*) и 24 изолята неметанотрофных микроорганизмов. Штамм *Methylococcus capsulatus* KS-24 депонирован в коллекции UNIQEM (UQM 42109) как перспективный продуцент биомассы с высоким содержанием белка.

2. Разработан и апробирован метод направленного конструирования синтетических метанотрофных сообществ. На основе анализа бинарных ассоциаций «метанотроф – неметанотрофный спутник» идентифицированы бактерии родов *Brevibacillus*, *Ralstonia*, *Cupriavidus* и *Azospirillum*, стимулирующие рост метаноокисляющих сообществ. Сконструировано два стабильных трёхкомпонентных сообщества, превосходящие чистые и накопительные культуры по удельной скорости роста и накоплению биомассы на 13-25 %.

3. Установлены оптимальные составы сред и параметры культивирования. С использованием методов математического планирования эксперимента определены концентрации Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , соотношение $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, C/N и доля CH_4 в газовой смеси, обеспечивающие: для сообщества МС5 (продуцент белка): содержание сырого протеина 76,5 % от АСВ и удельную скорость роста $0,32 \text{ ч}^{-1}$; для сообщества МС7 (продуцент ПГБ) в зависимости от состава ростовой среды содержание полигидроксibuтирата до 39,7 % от АСВ, а также удельную скорость роста $0,20 \text{ ч}^{-1}$.

4. При культивировании в непрерывном режиме для МС5 в стерильных условиях на чистом метане достигнута продуктивность по биомассе $2,72 \pm 0,32 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{ч})$ при концентрации АСВ $10,06 \pm 1,18 \text{ г}/\text{л}$ и содержании белка $73,7 \pm 1,59 \%$. В нестерильных условиях на техническом метане продуктивность сохраняется на уровне $2,61 \pm 0,31 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{ч})$ при содержании белка $72,09 \pm 1,55 \%$, что подтверждает принципиальную возможность ведения процесса без строгой асептики. Для сообщества МС7 на среде, оптимизированной для роста, в стерильных условиях на техническом метане продуктивность по биомассе составляет $0,429 \pm 0,056 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{ч})$ при концентрации АСВ $4,29 \pm 0,56 \text{ г}/\text{л}$. При переходе на среду, индуцирующую синтез ПГБ, в нестерильных условиях на техническом метане содержание полимера в биомассе достигает $38,13 \pm 1,41 \%$. Метагеномный анализ подтвердил стабильность состава синтетических сообществ при длительном непрерывном культивировании в нестерильных условиях, в которых количество участников разработанного сообщества сохранялось на уровне более 70 % от общей популяции.

5. Впервые показана способность *M. capsulatus* KS-24, *M. trichosporium* и сообществ МС5, МС7 к внеклеточному биосинтезу наночастиц серебра (5-20 нм) в условиях фотоиндукции. Наночастицы обладают антимикробной активностью в отношении *E. coli* и *P. aeruginosa* (МИК 25-75 мг/л). Интенсивность синтеза коррелирует с фазой роста, что позволяет использовать её как индикатор метаболической активности.

6. Разработаны принципиальные технологические схемы получения биомассы на основе сконструированных сообществ. Для синтетического сообщества МС5 предложен вариант непрерывного культивирования в нестерильных условиях на техническом метане с использованием питательной среды, оптимизированной для накопления биомассы. Оценочный расчёт производства с годовым объёмом 10000 т по сухой биомассе показал, что себестоимость продукта составляет 194,4 руб/кг, сырого протеина – 299,6 руб/кг и является конкурентной в кормовой отрасли. Дальнейшее снижение себестоимости возможно за счёт интенсификации массообмена, применения избыточного давления и оптимизации подачи газовой фазы, что подтверждает значительный потенциал масштабирования разработанного подхода.

7. Для сообщества МС7 разработана двухстадийная схема, заключающаяся в последовательном применении условий, способствующих росту метанотрофного сообщества и увеличения в ней массовой доли полигидроксibuтирата. При годовом выпуске 1000 т абсолютно сухой биомассы себестоимость продукта достигает 1630 руб/кг, а полигидроксibuтирата – 4503 руб/кг со значительным потенциалом снижения при внедрении современных технологических решений, повышающих продуктивность культивирования.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России; в изданиях, индексируемых в Scopus и Web of Science:

1. **Сачавский А.А.**, Решетова А.С., Кузьмицкая А.А., Морозов А.Н., Калёнов С.В., Сорокин В.В., Складнев Д.А. Фотоиндуцированный биосинтез и антимикробная активность наночастиц серебра, синтезированных с использованием метанотрофных бактерий // Химическая промышленность сегодня. – 2026. – № 1. – С. 63-71. (ВАК (К2); РИНЦ).

2. **Сачавский А.А.**, Остер Е.И., Иванов А.С., Миронова М.Д., Калёнов С.В. Оптимизация роста смешанного метанооксиляющего сообщества на основе бактерий рода *Methylosinus* // Бутлеровские сообщения. – 2025. – Т. 81, № 2. – С. 106-116. (ВАК (К2); РИНЦ).

3. **Sachavskii A.A.**, Romanova M.V., Suyasov N.A., Reshetova A.S., Bezyaeva A.D., Kalenov S.V. Investigation of the role of satellite microorganisms in the functioning of methanotrophic communities // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2025. – Vol. 61, № 8. – P. 1540-1552 <https://doi.org/10.1134/S0003683825700310>. (ВАК (К1); WoS; Scopus (Q3)).

Статьи в других рецензируемых изданиях:

4. **Сачавский А.А.**, Яковлева Е.А., Мухамедова Л.Д., Мельник М.Д., Волков В.А., Калёнов С.В. Совместное культивирование метано- и метилотрофных микроорганизмов в ходе получения биомассы с высоким содержанием белка // Успехи в химии и химической технологии. – 2025. – Т. 39, № 10(301). – С. 122-125. (РИНЦ).

5. Волков В.А., Посадская О.М., **Сачавский А.А.**, Калёнов С.В. Исследование метилотрофных бактерий, выделенных из образцов ила озера Верглино // Успехи в химии и химической технологии. – 2025. – Т. 39, № 10(301). – С. 38-40. (РИНЦ)

6. Мельник М.Д., **Сачавский А.А.**, Юрков Д.А., Яковлева Е.А., Суясов Н.А. Влияние источников азота на накопление углеводов микробным сообществом на основе метанотрофных бактерий // Успехи в химии и химической технологии. – 2025. – Т. 39, № 10(301). – С. 82-84. (РИНЦ).

7. Харченко Н.В., Побережный Д.Ю., Калёнов С.В., **Сачавский А.А.**, Белов А.А., Сорокин В.В., Складнев Д.А. Изучение синтеза наночастиц серебра метилотрофными

бактериями, выделенными из различных природных источников // Успехи в химии и химической технологии. – 2023. – Т. 37, № 12(274). – С. 185-188. (РИНЦ).

Публикации в сборниках научных трудов и материалов конференций:

8. **Сачавский А.А.**, Решетова А.С., Виноградова В.Ю., Калёнов С.В. Внеклеточный биосинтез наночастиц серебра смешанным метанотрофным сообществом // «Перспективные материалы и высокоэффективные процессы обработки». – Саратов, 2025. – С. 144-148.

9. Решетова А.С., **Сачавский А.А.**, Яровая О.В. Выделение гуанина и аденина из микробной биомассы для фармацевтических целей // «Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации». – Москва: Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, 2025. – С.179.

10. **Сачавский А.А.**, Иванов А.С., Мельник М.Д., Калёнов С.В. Влияние неметанотрофных бактерий *Cupriavidus necator* на накопление в биомассе полигидроксibuтирата в ходе культивирования метанотрофов II-типа // «Актуальные аспекты и перспективы развития современной биотехнологии». – Белгород, 2025. – С. 93-101.

11. Вихрова М.А., Иванов А.С., **Сачавский А.А.**, Тарасов И.М., Игнашкова Д.А., Мухамедова Л.Д., Суясов Н.А. Опыт применения белковых гидролизатов в культивировании микроорганизмов // «21 век: фундаментальная наука и технологии». – Bengaluru, 2024. – С. 12-15.

12. Мельник М.Д., Миронова М.Д., Сергеев Е.Е., **Сачавский А.А.**, Суясов Н.А. Влияние начальных концентраций фосфорной кислоты на накопление углеводов *Methylococcus capsulatus* // «21 век: фундаментальная наука и технологии». – Bengaluru. – С. 1-4.

13. Игнашкова Д.А., Вихрова М.А., **Сачавский А.А.**, Мухамедова Л.Д., Беляновская А.А., Суясов Н.А. Использование метанола для получения кормового белка // «21 век: фундаментальная наука и технологии». – Bengaluru, 2024. – С. 16-20.

14. Вихрова М.А., Игнашкова Д.А., **Сачавский А.А.**, Иванов А.С., Авшалумов А.С., Суясов Н.А. Получение белковых ферментализатов биомассы бактерий // «Пищевые технологии и биотехнологии». – Казань, 2023. – С. 174-177.

15. Игнашкова Д.А., Вихрова М.А., Авшалумов А.С., Мухамедова Л.Д., **Сачавский А.А.**, Калёнов С.В., Суясов Н.А. Исследование метилотрофных бактерий, выделенных из почв полуострова Ямал // «Пищевые технологии и биотехнологии. – Казань, 2023. – С. 376-380.

16. Poberezhniy D.Y., **Sachavskii A.A.**, Pustynskaia A.S., Yarovaya O.V., Suyasov N.A., Kalenov S.V. Methylo-trophic microbial communities for the biosynthesis of noble metal nanoparticles // 19th International Multidisciplinary Scientific Geoconference SGEM 2019. Conference proceedings. Vol. 19. – Sofia, 2019. – P. 797-804. (Scopus).