

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский химико-технологический университет  
имени Д.И. Менделеева»**

На правах рукописи



**САЧАВСКИЙ АЛЕКСАНДР АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**УПРАВЛЯЕМОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СООБЩЕСТВ  
МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Научный руководитель:

д.т.н., доцент

Калёнов Сергей Владимирович

Москва – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b> .....	<b>2</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>7</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1. Распространение и роль метанооксиляющих микроорганизмов в природных средах</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2. Характеристика метанооксиляющих бактерий</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2.1. Особенности метаболизма метанооксиляющих бактерий</b> .....	<b>21</b>
<b>1.2.1.1. Центральный путь окисления метана</b> .....	<b>21</b>
<b>1.2.1.2. Ассимиляция углерода метанотрофами</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2.2. Факультативные метанотрофы</b> .....	<b>25</b>
<b>1.2.3. pMMO и sMMO</b> .....	<b>26</b>
<b>1.2.4. Классификация метанооксиляющих бактерий</b> .....	<b>29</b>
<b>1.3. Применение метанооксиляющих бактерий</b> .....	<b>32</b>
<b>1.3.1. Метанотрофы как источники белка</b> .....	<b>33</b>
<b>1.3.2. Метанотрофы как источники полигидроксиалканоатов</b> .....	<b>35</b>
<b>1.3.3. Метанотрофы как источники экзополисахаридов</b> .....	<b>38</b>
<b>1.3.4. Метанотрофы как источники липидов</b> .....	<b>39</b>
<b>1.3.5. Метанотрофы как продуценты метанола</b> .....	<b>40</b>
<b>1.3.6. Метанотрофы как продуценты эктоина и метанобактина</b> .....	<b>41</b>
<b>1.3.7. Метанотрофы в качестве биоремедиаторов токсичных органических веществ и тяжёлых металлов</b> .....	<b>43</b>
<b>1.3.8. Метаболическая инженерия метанотрофов и получение иных продуктов</b> .....	<b>45</b>
<b>1.3.9 Метанотрофы как продуценты наночастиц</b> .....	<b>46</b>
<b>1.4. Культивирование метанотрофных культур. Влияние состава среды на рост и продуктивность процесса</b> .....	<b>47</b>
<b>1.5. Метанотрофные сообщества</b> .....	<b>55</b>
<b>1.5.1. Получение обогащённых метанотрофных сообществ и выделение чистых культур</b> .....	<b>56</b>
<b>1.5.2. Роль неметанотрофных микроорганизмов в метанотрофных сообществах</b> .....	<b>58</b>
<b>1.5.3. Состав обогащённых метанотрофных сообществ</b> .....	<b>59</b>

1.5.4. Применение метанотрофных сообществ .....	61
1.5.5. Синтетические метанотрофные сообщества.....	61
Заключение по обзору литературы.....	64
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>66</b>
2.1. Объекты исследования.....	66
2.2. Отбор проб природных метанотрофных сообществ .....	66
2.3. Получение накопительных культур быстрорастущих метанотрофных сообществ.....	66
2.4. Выделение чистых культур метанооксиляющих и неметанотрофных микроорганизмов.....	68
2.5. Идентификация микроорганизмов, входящих в метанотрофные накопительные культуры.....	69
2.6. Определение базовых оптимальных условий роста выделенных метанотрофных культур .....	70
2.7. Культивирование парных сообществ «метанотроф-неметанотроф».....	70
2.8. Культивирование тройных сообществ «метанотроф-два неметанотрофа»....	72
2.9. Оптимизация состава ростовой среды для культивирования сконструированных сообществ и увеличения их продуктивности.....	73
2.9.1. Однофакторная оптимизация компонентов среды .....	74
2.9.2. Двухфакторная оптимизация источника азота и построение поверхности отклика .....	75
2.10. Культивирование синтетических сообществ в периодическом режиме.....	76
2.11. Культивирование синтетических сообществ в непрерывном режиме.....	77
2.11.1 Непрерывное культивирования синтетических сообществ в стерильных условиях.....	79
2.11.2 Непрерывное культивирования синтетических сообществ в нестерильных условиях.....	79
2.11.3 Непрерывное культивирование синтетических сообществ на техническом метане .....	79
2.11.4 Исследование стабильности состава синтетических метанотрофных сообществ при культивировании в непрерывном режиме.....	79
2.12. Расчёт показателей непрерывного культивирования синтетических сообществ.....	81

2.13. Биосинтез наночастиц серебра чистыми метанотрофными культурами и синтетическими метанотрофными сообществами .....	84
2.14. Аналитические методы .....	85
2.14.1. Определение абсолютно сухого веса (АСВ) .....	85
2.14.2. Определение сырого протеина.....	85
2.14.3. Определение белка методом Лоури.....	85
2.14.4. Определение сахаров .....	86
2.14.5. Первичный скрининг бактерий, синтезирующих полигидроксibuтират .	86
2.14.6. Определение полигидроксibuтирата .....	86
2.14.7. Определение содержания нуклеиновых кислот .....	87
2.14.8. Определение минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной концентрации наночастиц серебра .....	87
2.15. Статистическая обработка полученных результатов.....	88
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>89</b>
3.1. Быстрорастущие накопительные метанотрофные культуры .....	89
3.2. Состав метанотрофных сообществ.....	90
3.3. Роствые характеристики метанотрофных изолятов .....	94
3.4. Влияние неметанотрофных спутников на рост бинарных сообществ.....	98
3.5. Создание трёхсоставных сообществ.....	102
3.6. Оптимизация сред для накопления биомассы синтетическими метанотрофными сообществами .....	104
3.7. Периодическое культивирование синтетических сообществ на средах оптимизированного состава .....	112
3.8. Состав биомассы сконструированных сообществ.....	113
3.9. Оптимизация синтеза ценных биологически активных веществ синтетическими ассоциациями.....	114
3.10. Культивирование синтетических сообществ в непрерывном режиме.....	119
3.11. Устойчивость состава синтетических сообществ в непрерывном режиме культивирования.....	122
3.12. Расчёт первичных показателей непрерывного культивирования.....	124
3.13. Скрининг метанотрофов, синтезирующих наночастицы серебра .....	127
3.13.1. Характеристика наночастиц серебра .....	129

3.13.2. Ингибирующая и бактерицидная концентрации наночастиц серебра.....	133
Заключение по главе 3 .....	134
<b>ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ МЕТАНОТРОФНЫХ СООБЩЕСТВ.....</b>	<b>135</b>
4.1. Обоснование схемы и условий культивирования разработанных синтетических метанотрофных сообществ .....	135
4.1.1. Требования, предъявляемые к получаемому продукту .....	136
4.1.2 Основные расчётные формулы, используемые при технико-экономическом обосновании.....	138
4.2. Блок-схема культивирования синтетического сообщества МС5.....	141
4.3. Расчёт технико-экономических показателей для сообщества МС5 при годовом объёме производства 10000 тонн сухой по биомассе.....	144
4.3.1. Эффективный фонд рабочего времени оборудования.....	145
4.3.2. Подбор оборудования.....	146
4.3.3. Расчёт капитальных затрат и амортизации.....	152
4.3.4. Расчёт стоимости сырья и основных материалов.....	155
4.3.5. Расчёт количества и стоимости энергоресурсов .....	157
4.3.6. Расчет затрат на оплату труда персонала .....	158
4.3.7. Расчёт себестоимости готовой продукции .....	159
4.4. Блок-схема культивирования синтетического сообщества МС7.....	161
4.5. Расчёт технико-экономических показателей для сообщества МС7 при годовом объёме производства 1000 тонн по сухой биомассе.....	163
4.5.1. Эффективный фонд рабочего времени оборудования.....	164
4.5.2. Подбор оборудования.....	165
4.5.3. Расчёт капитальных затрат и амортизации.....	172
4.5.4. Расчёт стоимости сырья и основных материалов.....	173
4.5.5. Расчёт количества и стоимости энергоресурсов .....	175
4.5.6. Расчет затрат на оплату труда персонала .....	175
4.5.7. Расчёт себестоимости готовой продукции .....	176
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>179</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>183</b>

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>	<b>185</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>188</b>
<b>Приложение А.....</b>	<b>221</b>
<b>Приложение Б.....</b>	<b>222</b>
<b>Приложение В.....</b>	<b>223</b>
<b>Приложение Г.....</b>	<b>224</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Метаноокисляющие бактерии (МОБ) или метанотрофы широко представлены в большинстве природных зон, в которых даже в небольших количествах присутствует метан ( $\text{CH}_4$ ) и кислород [1]. Данные бактерии играют важную роль в глобальном цикле углерода и обладают уникальной среди живых организмов способностью использовать метан в качестве субстрата для роста и получения энергии благодаря наличию фермента метанмонооксигеназы, представленной в виде двух форм: мембраносвязанной (pММО) и растворимой (sММО) [2]. На сегодняшний день метанотрофные микроорганизмы преимущественно встречаются в классах *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*, а также среди некультивируемого филума *Verrucomicrobia* [3].

Метанотрофы, в силу специфического метаболизма и способности расти на недорогом и доступном сырье, которым является метан, зарекомендовали себя в качестве продуцентов широкого спектра соединений [4-5]. Наиболее перспективными из них являются белки, полигидроксиалканоаты, полисахариды, липиды, а также малые органические молекулы, к которым относят метанобактин и эктоин [6]. Также метанотрофы потенциально могут применяться для проведения процессов биоремедиации и синтеза наночастиц [7]. Исследования, направленные на повышение темпов наработки биомассы метаноокисляющих бактерий и содержания в ней целевых веществ, указывают на сильную зависимость результатов культивирования от минерального состава среды и газовой фазы [8]. 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 [9-10].

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 [11-12]. 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 (метанол, формальдегид, формиат), снижая их ингибирующий эффект, что увеличивает стабильность процесса наработки микробной биомассы [13-14]. В связи с вышесказанным в последние годы актуальной научно-исследовательской задачей является повышение продуктивности консорциумов, как полученных из накопительных (обогащённых) культур, так созданных из известных отдельных культур (синтетические сообщества) [15]. 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 полигидроксibuтират, 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 [16]. 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 [17]. В свою очередь, метанооксиляющие консорциумы МОБ II типа (рода *Methylosinus* и *Methylocystis*) внедряются в биотехнологические производства в качестве продуцентов полигидроксиалканоатов [18].

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 [19-20]. Тем не менее, работы, направленные на выявление закономерностей влияния конкретных неметанотрофных микроорганизмов на продуктивность сообщества, единичны и носят поисковый характер [21-22]. 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 (Приложение А). 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  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , 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 метанооксилющих 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 кг/(м<sup>3</sup>·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 (Приложения Б, В).

### **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, полигидроксибутирата, 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 полигидроксибутирата 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 Geosconference 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 (Приложение Г).

**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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Распространение и роль метанооксиляющих микроорганизмов в природных средах

Метанотрофные микроорганизмы, к которым относятся некоторые группы аэробных бактерий и анаэробных архей, встречаются во всех природных средах, в которых в газообразном либо растворённом виде присутствует метан [1]. Данные бактерии используют  $\text{CH}_4$  в окислительно-восстановительных реакциях в качестве источника энергии и углерода для осуществления процессов метаболизма. В качестве акцептора электронов метанотрофы используют кислород, а при его отсутствии - альтернативные соединения, такие как сульфат, нитрат, нитрит, а также ионы железа и марганца [4]. Метанотрофные микроорганизмы играют важную роль в глобальном биогеохимическом цикле углерода, включая в него метан, выделяемый в ходе метаногенной активности, и делая его доступным для усвоения другими организмами [23]. Аэробные метанооксиляющие бактерии (МОБ) широко распространены в морской и пресной воде, верхних слоях болот, водно-болотистых угодий и торфяниках, а также в значительном количестве обнаружены в верхнем слое почвы, включая зоны со следовыми концентрациями  $\text{CH}_4$  [24-25]. Отдельно стоит отметить высокую долю потребляющих метан бактерий в местах, используемых для выращивания сельскохозяйственных культур и в местах расположения свалок [26].

В средах, где встречаются метанооксиляющие микроорганизмы, наблюдается их глубокая интеграция в трофические цепи экосистем [27-28]. Метанотрофы, являясь единственными биологическими поглотителями метана, преобразуют его в органические соединения, доступные гетеротрофным бактериям, а также растениям, грибам и простейшим [29]. Тесная связь в различных природных средах наблюдается между родственными группами метанотрофов и метилотрофов. Установлено, что некоторые МОБ в присутствии метанооксиляющих бактерий способны перестраивать свой метаболизм и значительно увеличивать долю

метанола, высвобождаемого из клеток в окружающую среду [30]. Метанотрофы также взаимодействуют с денитрификаторами, снижая содержание кислорода и выделяя метанол и формиат, которые используются для восстановления нитрата [31]. Более того, такие метаноокисляющие бактерии, как *Methylobacterium alcaliphilum*, в условиях дефицита кислорода направленно выделяют в окружающую среду ацетат и сукцинат, способствующие росту неметанотрофных гетеротрофов [32]. Метанотрофные микроорганизмы являются важным элементом ризосферы, что наиболее выражено при анализе состава сообществ, населяющих почвы рисовых полей. Располагаясь в основном на границе аэробной и анаэробной зоны, МОБ предупреждают эмиссию метана в атмосферу и способствуют сохранению углерода в форме соединений, доступных для других организмов [33]. Подробно исследовано тесное симбиотическое взаимодействие метанотрофов со мхом рода *Sphagnum*: в обмен на молекулярный кислород бактерии снабжают растение дополнительным источником CO<sub>2</sub>, а также минеральным азотом, образующимся в ходе азотофиксации рядом представителей данной группы микроорганизмов [34]. Результатом указанных взаимодействий является не только поддержание роста и разнообразия гетеротрофных бактерий, но и более эффективное поглощение метана самими метанотрофами вследствие взаимных положительных связей сосуществующих микроорганизмов [29, 35].

Наиболее значимое для экологии влияние метанотрофов на окружающую среду связано со снижением парникового эффекта, вызываемого наличием метана в атмосфере. И хотя доля метана в воздухе невелика и составляет на сегодняшний день всего 1,8-1,9 миллионных объёмных долей, он занимает второе место по распространённости среди газов с выраженным парниковым эффектом, удерживая многократно больше тепла по сравнению с углекислым газом [36]. Основными источниками эмиссии метана являются болота (до 217 Тг/год) и антропогенная деятельность, включающая сельское хозяйство, свалки, добычу полезных ископаемых (суммарно до 350 Тг/год). С учётом данного факта, а также наблюдаемого роста эмиссии метана в атмосферу (на 0,8-1,2 % в год, начиная с 1970-х годов) становится очевидна важнейшая роль метанотрофов в сдерживании

процессов глобального потепления, обеспечении устойчивости климата на Земле и необходимости их детального изучения [37-38].

## 1.2. Характеристика метанооксилющих бактерий

Способность использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии, а также напрямую окислять его и преобразовывать в клетке в иные органические молекулы является уникальной характеристикой метанотрофов [39]. Принципиально различают два механизма усвоения метана: кислородзависимый (аэробные условия) и кислороднезависимый (преимущественно анаэробные условия) [40]. Все аэробные метанотрофы усваивают  $\text{CH}_4$  за счёт наличия в клетках уникального ферментного комплекса – метанмонооксигеназы (ММО) [41]. Несмотря на большое разнообразие метанотрофных бактерий, морфологически проявляемое в разнообразии форм: от кокков до палочек и вибрионов, зачастую с выраженным полиморфизмом, они обладают рядом общих черт. Принципиальное сходство в наличии развитой цитоплазматической мембраны, отрицательно окрашиваемой по Граму, а также общий путь окисления метана до углекислого газа через образование формальдегида в качестве промежуточного продукта остается одинаковым для всех представителей, входящих в данную группу [42-43]. Механизм анаэробного окисления метана («обратный метаногенез») изучен хуже, поскольку выделить чистые культуры анаэробных метанотрофов пока не удаётся [44]. Предполагается, что в этом процессе задействован процесс денитрификации или совокупная активность консорциума бактерий и архей, основанная на работе фермента метил-КоА-редуктазы. [45-46]. В результате недавних исследований был выделен кандидатный тип метанотрофных микроорганизмов *NC10*, примечательный внутриклеточным производством кислорода благодаря реакции восстановления нитрита, что позволяет данным микроорганизмам осуществлять окисление метана в строго анаэробных условиях [47].

Традиционно считалось, что большинство метаноокисляющих микроорганизмов являются нейтрофильными (оптимум рН 6,0-8,0) или умеренно ацидофильными (рН 5,0-6,5), что соответствует кислотности большинства водных сред и почв, включая слабокислые. Однако, исследования, проведённые в последние десятилетия, указывают на широкое распространение МОБ в сильноокислых и щелочных местах обитания [48]. Бактерии, проявляющие метаноокисляющую активность, были выделены из щелочных содовых озёр (рН до 9,5), а также из сильноокислых почв и термальных источников [49-50]. Метанотрофные микроорганизмы обнаружены в разнообразных природных средах, характеризующихся большим различием в температуре [24]. Помимо широкого спектра известных мезофильных бактерий, были выделены и идентифицированы психротолерантные и психрофильные представители, демонстрирующие жизнеспособность и даже активный рост при 10 °С и ниже [51]. Метанотрофные бактерии, приспособленные к росту при более высоких или низких температурах, встречаются в нескольких различных родах класса *Gamma*proteobacteria, тогда как среди метанотрофного класса *Alphaproteobacteria* адаптации к температурам за пределами мезофильного диапазона наблюдаются значительно реже [24]. Термофильные МОБ, относящиеся к некультивируемому типу *Verrucomicrobia*, активно окисляют метан при температуре до 65 °С и также широко распространены в природе [52]. Среди данных бактерий обнаружены экстремофильные микроорганизмы, предпочитающие расти в условиях значения рН от 1 до 3 и средней температуре, превышающей 50 °С [53]. Таким образом, для части метанотрофов характерна способность расти в широком диапазоне условий, в то время как представители других родов, демонстрируя меньшую адаптивную гибкость, процветают в специфических экологических нишах [24].

Далее в литературном обзоре будут рассматриваться преимущественно аэробные метаноокисляющие микроорганизмы, поскольку именно они являются основным объектом исследования.

### 1.2.1. Особенности метаболизма метанооксиляющих бактерий

Ферментативные процессы, происходящие в клетках МОБ в ходе окисления и ассимиляции метана и отображённые на рисунке 1, определяют их роль в природе и потенциал применения в биотехнологии.

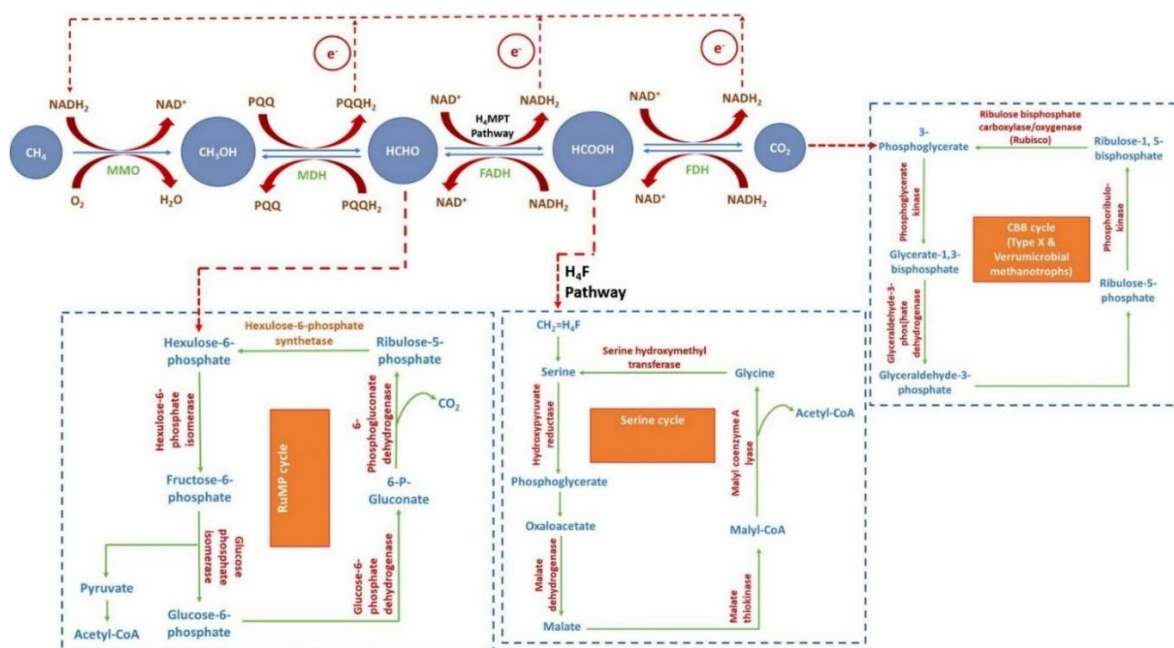


Рисунок 1 – Метаболизм метана метанотрофами [6]

#### 1.2.1.1. Центральный путь окисления метана

На первом этапе центрального пути окисления метана в клетках метанотрофов происходит превращение  $\text{CH}_4$  до метанола при участии метанмонооксигеназы, представленной в виде двух форм: мембраносвязанной (нерастворимой) рММО, включённой в периплазматическую мембрану и растворимой sММО, локализованной в цитоплазме [54-55]. Метанотрофные бактерии способны синтезировать один из данных ферментов либо содержать одновременно рММО и sММО, причём мембраносвязанная метанмонооксигеназа встречается у большей части представителей группы метанооксиляющих бактерий [39]. ММО для осуществления окислительно-восстановительной реакции нуждается в двух электронах, которые фермент получает от НАДФН· $\text{H}^+$  в случае работы sММО, в то

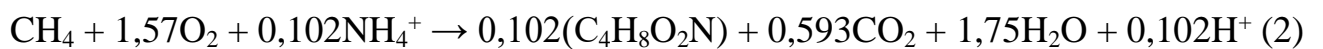
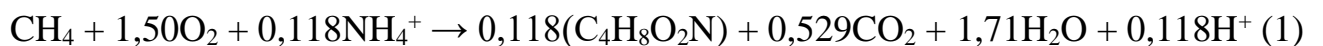
время как для данной цели рММО используют пирролохинолинхинон-зависимую метанолдегидрогеназу (PQQ-МДГ) или убихинол [56].

На следующем этапе метанол под действием кальций-зависимой (тип MxaFI) либо лантаноидсодержащей (тип XoxF) PQQ-МДГ в периплазме клеток преобразуется в формальдегид [57-58]. Наиболее распространённой является именно форма PQQ-МДГ типа MxaFI, являющаяся гетеротетрамером ( $2\alpha 2\beta$ ), состоящим из двух больших  $\alpha$  (66кДа) и двух малых  $\beta$  (8,5кДа) субъединиц. Каждая из  $\alpha$ -субъединиц связана с двумя ионами кальция и одной молекулой PQQ [59]. В дальнейшем образованный формальдегид может быть окислен до  $\text{CO}_2$  или ассимилирован различными путями в зависимости от потребностей МОБ. Преобразование формальдегида до формиата в варианте дальнейшего окисления может катализироваться различными ферментами, включающими тетрагидрометаноптерин- (H<sub>4</sub>MPT-) или тетрагидрофолат-связанные дегидрогеназы, а также формальдегиддегидрогеназу [60]. В силу обратимости реакции указанные ферменты в зависимости от равновесия реакции способны катализировать процесс как в сторону образования формиата, так и в направлении синтеза формальдегида. Организмы, использующие рибулозомонофосфатный путь для ассимиляции формальдегида, также могут окислять формальдегид через окислительную ветвь этого цикла [61]. Окисление формальдегида позволяет метанотрофным организмам не только генерировать энергию, но также поддерживать содержание данного соединения на уровне, не вызывающим самоинтоксикацию клетки [62].

На заключительной стадии центрального пути формиат в ходе окислительно-восстановительных реакций в цитоплазме преобразуется до углекислого газа при помощи НАД<sup>+</sup>-зависимой формиатдегидрогеназы [63]. Данная реакция является важной по причине образования восстановительных эквивалентов НАДН, регулирующих многие реакции в бактериальной клетке [64].

### 1.2.1.2. Ассимиляция углерода метанотрофами

Ассимиляция углерода метана метанотрофами заключается в образовании формальдегида и его последующего включения в различные циклы метаболизма клетки. Представители МОБ, относящиеся к гамма-протеобактериям в основном используют для данной цели рибулозомонофосфатный цикл (RuMP), в то время как метанотрофные альфа-протеобактерии преимущественно задействуют сериновый цикл [65]. Отмечается, что некоторые метанотрофы проявляют значительную гибкость метаболизма и способны обладать одновременно двумя механизмами усвоения метана [6]. Работа обоих упомянутых путей приводит к получению пирувата, а затем ацетил-КоА в качестве основных промежуточных продуктов для дальнейшего синтеза [54]. Уравнения, описывающие суммарную потребность в кислороде и азоте, а также образование биомассы ( $C_4H_8O_2N$ ) в ходе ассимиляции метана через RuMP (1) и сериновый (2) пути соответственно [66]:



С термодинамической точки зрения путь RuMP является наиболее эффективным путем усвоения углерода метана, что особенно актуально для метанотрофных микроорганизмов, существующих в условиях ограниченной доступности  $CH_4$  [39, 67]. Ферменты, позволяющие снижать токсичное влияние формальдегида посредством рибулозомонофосфатного цикла, встречаются не только у метано- и метилотрофов, а широко распространены у многих гетеротрофных бактерий и не являются их исключительной особенностью [68]. Ключевыми реакциями данного пути являются альдольная конденсация формальдегида и рибулозо-5-фосфата с получением гексулозо-6-фосфата (Hu6P) при участии фермента гексулозофосфатсинтазы, а также последующая изомеризация Hu6P с образованием фруктозо-6-фосфата (F6P), катализируемая гексулозо-6-фосфатизомеразой [69]. Внутриклеточный пул F6P является вторым основным регулятором потока углерода в метанотрофах, использующих путь RuMP [70]. В дальнейшем F6P может быть регенерирован в рибулозо-5-фосфат,

либо преобразован в циклах Энтнера-Дудорова и Эмбдена-Мейерхофа-Парнаса в пируват и фосфоенолпируват, который может быть включён в цикл трикарбоновых кислот и направлен на биосинтетические реакции либо на получение восстановительных эквивалентов и энергии [71-72]. Исследования, проведённые с меченым углеродом, показали, что оба пути могут одновременно функционировать в метанотрофном микроорганизме и регулироваться в зависимости от текущего баланса веществ и энергии в клетке [73].

Сериновый путь ассимиляции формальдегида начинается с образования метилентетрагидрофолата ( $H_4MPT$ ), который после взаимодействия с тетрагидрофолатзависимыми ферментами метанотрофов приводит к получению  $N^5, N^{10}$ -метилентетрагидрофолата [74-75]. Далее данное соединение участвует в реакции конденсации с глицином, катализируемой серингидроксиметилтрансферазой, в результате которой образуется серин [76]. Затем серин претерпевает ряд преобразований до фосфоенолпирувата и далее до малата, который через образование манил-КоА в итоге расщепляется на две молекулы: ацетил-КоА и глиоксалат. [77-78]. В то время как глиоксалат служит субстратом для трансаминирования и регенерации глицина, ацетил-КоА может быть задействован в различных метаболических путях, среди которых окисление до глиоксилата и биосинтез фосфолипидов и трикарбоновых кислот [79].

Установлено, что рибулозомонофосфатный цикл нуждается в 1 молекуле АТФ для ассимиляции 3 молекул формальдегида, что является энергетически более выгодным по сравнению с сериновым путём, в котором на 2 молекулы формальдегида требуется 3 АТФ и 2 НАДН<sup>+</sup>, а также СО<sub>2</sub> [80]. Точка поступления углерода в метаболические пути метанотрофов может иметь значительное влияние на протекание метаболических процессов. Так, для некоторых гамма-протеобактерий не наблюдается значительной разницы в темпах роста на метане и метаноле, тогда как альфа-протеобактерии выражено предпочитают использовать метан в качестве единственного источника углерода и либо неспособны расти на интермедиатах центрального пути окисления, либо потребляют их значительно медленнее [81].

Некоторые метанотрофы, такие как *Methylococcus capsulatus*, помимо способности задействовать сериновый и RuMP циклы, используют рибулозобисфосфатный путь, основным ферментом которого в ходе ассимиляции углекислого газа выступает рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза [82]. Отдельно стоит выделить метанотрофных представителей распространённого в природных средах некультивируемого типа *Verrucomicrobia* [50]. Данные микроорганизмы, обладающие развитым циклом Кальвина, не включают метан в ассимиляционные реакции, а используют его исключительно в качестве источника энергии, полностью окисляя его до  $\text{CO}_2$  и потребляя иные углеродсодержащие субстраты для биосинтетических процессов [83].

### 1.2.2. Факультативные метанотрофы

До недавнего времени считалось, что метанотрофные микроорганизмы являются облигатными по отношению к метану и неспособны использовать иные субстраты в качестве источника углерода [84]. Однако, последние открытия указывают на то, что бактерии рода *Methylocella*, родственные с неметанотрофным гетеротрофом *Beijerinckia indica*, способны окислять ацетат, пируват, сукцинат, малат, этанол и ряд других веществ [85]. Способность утилизировать столь широкий спектр соединений у данной группы МОБ связывают с наличием в их клетках родственных sMMO ферментов оксигеназ растворимого дижелезного центра, например, пропанмонооксигеназы [86]. В ходе ассимиляции  $\text{C}_2$ -субстрата бактерии р. *Methylocella* используют глиокислатный шунт для пополнения серинового цикла и пула трикарбоновых кислот [87]. Сообщается, что факультативные виды также встречаются среди ацидофильных альфа-протеобактерий и широко представлены среди филума *Verrucomicrobia* [88]. Некоторые более каноничные метанотрофы родов *Methylocystis* и *Methylocapsa* продемонстрировали возможность усваивать отличные от метана углеродные соединения [89-90]. Данные организмы благодаря отсутствию строгой субстратной специфичности фермента sMMO растут на средах, содержащих метанол, ацетат, этанол, некоторые органические кислоты и короткоцепочечные

алканы при отсутствии или дефиците  $\text{CH}_4$  [91-93]. Обнаружено наличие алкогольдегидрогеназы у метанотрофов родов *Methylosinus* и *Methylomonas*, что позволяет им после взаимодействия этана с ММО окислять этанол в ацетальдегид и в дальнейшем его ассимилировать [94]. При культивировании на этаноле штамма *Methylocystis* sp. SB2 было замечено сильное снижение экспрессии генов, относящихся к окислению метана и сериновому циклу, а также заметное увеличение экспрессии генов, связанных с циклом трикарбоновых кислот [78]. Исследования метаболизма метанотрофов, использующих сериновый путь, показали, что в клетках факультативных метанотрофов может находиться несколько изоферментов гидроксиметилтрансферазы, активность и соотношение которых меняется в зависимости от источника углерода, используемого для роста [95]. Тем не менее, факультативные метанотрофы (помимо р. *Methylocella*), несмотря на присутствие альтернативных вариантов ассимиляции углерода, независимо от наличия в клетке рММО, или же обоих вариантов фермента, предпочитают ассимилировать именно метан при его наличии в среде другим углеродсодержащим веществам [96]. Установлено, что темпы роста на ацетате или этаноле для факультативных МОБ достаточно низкие и составляют лишь 7-42 % от соответствующего показателя при использовании метана [97]. Важно отметить, что до сих пор существует ряд бактерий, которые ошибочно причисляют к факультативным метанотрофам из-за отсутствия прямых доказательств о наличии механизмов окисления метана в целевом организме или же анализа синтрофных ассоциаций вместо чистых культур ввиду трудностей, возникающих в процессе их выделения [3].

### 1.2.3. рММО и sММО

Метанмонооксигеназа – димерный фермент с каталитическим центром, содержащим железо или медь, позволяющий метанотрофным микроорганизмам осуществлять реакцию оксигенирования метана, обладающего крайне стабильной С-Н связью [98]. Хотя обе формы ММО (sММО и рММО) выполняют одну и ту же функцию, они сильно отличаются по своей молекулярной структуре, составу

активного центра, требованиям к ионам металлов, субстратной специфичности и кинетике окисления  $\text{CH}_4$  [99].

Растворимая метанмонооксигеназа обнаружена лишь у ограниченного числа метанотрофов, включая роды *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylococcus*, а также некоторые виды *Methylomonas* и *Methylomicrobium* [100-101]. Наиболее детально охарактеризованы sММО из *Methylococcus capsulatus* Bath и *Methylosinus trichosporium* ОВ3b [102]. Растворимая метанмонооксигеназа представляет собой негемовый железосодержащий ферментный комплекс, состоящий из трех компонентов: гидроксилазы, регуляторного протеина и редуктазы [103]. Гидроксилаза имеет три субъединицы,  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , расположенные в конфигурации гомодимера  $(\alpha\beta\gamma)_2$ . Субъединица  $\alpha$  содержит бис- $\mu$ -гидроксо-мостиковый дижелезный бикомплекс, отвечающий за образование активного высоковалентного феррильного интермедиата  $\text{Fe}=\text{O}$ , способного разрывать углерод-водородную связь С-Н в метане. Образовавшийся углеводородный радикал взаимодействует с группой -ОН на железе, что ведёт к образованию метанола. Окислительная реакция обеспечивается сопряжением с НАДФ благодаря работе редуктазы – флавопротеина, отвечающего за перенос электронов к каталитическому центру. Регуляторный протеин кратно увеличивает скорость реакции, ограничивая доступ протонов в активный центр [104].

Мембраносвязанная метанмонооксигеназа, составляющая 80-90 % от всех белков мембраны, присутствует практически у всех метанотрофов за исключением представителей родов *Methylocella* и *Methyloferula*, однако изучена хуже ввиду сложности строения и нестабильности при выделении в бесклеточных фракциях [105]. Методом рентгеновской кристаллографии было установлено, что рММО тримерной структурой вида  $(\alpha\beta\gamma)_3$ , состоящих из полипептидных субъединиц PmoA, PmoB и PmoC. Три иона меди и один цинка связаны с каждым мономером: медь локализована в двух сайтах водорастворимого домена PmoB, образующего активный центр, а цинк расположен в трансмембранном домене [106-107]. Важную роль в работе рММО играет метанобактин, являющийся уникальным переносчиком и восстановителем меди в клетках МОБ [108]. Несмотря на

детальное изучение строения, механизм реакции окисления метана посредством *pMMO* до конца не ясен [109]. Донором электронов, вероятно, выступает комплекс цитохрома *bc1*, сопряжённый с работой метанолдегидрогеназы и/или убихинона посредством окисления НАДН [7, 110].

Для метанотрофов, способных экспрессировать как *sMMO*, так и *pMMO*, синтез данных ферментов регулируется доступностью меди посредством «медного переключателя», в котором задействованы регуляторный белок *MmoD* и халькофор метанобактин [111-112]. При низких концентрациях меди метанобактин и *MmoD* способствуют экспрессии *sMMO* и репрессии *pMMO*, тогда как при высоких концентрациях связанный с медью метанобактин теряет эти функции, что приводит к доминированию *pMMO* [113-114].

Поскольку *pMMO* имеет большее сродство к метану, данный фермент способен преобразовывать в спирты лишь ограниченное количество соединений (короткоцепочечные алканы до  $C_5$ ), а также эпоксидировать алкены (этилен, пропен и бутен), в то время как *sMMO* способен окислять алканы длиной до восьми атомов углерода, а также эфиры, циклические алканы и ароматические углеводороды [115]. *sMMO* по сравнению с *pMMO* имеет более высокое максимальное число оборотов  $CH_4$ , а также удельную активность на единицу субстрата. При этом исследования, посвящённые росту метанотрофов в условиях преобладающей экспрессии того или иного фермента, указывают на тенденцию к повышенной скорости роста и эффективности окисления метана у клеток, экспрессирующих *pMMO* [116].

Консервативные области генов *pmoA* и *pmoX*, кодирующие субъединицы *pMMO* и *sMMO* соответственно, являются целью наиболее часто применяемых праймеров и используются в качестве биомаркеров для количественной оценки и анализа активности аэробных метанотрофов в природных и синтетических системах [117-118]. Также данные гены применяют в качестве филогенетических биомаркеров, однако по мере открытия новых видов МОБ обнаруживается все больше исключений, что требует разработки более селективных праймеров для идентификации неканоничных метанотрофов [24; 117].

#### 1.2.4. Классификация метаноокисляющих бактерий

Первый вариант классификации метаноокисляющих бактерий был предложен в 1970 году и заключался в разделении всех известных на тот момент МОБ (более 100 штаммов), относящихся к протеобактериям, на два типа (I и II тип). К метанотрофам I типа были отнесены бактерии семейства *Methylococcaceae*, включающие рода *Methylococcus* (типовой род), *Methylocaldum*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* и *Methylosphaera*. К метанотрофам II типа, сгруппированным в семейство *Methylocystaceae* были причислены рода *Methylocystis* (типовой род) и *Methylosinus*. Основными критериями различия бактерий этих типов являлись их физиологические, морфологические, ультраструктурные и хемотаксономические признаки [119]. Отличительными характеристиками, позволяющими разделить метанотрофы на тип I и тип II, являлись: расположение внутренних мембран в виде везикулярных дисков (тип I) или парных мембран, выровненных по периферии клетки (тип II); механизм фиксации углерода через рибулозимонофосфатный (тип I) или сериновый цикл (тип II); способность к фиксации азота, способность к образованию покоящихся форм, а также преобладание специфических жирных кислот C<sub>16</sub> (тип I) или C<sub>18</sub> (тип II). Метанотрофы типа I обычно обладают ДНК с гуанин-цитозиновым составом (GC %), находящимся в пределах 43-60 %, тогда как метанотрофы типа II содержат ДНК с более высоким содержанием GC % в диапазоне 60-67 % [120]. Также отмечалась более высокая эффективность конверсии метана представителями МОБ типа I, при этом метаноокисляющие микроорганизмы типа II проявляли способность расти на более широком спектре углеродсодержащих субстратов [121]. Различие в строении интроплазматических мембран, влияет на возможности клетки содержать наибольшее количество мембраносвязанной рММО [122]. В ответ на повышение содержания ионов меди в среде, а, следовательно, и экспрессию синтеза рММО, метанотрофы типа I способны увеличивать поверхность мембраны путём её инвагинации, образуя плотную высокоупорядоченную структуру [123]. В клетках МОБ типа II, в свою очередь, интроплазматическая мембрана существует как

полностью изолированная структура [124]. Другим важным отличием между данными типами метанотрофов являлась характерная способность метанотрофов II типа расти при низких концентрациях питательных веществ и становиться преобладающими в смешанных сообществах при культивировании на разбавленных минеральных средах. Этот факт объясняется различными жизненными стратегиями сравниваемых типов окисляющих метан бактерий: МОБ I типа соответствуют R-стратегии, направленной на высокую скорость воспроизводства, а МОБ II типа – K-стратегии, ориентированной на большую гибкость к изменениям условий окружающей среды и более медленный рост [125]. В дальнейшем из типа I был выделен самостоятельный тип X, отличающийся наличием как серинового, так и рибулозомонофосфатного пути ассимиляции метана, а также цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. В него вошли некоторые представители рода *Methylococcus*, например, *M. capsulatus* [126].

Последующее изучение известных метанотрофных микроорганизмов, а также открытие новых бактерий, способных к метанотрофии, проявило ряд недостатков принятой классификации [24]. Были обнаружены неканоничные метанотрофы, например, филум *Verrucomicrobia* и новообразованное семейство *Beijerinckia*, строение и состав мембран которых не соответствует первоначальному разделению [127]. Более того, такие критерии дифференциации, как способность к фиксации азота, склонность к образовыванию тех или иных покоящихся форм, а также оптимальная температура роста перестали являться релевантными. В последующие годы с появлением молекулярных методов для быстрой идентификации и классификации бактерий были описаны новые рода метанотрофов, а ряд ранее известных штаммов был переклассифицирован [24, 128].

Текущая система на основе семейств, которая содержит в себе классическую классификацию, остаётся открытой для расширения номенклатуры метанотрофов и дает представление о других определяющих критериях, связанных с биохимией, физиологией и морфологией (рисунок 2) [129]. Текущая таксономия включает в I тип семейства *Methylomonadacea*, *Methylococcaceae*, *Methylothermaceae* и *Crenotrichaceae*, которые группируют в МОБ типа Ia, Ib, Ic и Id соответственно

[128, 130]. Рода *Methylomonas*, *Methylovulum*, *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, *Methylocucumis*, а также ряд других относят к семейству *Methylomonadaceae*, тогда как рода *Methylococcus* (включая также представителей ранее выделенного тип X), *Methylocaldum*, *Methylotetracoccus*, *Methylomagnum* и сходные с ними метанотрофы относятся к *Methylococcaceae* [48, 131-132]. Семейства *Methylocystaceae* и *Beijerinckiaceae* теперь классифицируются как тип IIa (рода *Methylosinus* и *Methylocystis*) и тип IIb (рода *Methylocella*, *Methylocapsa* и *Methyloferula*) соответственно [133-134]. Бактерии, принадлежащие к *Verrucomicrobiota* (семейства *Methyacidimicrobium* и *Methylacidiphilum*), были отнесены к типу III, а кандидатные *Methyacidimicrobium*, *Methylacidiphilum* сформировали тип IV (NC10 и NT) [134-135]. Таким образом, все выявленные 34 рода метанотрофов оказались сгруппированы в девять семейств: 23 из них принадлежат *Gamma*proteobacteria, 5 – к *Alpha*proteobacteria и по два – к *Verrucomicrobiota*, NC10 и NT, что отображено на рисунке 2 [130, 135].

Несмотря на разработку более детальной классификации, охватывающей и разграничивающей большее число групп метанотрофов, классическое разделение на метанотрофов I, II и X типа продолжает применяться до сих пор как способ соотнести микроорганизм с путём ассимиляции метана в клетках или как синонимичное альфа- и гаммапротеобактериям, что в целом согласуется с филогенетическим подходом [136]. Данный факт также обусловлен преимущественно сходной реакцией объединённых подобным образом культур на изменение условий культивирования и, как следствие, на способность накапливать или экспрессировать те или иные биомолекулы, представляющие интерес в области биотехнологии [137]. Далее в литературном обзоре характерные особенности метаболизма, присущие тем или иным типам МОБ, будут отображены в контексте их использования для получения различных соединений.

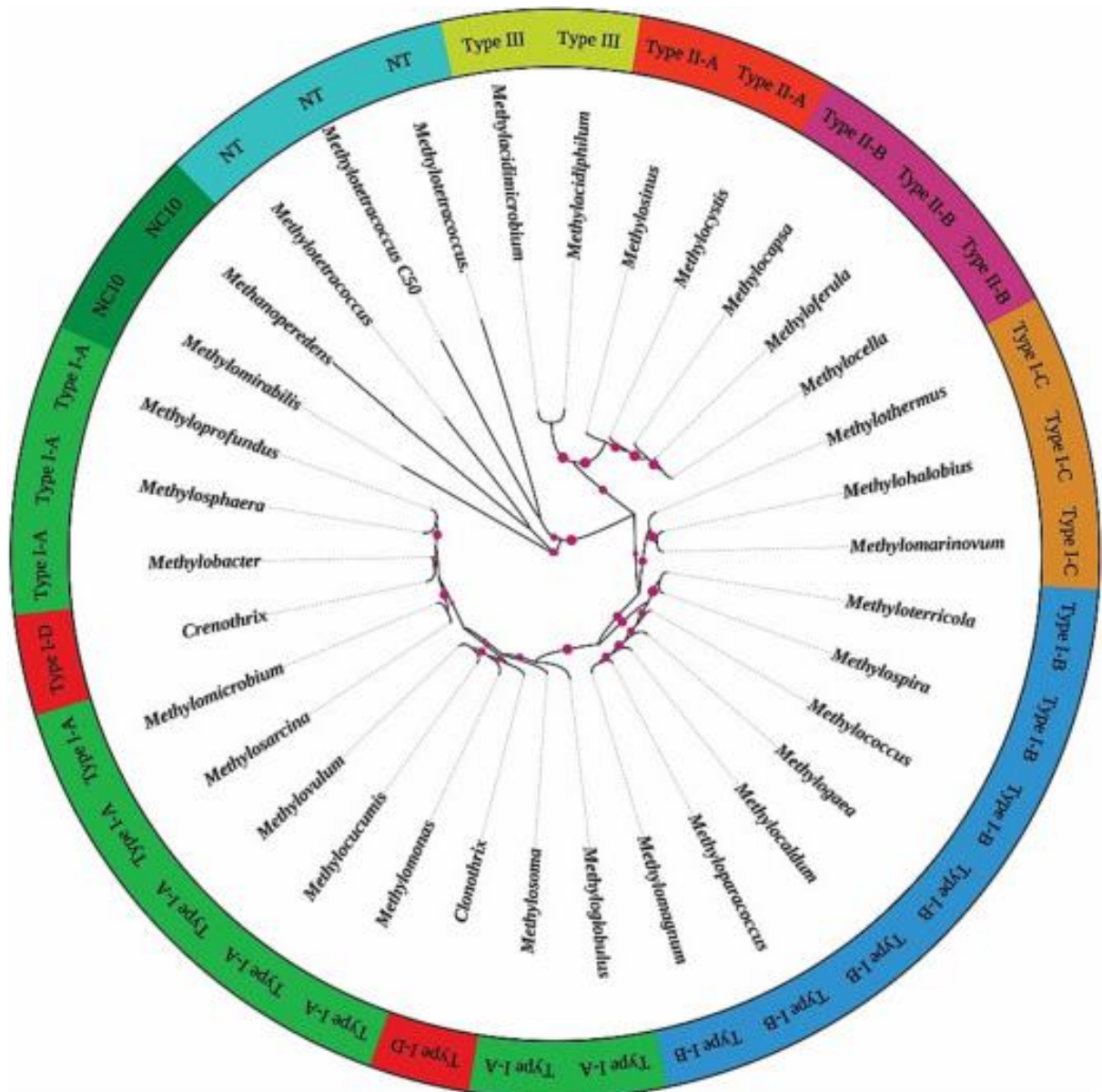


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево метанотрофных микроорганизмов, построенное при помощи метода максимального правдоподобия [135]

### 1.3. Применение метанооксиляющих бактерий

Благодаря своему уникальному метаболизму метанотрофные микроорганизмы являются перспективным источником для получения широкого спектра биологически активных веществ [6]. Метанотрофные микроорганизмы востребованы во многих областях биотехнологии в силу способности накапливать в клетках и выделять в культуральную жидкость значительные количества соединений, представляющих интерес для пищевой промышленности, производства

кормов, сельского хозяйства, катализа и производства биотоплива и биопластика [138-139]. Принципиально, производство ценных соединений из метана дифференцируют в соответствии со способностью метанотрофов: производить ряд молекул в виде промежуточных либо конечных соединений, участвующих в регуляции метаболизма или клеточном ответе на стрессовые условия среды; образовывать биополимеры как молекулы для хранения углерода; ассимилировать  $\text{CH}_4$  в качестве строительного материала клеточных компонентов [4].

Наибольшее распространение в биотехнологии метанотрофные бактерии получили в качестве источника микробного белка (белка одноклеточных организмов, SCP), полигидроксиалканоатов (ПГА), полисахаридов (включая экзополисахариды), липидов, эктоина, метанобактина, а также метанола и ряда других соединений [6, 139].

### **1.3.1. Метанотрофы как источники белка**

Использование метанотрофов в качестве продуцента белка изучалось ещё с 1960-х годов. И хотя были запущены процессы получения SCP в промышленном масштабе, их широкое коммерческое производство было прекращено ввиду ряда экономических ограничений, которые преимущественно связывали с ростом цен на нефть и низкой стоимостью классических источников белка [140-141]. Тем не менее, с растущей потребностью в доступных источниках высокобелкового сырья, вызванного изменением модели потребления продуктов питания и текущей нагрузкой на животноводство и молочное производство, применение метанотрофов в качестве продуцента SCP вновь становится актуальной биотехнологической задачей. Применение МОБ как компонента кормов для ряда сельскохозяйственных животных становится общепризнанным вариантом решения возникшей проблемы дефицита белковых веществ [16]. В настоящее время белок одноклеточных организмов производится из подготовленного метана или богатого  $\text{CH}_4$  природного газа, а иные метаносодержащие источники, такие как различные потоки твердых и жидких отходов, рассматриваются в качестве возможной альтернативы [142-143].

Производство белка из метанотрофов имеет значительные экологические преимущества перед традиционными источниками благодаря кратно меньшим потребностям в воде и площадях производства, а также отсутствием выбросов парниковых газов в атмосферу и независимостью от ограничений, накладываемых климатическими условиями [144-145]. На сегодняшний день успешно производится высокобелковые коммерческие продукты из биомассы метанотрофов FeedKind® и Unibio® с производительностью, достигающей 4 кг/(м<sup>3</sup>·ч). Также сообщалось о подходах, позволяющих достичь почти 100 % эффективности использования метана и аммиака в ходе получения микробного белка метанотрофов с наибольшим выходом по метану, равным 1,36 грамм биомассы на грамм СН<sub>4</sub> [143, 146]. Бактериальная биомасса характеризуется высоким содержанием белка (до 80% от сухой массы), богата витаминами группы В, минералами и незаменимыми жирными кислотами, что выгодно отличает её от грибных и дрожжевых аналогов [145, 147].

Установлено, что аминокислотный профиль продуктов на основе метанооксиляющих бактерий является более предпочтительным по сравнению с профилем соевой муки и сопоставим с рыбной мукой. Известны успешные случаи частичной замены традиционных источников белка на продукты из метанооксиляющих микроорганизмов. Замена рыбной муки на 4-50 % бактериальным белком в кормах для различных видов рыб (атлантический лосось, большеротый окунь, японский желтохвост, черноморский лещ) и креветок (тихоокеанская белая креветка) показала положительное влияние на выживаемость, рост и усвояемость [148-150]. Включение до 22 % белка метанотрофов в рацион поросят и бройлерных цыплят не оказывало негативного эффекта на прирост массы, а в некоторых случаях способствовало укреплению иммунной системы и улучшению микрофлоры кишечника [141; 151]. Вопрос использования SCP метанотрофов в питании человека остается открытым, однако высокая усвояемость и экономическая привлекательность продукта открывают широкие перспективы в данном направлении [152].

Стоит отметить, что большинство исследований по производству SCP из МОБ посвящены сообществам, в которых доминировал метанотроф *Methylococcus*

*capsulatus* [153]. В промышленных масштабах (в случае FeedKind®) данный микроорганизм культивируют без обеспечения асептики совместно с неметанотрофными бактериями-спутниками [154]. Потенциал применения других штаммов в данной области изучен значительно хуже. Тем не менее, в отдельных статьях сообщалось о выращивании ацидофильной *Methylocapsa acidiphila* на биогазе, а также смешанной культурой на основе родов *Methylomonas* и *Methylophilus* для получения биомассы, обладающей высокой долей белка [155-156]. Также примечательна возможность объединения метанооксиляющих бактерий с серооксиляющими бактериями (СОБ) для обеспечения наиболее полного использования богатого сульфидом биогаза в целях производства микробного белка. Так, обогащённая в соответствующих селективных условиях культура, содержащая рода *Methylocystis* вместе с СОБ, преимущественно представленного родом *Chryseobacterium*, продемонстрировала многообещающие результаты с точки зрения как выхода биомассы, так и содержания в ней белка [143, 157].

Основными проблемами широкого внедрения высокобелковой биомассы метанотрофов остаются относительно высокое содержание нуклеиновых кислот (8-12 % от АСВ), требующее дополнительной очистки продукта, риск контаминации при нестерильном культивировании, что может привести к наличию в продукте эндо- и микотоксинов, а также необходимость обеспечения эффективного массопереноса метана, растворимость которого в воде составляет около 20 мг СН<sub>4</sub>/л [158-160].

### **1.3.2. Метанотрофы как источники полигидроксиалканоатов**

Синтетические пластики, несмотря на их повсеместное использование, потенциально несут в себе значительную экологическую угрозу из-за своей небиоразлагаемой природы. Полигидроксиалканоаты привлекли внимание исследователей как перспективные биополимеры, способные заменить традиционные химические полимеры на основе продуктов нефтехимической отрасли [161]. Данные соединения представляют собой группу линейных полиэфиров со степенью полимеризации до 30 тысяч единиц, включающую около 100 различных

мономеров – производных гидроксисалкановой кислоты, которые могут накапливаться в клетках микроорганизмов в виде гидрофобных включений и составлять значимую часть от их массы [4, 162]. Эти полимеры разлагаются на воду и углекислый газ в условиях окружающей среды в течение короткого промежутка времени, что делает их более экологичными и безопасными по сравнению с искусственными аналогами [163]. Поли-3-гидроксибутират (ПГБ), один из наиболее изученных представителей ПГА, может быть использован в качестве эффективного заменителя традиционных пластиков, таких как полипропилен и полиэтилен благодаря сходству механических свойств [164-165]. Возможные области применения ПГА зависят от конкретных свойств производимого полиэфира и включают, но не ограничиваются производством упаковочных материалов, медициной, фармацевтикой, а также сельским хозяйством [166].

Было установлено, что ряд МОБ способен синтезировать ПГА, а именно ПГБ, при определённом дисбалансе питательных веществ в среде [167]. Применение метанотрофных бактерий, особенно при их выращивании на метаногенных субстратах, например, органических отходах, способно решить главную проблему, затрудняющую коммерческое применение ПГБ, которой является высокая стоимость производства при использовании дорогостоящих углеводов [168]. В ходе первичной оценки некоторые группы метанооксиляющих бактерий продуцировали от 9 до 44 % ПГБ от всей массы клетки, в то время как после оптимизаций условий процесса доля полимера может превышать 50 %, а в теории достигать до 80 % от АСВ [169-170].

Штамм *Methylocystis parvus* ОВВР показал высокие темпы накопления ПГБ (32 % от АСВ) при культивировании в эмульсиях, а оптимизация процесса биосинтеза полимера по источнику и доли азота и углерода в среде для *Methylosinus trichosporium* ОВЗб способствовала содержанию целевой молекулы в количестве более 50 % от сухого веса клетки [171-172]. В литературе имеются упоминания о возможности внедрения *Methylocystis hirsuta* для синтеза ПГБ. В промышленных масштабах на вертикальном трубчатом петлевом биореакторе с принудительной подачей жидкости возможно получение микробной биомассы, на 51,6 % состоящей из производного полигидроксисалканоата [173].

Механизм образования ПГБ в клетках метанотрофов был подробно исследован [174]. Дефицит минерального азота при отсутствии лимитирования по углероду и кислороду является одним из наиболее распространенных способов вызвать интенсивное накопление ПГБ в клетках МОБ [175]. Существуют исследования, указывающие на влияние концентрации  $N_2$  в газовой фазе из-за способности к фиксации молекулярного азота рядом метанотрофов [176]. В других работах указывалась важность контроля концентрации фосфора, меди, доли  $O_2$  и  $CH_4$  в газовой смеси, фазы роста культуры, значения pH и температуры [177-178]. Также сообщалось, что наличие в качестве косубстрата таких соединений, как соли валерата и пропионата, ведёт к значимому повышению уровня синтеза биополимера метанооксиляющими бактериями [168].

Метаболический путь биосинтеза ПГБ обусловлен экспрессией генов оперона *phaCAB* [39]. Фермент  $\beta$ -кетотиолаза способствует конденсации двух молекул ацетил-КоА с образованием ацетоацетил-КоА [55]. На следующем этапе ацетоацетил-КоА-редуктаза восстанавливает ацетоацетил-КоА до мономера (R)-3-гидроксибутирил-КоА, после чего ПГБ-синтаза катализирует образование стабильного полимера. При условиях, благоприятствующих накоплению метанотрофной биомассы, катаболизм ПГБ осуществляется соответствующими полимеразми [165].

Традиционно считается, что способность накапливать ПГБ в качестве запасющего вещества свойственна только метанотрофам, ассимилирующим формальдегид через сериновый цикл и отнесенным к типу II. На сегодняшний день воспроизводимые результаты по производству ПГБ были зафиксированы при использовании МОБ родов *Methylocystis* и *Methylosinus* (тип IIa) [63, 102, 179]. В ряде источников упоминается способность МОБ I типа аккумулировать ПГБ, однако эти сообщения противоречивы, поскольку у метанотрофов I типа отсутствует ключевой ген *phaC* [63].

Поскольку чистые метанотрофные культуры не позволяют достичь максимальных значений по накоплению полигидроксибутирата, которые демонстрируют бактерии других групп, актуальной задачей является повышение коммерческой привлекательности процесса, проводимого на метансодержащем

сырье на основе метанооксиляющих сообществ. На сегодняшний день большинство исследований в данной области сосредоточено на изучении свойств ПГА, синтезированных метанотрофами, оптимизации процессов культивирования, а также расширении перечня известных МОБ, склонных к повышенному содержанию данного биополимера в клетках [180].

### 1.3.3. Метанотрофы как источники экзополисахаридов

Бактериальные внеклеточные экзополисахариды (ЭПС) представляют собой широкую группу молекул, которые могут быть образованы либо гомополисахаридами, либо гетерополисахаридами в сочетании с веществами белковой и липидной природы [174]. Установлено, что ЭПС метанотрофов р. *Methylomonas* преимущественно состоят из глюкозы, маннозы и галактозы в соотношении 1:2:1 [181]. Клетки бактерий секретируют данные соединения в окружающую среду в ходе метаболизма углерода, для обеспечения адгезии или в ответ на стрессовые условия, такие как дефицит субстрата, неоптимальная температура, рН и осмотическое давление, наличие в среде антибиотиков, тяжелых металлов и окислителей [181-182]. Применение ЭПС обусловлено их уникальными адгезивными и коллоидными свойствами в совокупности со способностью к биодegradации и касается в основном нефтяной, текстильной и пищевой промышленности, а также медицины [183-185].

Способность к синтезу экзополисахаридов обнаружена у многих метанотрофов, при этом установлено, что бактерии, использующие рибулозомонофосфатный путь (тип I), продуцируют больше ЭПС на единицу субстрата по сравнению с МОБ серинового пути, что рассматривается как альтернативный механизм утилизации углерода в условиях ограничения по азоту либо как способ защиты от токсичного действия формальдегида [186-187]. Темпы образования ЭПС также зависят от соотношения метана и кислорода в газовой фазе, достигая максимума при высоких концентрациях O<sub>2</sub> и снижаясь при падении его доли до 10 % [188]. Отдельный интерес для исследователей представляют

экстремофильные метанотрофные культуры, для которых синтез ЭПС является жизненно важным механизмом защиты от воздействия неблагоприятных условий окружающей среды [189]. Экстремофильные МОБ способны вырабатывать значительные количества экзополисахаридов для образования плёнок, предупреждающих высыхание клеток и позволяющих существовать в условиях повышенной солёности. Недавние исследования показали, что метанооксиляющее сообщество, содержащее как метанотрофные (р. *Methylomicroobium*), так и неметанотрофные микроорганизмы в условиях высокой солёности и рН накапливает в среде до 2,6 г ЭПС/л [190].

Несмотря на перспективность применения метанотрофных бактерий в качестве продуцента МОБ, данная тема всё ещё плохо изучена и требует дальнейшего углубления знаний о биосинтетических механизмах получения данного ценного биополимера.

#### 1.3.4. Метанотрофы как источники липидов

Метанооксиляющие бактерии могут рассматриваться как потенциальный источник липидов ввиду их значительного содержания в развитой фосфолипидной мембране, образованной фосфатидилглицеринами, фосфатидилэтаноламинами и их производными [4]. При этом МОБ, отнесённые к гаммапротеобактериям, преимущественно содержат жирные кислоты  $C_{16:1}$ , а альфапротеобактерии –  $C_{18:1}$ . Жирные кислоты и глицеролипиды, образующиеся в клетках из ацетил-КоА во время роста на метане, могут быть использованы как исходное сырьё для получения биодизеля, являющегося экологичной альтернативой ископаемым ресурсам [191]. Наиболее подходящими для данной цели следует рассматривать МОБ, склонные к значительному синтезу рММО, поскольку количество этого мембраноассоциированного фермента непосредственно связано с площадью поверхности интроплазматической мембраны. Следовательно, метанотрофы I типа, использующие RuMP-цикл, являются более предпочтительными продуцентами [4, 142]. Увеличения содержания липидов в МОБ можно добиться созданием

стрессовых условий роста, например, ограничения доступа к азоту при высоком содержании метана [192]. Повышение концентрации ионов меди в среде также способствует перестройке метаболизма в сторону более интенсивного образования клеточной мембраны [193].

Наиболее изученным представителем, имеющим потенциал для получения липидов, является *Methylomicrobium buryatense*. Данный галотолерантный микроорганизм, содержащий значительное количество липидов от общей массы клетки, является привлекательным продуцентом благодаря устойчивому росту при щелочных значениях рН и высокой концентрации соли, что также предупреждает контаминацию культуры [81]. Применение методов генной инженерии позволило лишь незначительно увеличить содержание липидов, доля которых в клетке не превышала 12 % от абсолютно сухого веса [194-195].

Несмотря на многообещающие результаты, метанотрофные культуры всё ещё уступают иным биологическим аналогам (водорослям, дрожжам), содержащим значительно большее количество липидов [139]. Помимо увеличения доли соединения, необходимо также решить технологические трудности, связанные с эффективной экстракцией и очисткой целевых продуктов из биомассы МОБ ввиду их амфифильной природы и склонности образовывать эмульсии [191].

### **1.3.5. Метанотрофы как продуценты метанола**

Метанол в промышленных масштабах производится из природного газа посредством термохимических процессов, требующих больших энергетических затрат. Использование метанмонооксигеназы метанотрофных культур способно повысить эффективность конверсии и снизить потребление энергии при высоком уровне селективности. С учётом того факта, что катализ метана до метанола при помощи очищенной sММО или рММО затруднён из-за нестабильности фермента, его многокомпонентности и потребности в кофакторах, большинство работ на данную тему сосредоточены на внедрении живых микроорганизмов [196].

Основной задачей, которую необходимо решить для получения метанола при помощи МОБ, предстаёт снижение активности кальцийзависимой метанолдегидрогеназы, не позволяющей целевому соединению содержаться в клетках в высокой концентрации [197]. Чаще всего с данной целью в ростовую среду добавляют конкурентные ингибиторы МДГ (ЭДТА, фосфат-ионы, хлорид-ионы), а также формиат в качестве донора электронов, что частично компенсирует нарушение энергетического обмена клетки [198-200].

Наиболее эффективными продуцентами показали себя *Methylosinus trichosporium*, *Methylocystis bryophila*, а также представители родов *Methylocaldum* и *Methylacidiphilum*, способные достигать высокой конверсии метана в метанол (часто превышающей 60 %) при использовании ингибиторов и доноров электронов [201-202]. Значительно увеличить продуктивность позволяет иммобилизация клеток на различных носителях, включая наночастицы, что дает возможность использовать культуры в течение нескольких циклов производства [203]. Также отмечен потенциал смешанных метанотрофных сообществ и совместного культивирования нескольких продуцентов, что в сочетании с иммобилизацией позволяет существенно повысить накопление метанола в культуральной жидкости [204].

Хотя применение метанотрофов для производства метанола кажется многообещающим на основе данных лабораторных исследований, их промышленное применение на данном этапе маловероятно из-за относительно низкой производительности и необходимости внесения внешних доноров электронов в ходе ингибирования МДГ, что отрицательно влияет на осуществимость крупномасштабных процессов в рамках непрерывного цикла производства [4].

### **1.3.6. Метанотрофы как продуценты эктоина и метанобактина**

Полученные за последнее время данные о метаболических путях и вариантах их перестроения у МОБ в ответ на изменения условий окружающей среды позволили рассматривать данные бактерии в качестве потенциальных продуцентов эктоина и метанобактина [174, 205].

Эктоин и его производное гидроксиэктоин являются циклическими аминокислотами, вырабатываемыми многими галотолерантными бактериями в качестве осмопротекторов [206]. Данные соединения в условиях повышенной солёности среды благодаря своим гидратирующим свойствам выполняют роль стабилизаторов ферментов, нуклеиновых кислот и комплексов ДНК-белок, что делает их ценным компонентом в фармацевтической и косметической промышленности [70, 139]. Синтез эктоина осуществляется через метаболические пути, начинающиеся с ацетил-КоА и аспартата, с участием ключевых ферментов: аминотрансферазы диаминомасляной кислоты, ацетилтрансферазы диаминомасляной кислоты и эктоинсинтазы [208]. Такие метанотрофы, как *Methylobacterium alcaliphilum*, *Methylobacter marinus*, *Methylobacterium kenyense*, продемонстрировали способность к высокому уровню синтеза эктоина в условиях повышенной концентрации соли. Накопленный в клетках эктоин может быть извлечён из биомассы при помощи гипоосмотического шока, что приводит к выведению около 70 % соединения в раствор [6, 208]. Наибольшее содержание данной молекулы в клетках МОБ (8,3 % от АСВ) было достигнуто при использовании штамма *Methylobacterium alcaliphilum*, что, тем не менее, ниже, чем у используемых гетеротрофных бактерий [4]. Дальнейшая оптимизация процесса с учётом влияния дефицита азота, концентрации метана и ионов меди может способствовать более продуктивному получению эктоина из метанотрофных микроорганизмов [209-210].

Метанобактин представляет собой рибосомально-синтезируемый и посттрансляционно модифицированный пептид, который обладает высокой аффинностью к ионам меди [108]. Данное соединение вырабатывается и секретируется некоторыми метанотрофами в условиях дефицита меди, что позволяет им эффективно мобилизовывать этот важный микроэлемент для работы рММО [211-212]. Метанобактины связывают  $\text{Cu}^{2+}$  через специфические гетероциклические структуры, а также тиаמידные группы, которые образуются на предшественнике MbnA, и участвуют в процессе восстановления до  $\text{Cu}^+$  в метанотрофном микроорганизме [213]. Процесс биосинтеза метанобактина включает участие фермента MbnBC, а также дополнительных более видоспецифичных

биокатализаторов, которые обеспечивают стабилизацию структуры пептида [214]. После связывания с медью, метанобактин переносится обратно в клетку МОБ с помощью специализированных транспортеров-белков, называемых MbnTs [215]. Исследования показали, что некоторые метанотрофы, такие как *Methylomicrobium album* (BG8) и представители рода *Methylocystis*, способны транспортировать в свои клетки метанобактин, выделяемый другими метанотрофами, что даёт им конкурентное преимущество перед другими МОБ в условиях низких концентраций меди и метана, а также усиливает их способность разлагать токсичные соединения [213]. Кроме того, метанобактин рассматривается как перспективный кандидат для разработки терапевтических средств при лечении заболеваний, связанных с нарушением метаболизма меди (болезни Вильсона и Альцгеймера), благодаря способности предотвращать образование бляшек, а также для ингибирования онкогенеза ввиду необходимости меди для роста опухолевых клеток [216-217].

### **1.3.7. Метанотрофы в качестве биоремедиаторов токсичных органических веществ и тяжёлых металлов**

Уникальная метаболическая гибкость и широкая субстратная специфичность метанмонооксигеназы метаноокисляющих бактерий позволили рассматривать данную группу микроорганизмов как многообещающую основу для проведения биоремедиации почвенных и водных ресурсов [218-219].

Метанотрофы играют ключевую роль в биоремедиации тяжёлых металлов, влияя на их биодоступность [220]. Одним из наиболее значимых процессов является восстановление высокотоксичного  $\text{Cr}^{6+}$  в менее токсичную форму  $\text{Cr}^{3+}$  благодаря наличию генов, кодирующих хром(VI)-редуктазу. Исследования подтверждают, что метанотрофы (рода *Methylobacter*, *Methylosinus* и *Methylocystis*) вносят вклад в удаление тяжёлых металлов ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) в составе биоплёнок [221]. Кроме того, метанотрофы эффективно обезвреживают ртуть, восстанавливая её до элементарной формы с помощью НАД(Ф)Н-зависимой редуктазы [222]. Ключевую роль в этом

процессе играет метанобактин, связывающий ионы ртути и снижающий их биодоступность, а также участвующий в трансформации метилртути [7, 219].

МОБ способны окислять широкий спектр углеводородов, включая алканы (C<sub>1</sub>–C<sub>8</sub>), алкены, ароматические и галогенированные соединения, чаще задействуя sММО ввиду её более широкой субстратной специфичности [223]. С практической точки зрения особенно важна способность метанотрофов разлагать высокотоксичные галогенированные углеводороды (хлороформ, трихлорэтилен, винилхлорид). Исследования показывают, что добавление метана в аэробные почвы стимулирует разложение трихлорэтилена, подтверждая потенциал метанотрофных сообществ для восстановления загрязнённых сред [222]. Сравнительные исследования показали, что скорость деградации выше у клеток, экспрессирующих sММО, однако при высоких концентрациях загрязнителей метанотрофы с рММО имеют конкурентное преимущество благодаря более высокой скорости роста [218].

При кометаболическом окислении большинства токсичных соединений метанмонооксигеназой не происходит генерации энергии, а продукты не ассимилируются клеткой. Это означает, что для поддержания высокой активности МОБ при биоремедиации *in situ* необходимо добавление субстратов (метан, метанол, формиат), обеспечивающих активный метаболизм культур. При проведении очистных мероприятий *ex situ* в реакторах скорость деградации может быть стимулирована увеличенной подачей метановоздушной смеси [223, 225]. Обеспечение условий для поддержания активности метанотрофов на больших площадях или при низких концентрациях загрязнителей может быть экономически затруднительным [26]. Другой задачей является обеспечение работы предпочтительной для биодеградации sММО, экспрессия которой подавляется медью, широко распространённой в окружающей среде. Возможным путём повышения эффективности процесса является внедрение в процесс местных, адаптированных к окружающей среде МОБ, а также создание специализированных синтетических сообществ, интегрированных с ризосферой [223, 226-227].

### 1.3.8. Метаболическая инженерия метанотрофов и получение иных продуктов

С развитием технологий метаболической инженерии метанотрофы становятся объектом активных исследований для получения продуктов, несвойственных данной группе микроорганизмов [228]. Для повышения эффективности синтеза таких соединений необходимо сочетание глубокого понимания их метаболического потенциала и применения подходящих гетерологичных генов, что может быть достигнуто с помощью разработки геномных моделей [229].

В последние годы метанотрофные бактерии, особенно представители гамма-протеобактерий, привлекли значительное внимание как потенциальные продуценты лактата. Производство лактата из метана представляет собой перспективное направление в биотехнологии, учитывая его широкое применение в производстве биопластиков, а также в пищевой и фармацевтической промышленности [230]. Для *Methylomicrobium buryatense* была осуществлена экспрессия гетерологичного гена лактатдегидрогеназы, что позволило достичь концентрации лактата 0,8 г/л [231]. Значительный прогресс достигнут в работе с *Methylomonas* sp. ДН-1, для которого с помощью адаптивной эволюции и генетических модификаций удалось получить титр лактата, равный 6,17 г/л [232].

Недавние исследования показали, что метанотрофы способны использовать альтернативные пути, такие как глиоксилатный шунт, например, для увеличения уровня синтеза сукцината. На основании данного факта был разработан подход, включающий инженерные стратегии, ориентированные на модификацию метаболических путей и направляющие поток углерода в сторону желаемых продуктов, таких как 1,2-пропандиол и кадаверин. Метанотрофы также могут быть модифицированы для синтеза вторичных метаболитов, включая каротиноиды и изопреноиды, что открывает перспективы для их применения в фармацевтической и пищевой промышленности [233-235].

Для дальнейшего улучшения метаболической продуктивности метанотрофов необходимо преодолеть существующие ограничения, такие как низкий поток

углерода к целевым продуктам и медленная скорость роста. Оптимизация условий культивирования, включающая выбор подходящих биореакторов и методов ферментации, может значительно повысить эффективность производства [229].

### 1.3.9 Метанотрофы как продуценты наночастиц

Использование метанотрофных культур для синтеза наночастиц (НЧ) металлов до сих пор является не до конца изученной темой. Однако, уникальная способность к синтезу метанобактина наряду с восстановлением ионов металлов в ходе энергетических процессов у МОБ открывает широкие перспективы для получения наночастиц из экологичных и доступных источников [7].

Было обнаружено, что метанобактин способен связывать и в некоторых случаях восстанавливать ионы, отличные от меди, за счёт их взаимодействия с лигандами молекулы [236]. Установлено, что одни ионы (Ag(I), Au(III), Hg(II), Cu(II) и Pb(II)) связываются и восстанавливаются при взаимодействии с метанобактином, тогда как другие (Cd(II), Co(II), Fe(III), Mn(II), Ni(II) и Zn(II)) частично связываются без возможности проведения окислительно-восстановительных реакций. Наибольший прогресс в применении метанобактина достигнут при получении наночастиц золота, причём ионы золота и серебра способны вытеснять медь из комплекса с метанобактином, восстанавливаясь до наноразмерных частиц [237]. Установлено, что МБ, синтезированный *Methylosinus trichosporium*, способен связывать и каталитически восстанавливать  $Au^{3+}$  до  $Au^0$  с подачей гидрохинона в среду в качестве донора электронов. Дальнейшие исследования показали, что повышение температуры, изменение pH и концентрации метанобактина в реакционном объёме, а также его вклад в качестве стабилизатора образующихся наночастиц позволяет регулировать процесс синтеза и получать НЧ с целевыми характеристиками даже без внесения дополнительного источника электронов, так как в данной роли выступают молекулы воды [238].

Метанооксиляющие бактерии также продемонстрировали тенденцию к образованию наночастиц селена в ходе восстановления селенита [239]. Данный

процесс был наиболее интенсивен при пониженной концентрации кислорода или в бескислородных условиях при использовании аэробных МОБ. Такие культуры, как *M. trichosporium*, *Methylocystis* sp., *M. capsulatus*, а также метанотрофный консорциум на основе бактерий рода *Methylomonas* зарекомендовали себя как эффективные продуценты наночастиц селена при ограничении доступа к  $O_2$  [7, 240].

Таким образом, метанотрофы демонстрируют невероятную гибкость метаболических путей, что обуславливает их широкое распространение в различных экологических нишах и перспективы применения в качестве продуцента многих биологически активных соединений в ходе экономически выгодных процессов культивирования. С целью повышения эффективности наработки биомассы метанотрофных бактерий, с дальнейшей максимизацией синтеза целевых веществ следует детально рассмотреть влияние различных факторов на рост и метаболизм различных представителей МОБ. Следует учитывать тот факт, что выработка повышенного уровня ряда ценных веществ (ПГБ, экзополисахариды, метанол и т.д.) в клетке происходит в неоптимальных для роста метанотрофов условиях. Из этого следует, что наиболее подходящим будет рассмотрение характеристик роста и состава биомассы чистых и смешанных метанотрофных культур в виде отклика на изменение условий культивирования в рамках двухступенчатого процесса: максимальной наработки биомассы метанооксилирующих бактерий и производства ими целевых соединений.

#### **1.4. Культивирование метанотрофных культур. Влияние состава среды на рост и продуктивность процесса**

Метанооксилирующие бактерии в природных системах обычно занимают незначительную долю от всех населяющих её микроорганизмов. Пониженная доля метана в окружающей среде, иная концентрация питательных веществ и их доступность, а также изменение в составе и распределении по численности участников метанотрофных сообществ указывают на значительные различия в метаболизме, росте и синтезе биологически активных веществ МОБ в естественных

условиях и при направленном обогащении и культивировании [11-12; 241]. Данные факторы необходимо учитывать при разработке эффективных методов получения клеточной суспензии метанотрофов с высокой концентрацией и уровнем синтеза целевых соединений с добавленной стоимостью [156]. Традиционно, культивирование метанотрофов проводят при использовании среды NMS, содержащей нитрат в качестве источника минерального азота. Однако, со временем было обнаружено, что нитрат-ионы не всегда обеспечивают максимальные темпы роста некоторых культур, которые предпочитают ассимилировать ионы аммония или же совсем не растут на данной среде [242]. В дальнейшем был установлен важный вклад содержания меди и железа, а также их соотношения в темпы роста и продуктивности МОБ ввиду участия данных металлов в регуляции активности sММО и рММО [99]. Также было обнаружено, что многие другие компоненты среды имеют решающее значение для эффективного выращивания МОБ. Подбор оптимального источника азота и его концентрации, содержание меди и железа, фосфатов, хлоридов, кальция, магния и ряда микроэлементов, а также факторов роста привело к появлению других, более адаптированных для конкретной культуры сред как в случае стимуляции метанотрофной активности в природных средах, так и в ходе их периодического и непрерывного культивирования [8-10]. Одним из основных препятствий, затрудняющих применение метанотрофных бактерий в биотехнологии, является их относительно медленная скорость роста (не более  $0,4 \text{ ч}^{-1}$ ). Именно по данной причине оптимизация состава ростовой среды и газовой фазы, позволяющая достичь наиболее эффективных показателей культивирования, что наряду с подбором подходящих культур и сообществ МОБ является одним из ключевых факторов в разработке конкурентных биотехнологических процессов [8, 11].

Состав газовой смеси и соотношение её компонентов напрямую определяют ростовые характеристики метанотрофов и их доминирование в сообществе [243]. На практике чаще всего используют метановоздушные смеси с содержанием метана от 20 до 50 % [244]. Для культур с преобладанием *Methylophilus* и *Methylomonas* оптимальным оказалось соотношение  $\text{CH}_4:\text{O}_2 = 40:60$ , тогда как повышение доли кислорода снижало продуктивность культивирования [245]. В целом, в отсутствии

лимитирования по метану, максимальная скорость окисления  $\text{CH}_4$  чистыми культурами метанотрофов I и II типа наблюдалась в диапазоне от 0,45 до 20 объёмных процентов кислорода. Анализ соотношения потребления метана к кислороду для *Methylocystis parvus* и *Methylocystis hirsuta* позволил установить соотношение 1,5 и 1,46 для рассматриваемых культур соответственно [63, 167]. Проведённые исследования, а также стехиометрические расчеты показали, что для обеспечения оптимального роста большинства аэробных метанотрофных микроорганизмов в условиях культивирования молярное соотношение потребления метана и кислорода должно находиться в диапазоне от 1:1,5 до 1:2 [246]. Также соотношение газов в смеси влияет на состав биомассы метанотрофных микроорганизмов. Изменение соотношения  $\text{CH}_4:\text{O}_2$  от 1:3 до 2:1 стимулировало синтез ПГБ, а увеличение доли кислорода с 1,5 до 10,5 % приводило к трёхкратному росту продукции экзополисахаридов метанотрофными микроорганизмами [243, 247]. Присутствие  $\text{CO}_2$  в газовой фазе также имеет большое значение, что особенно выражено для метанотрофов II типа. Повышение парциального давления  $\text{CO}_2$  до 1,6–11,6 кПа заметно увеличивало их численность в сообществе, а рост концентрации  $\text{CO}_2$  на 200 ppm ускорял окисление метана на 43,8 [248]. Влияние доли молекулярного азота в газовой фазе отмечалось при различных уровнях синтеза ПГБ при культивировании *M. trichosporium* OВ3b на метановоздушной и метаноокислородной смеси. Было высказано предположение, что способность фиксировать  $\text{N}_2$  метанотрофами II типа может подавляться высокими концентрациями кислорода в среде, что положительной сказывается на накоплении ПГБ в клетках МОБ и указывает на важность соотношения  $\text{N}_2:\text{O}_2$  при разработке биотехнологических процессов [249]. Исследования продемонстрировали, что для обеспечения эффективной азотофиксации метаноокисляющими бактериями (рода *Methylocystis*, *Methylosinus* и *Methylocella*) парциальное давление кислорода не должно превышать 0,05–0,15 бар. В других работах указывается на полное отсутствие нитрогеназной активности метанотрофных бактерий при 28 % и 10 %  $\text{O}_2$  от состава метановоздушной смеси [165].

Применение биогаза вместо очищенных газовых смесей позволяет существенно снизить затраты, но требует обязательного учёта присутствия

примесей [250-251]. На имитации биогаза рост *M. alcaliphilum*, *M. trichosporium* OV3b и *M. capsulatus* Bath был сопоставим показателями, полученным для метановоздушной смеси при содержании  $\text{CH}_4$  до 30 %, а смешанная культура *M. hirsuta* в реакторе с потоком Тейлора стабильно накапливала до 32 % ПГБ [252-253]. Однако сероводород, неизбежно присутствующий в биогазе, способен сильно ингибировать метанотрофов. Так, при содержании  $\text{H}_2\text{S}$  1000 ppm активность *Methylomonas* sp. заметно снижалась, а при 5000 ppm рост замедлялся на 83 % [245]. Снизить токсическое действие сероводорода можно, культивируя метанотрофные микроорганизмы в ассоциации с сероокисляющими бактериями, и при правильно подобранном соотношении  $\text{CH}_4:\text{O}_2$ , равном 2:3, данные сообщества позволяют нарабатывать биомассу с содержанием белка до 73 % от АСВ [254].

Помимо метана, некоторые метанотрофы способны использовать в качестве субстрата метанол, формиат и другие  $\text{C}_1$ -соединения, что расширяет возможности управления их метаболизмом и получения продуктов с добавленной стоимостью. Небольшие добавки метанола (10-20 ммоль/л) стимулируют метаноокисляющую активность, особенно у представителей I типа, хотя при более высоких концентрациях фиксировали выраженный ингибирующий эффект [255]. Совместное применение метана и метанола в мольном соотношении 3:7 обеспечило максимальный выход ПГБ у *M. trichosporium* OV3b [172]. Некоторые штаммы, например *Methylocombium buryatense* 5GB1, растут на метаноле с той же скоростью, что в случае применения  $\text{CH}_4$ , что повышает их технологичность для ряда биотехнологических процессов [256]. Такие косубстраты, как соли цитрата и пропионата, способны повышать накопление полигидроксиалканоатов до 88 % у *Methylobacterium organophilum*, а часть метанотрофов, включая *M. capsulatus*, способна ассимилировать до 10 % углерода из  $\text{CO}_2$  благодаря работе рибулозобисфосфаткарбоксилазы [82, 257].

Выбор источника азота и его концентрации представляет собой один из наиболее важных факторов, определяющих продуктивность метанотрофных культур. Метанотрофы значительно различаются по своей способности усваивать нитрат, аммоний или молекулярный азот, а также по устойчивости к токсичным промежуточным продуктам метаболизма этих соединений [258-259]. Для

большинства культур оптимальные концентрации ионов нитрата и аммония лежат в диапазоне 1–20 ммоль/л, хотя некоторые штаммы I типа нуждаются в более высоком содержании азотсодержащих компонентов в среде для достижения максимальной скорости роста, что также указывает на выраженное видоспецифичное влияние данного параметра [260]. На примере *Methylosinus sporium* было показано, что токсичные концентрации  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{NH}_4^+$  составляют 71 и 142 ммоль/л соответственно [258]. Метанооксиляющие консорциумы с доминированием метанотрофов II типа демонстрируют на 15–40 % более высокие скорости роста на нитрате, чем в присутствии ионов аммония, в то время как представители *Methylomonas* sp. сходным образом растут на обоих источниках неорганического азота [206, 261]. Аммонийные соли часто оказываются предпочтительнее для родов *Methylocystis* и *Methylosinus* при росте на метане, однако в случае *M. hirsuta* максимальная скорость роста достигалась именно на нитрате, хотя эффективность потребления метана в пересчёте на грамм биомассы была выше на аммонийном азоте [167, 262]. Таким образом при выборе концентрации и формы азота в ходе культивирования метанотрофов необходимо учитывать множество факторов, как напрямую, так и опосредованно влияющих на рост и продуктивность отдельно взятого штамма или метанооксиляющего сообщества.

Соотношение углерода и азота в среде является одним из ключевых параметров, определяющих направленность метаболических потоков в клетках метанотрофов. Этот показатель непосредственно регулирует баланс между процессами роста и накопления биологически активных веществ, что может иметь решающее значение при разработке технологий получения как белковой биомассы, так и полигидроксиалканоатов [263–264]. В природных экосистемах наибольшая метанооксиляющая активность обычно наблюдается при C:N около 15:1, однако в лабораторных и промышленных условиях оптимальные значения могут существенно изменяться в зависимости от культивируемого штамма и поставленных задач. Для метанотрофов II типа, использующих сериновый путь ассимиляции, характерна способность эффективно накапливать ПГБ при повышенных значениях C:N. Так, для *Methylosinus trichosporium* ОВ3б было показано, что наивысшая продуктивность по биомассе достигается в диапазоне C:N от 36 до 40, тогда как максимальный синтез полигидроксибутирата

наблюдается при увеличении этого соотношения до 60 [172]. Примечательно, что в том же исследовании отмечалась чёткая зависимость накопления ПГБ от источника азота при фиксированном C:N, что указывает на сложный характер взаимодействия этих факторов. Сходные закономерности были установлены и для *Methylocystis* sp. Rockwell, где оптимум роста на среде с аммонийным источником азота соответствовал C:N = 45,5, а прогнозируемый максимум накопления ПГБ приходился на соотношение C:N, равное 62,5 при использовании как нитрата, так и аммония [176]. Для метанотрофов I типа, как правило, характерны более низкие оптимальные значения C:N. При культивировании обогащённых сообществ с преобладанием таких микроорганизмов наилучшие показатели роста были зафиксированы в диапазоне C:N от 3,9 до 7,9 при использовании нитрата в качестве источника азота [260]. Приведённые данные демонстрируют, что выбор оптимального соотношения C:N неразрывно связан с видовой принадлежностью метанотрофной культуры, а также с тем, какой именно продукт является целевым в данном биотехнологическом процессе. Для получения высокобелковой биомассы предпочтительны более низкие значения соотношения углерода к азоту, обеспечивающие интенсивный рост, тогда как для накопления ПГБ требуется создание условий с относительным избытком углерода по сравнению с азотом. Это обстоятельство необходимо учитывать при разработке как периодических, так и непрерывных процессов культивирования, особенно при переходе к двухстадийным схемам, разделяющим фазы роста и накопления целевого продукта.

Концентрация и соотношение меди и железа имеют критическое значение для активности метанмонооксигеназы и, как следствие, для роста и продуктивности метанотрофов. Данные ионы входят в состав активных центров рММО и sММО, а их содержание средах, используемых для периодического культивирования, обычно варьируется в диапазоне от 0,1 до 0,9 мкмоль/л для  $\text{Cu}^{2+}$  и от 0,75 до 18,5 мкмоль/л для  $\text{Fe}^{2+}$  [265]. Для *M. capsulatus* максимальное содержание рММО, достигавшее 80 % от общего количества белка, было отмечено при 30 мкмоль  $\text{Cu}^{2+}$ /л, а для *M. trichosporium* ОВ3b оптимум приходился на 2 мкмоль  $\text{Cu}^{2+}$ /л [266]. Чувствительность к меди проявляет ярко выраженную видовую специфичность. Например, для рода *Methylomonas* оптимум лежит в

достаточно узком диапазоне от 2 до 10 мкмоль  $\text{Cu}^{2+}/\text{л}$  [10]. Для *M. trichosporium* рост стимулируется при концентрациях 5-15 мкмоль/л, но заметно подавляется при 30 мкмоль/л, что сопровождается падением активности ММО на 35 % [100]. При этом высокая концентрация меди в сочетании с предварительным выращиванием на нитратной среде способствовала накоплению ПГБ, что подтверждается и для смешанных сообществ с доминированием рода *Methylosinus* [247, 267]. Для *Methylocystis* sp. оптимум роста наблюдали при концентрации ионов меди около 15 мкмоль  $\text{Cu}^{2+}/\text{л}$ , в то время как максимальный выход при направленном получении метанола равнялся 2,5 мкмоль  $\text{Cu}^{2+}/\text{л}$  [201, 268]. Увеличение доли железа при непрерывном культивировании повышало численность представителей рода *Methylosinus* в сообществе, а в природных образцах дополнительное внесение железа способствовало доминированию *Methylocystis* sp. [169, 269].

Магний и кальций относятся к числу необходимых компонентов питательных сред, а их концентрация, обеспечивающая оптимальные условия роста, требует тщательной оптимизации.  $\text{Mg}^{2+}$  участвует во множестве ферментативных реакций и обычно содержится в средах в количествах от 0,04 до 4,1 ммоль/л [117]. Установлено, что при культивировании *M. parvus* ОВВР именно магний выступал в роли лимитирующего фактора вплоть до достижения концентрации около 50 мкмоль/л [270]. Ограничение по магнию в сочетании с отсутствием минерального источника азота способствует накоплению ПГБ с высокой молекулярной массой [165-166]. Высокие концентрации ионов магния, напротив, стимулируют синтез эктоина, выход которого может достигать 94,2 мг/г АСВ, а также экзополисахаридов, накапливающихся в культуральной жидкости в количестве до 2,6 г/л [177, 271]. При концентрации 50 ммоль/л  $\text{Mg}^{2+}$  наблюдается ингибирование метанолдегидрогеназы, что может быть использовано для направленного сверхсинтеза метанола клетками МОБ [204]. Кальций, обычно вносимый в количестве 0,045-0,9 ммоль  $\text{Ca}^{2+}/\text{л}$ , необходим для работы метанолдегидрогеназы типа МхaF, обеспечивая правильную конформацию её активного центра [58, 117]. Увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  с 0,04 до 0,16 ммоль/л повышало плотность суспензии *Methylocystis* более чем на 10 %, в то время как

снижение концентрации данного иона до 7,2 мкмоль/л приводило к максимальному выходу ПГБ у *M. parvus* ОВВР [270, 272].

Прочие компоненты питательных сред также вносят свой вклад в регуляцию роста и метаболизма метанотрофов. Высокие концентрации калия в рамках мешанного сообщества способствуют преимущественному развитию метанотрофов I типа, особенно представителей рода *Methylobionas*, что наиболее выражено при использовании нитрата в качестве источника азота [273]. Кобальт в концентрациях 1,35-6,30 мкмоль/л влияет на накопление этил- и метилмалонил-КоА у бактерий, использующих глиоксилатный путь, что может иметь значение при получении целевых соединений. Молибден и вольфрам присутствуют в средах прежде всего для обеспечения работы формиатдегидрогеназы и, следовательно, для регуляции энергетического метаболизма через основной путь окисления метана и фиксацию  $\text{CO}_2$  [66]. Никель в диапазоне 0,015-0,15 мкмоль/л, марганец около 0,15 мкмоль/л и цинк 0,1-1 мкмоль/л поддерживают каталитическую активность ключевых ферментов [117]. Фосфатный буфер в концентрации более 2 ммоль/л предотвращает сильное закисление среды, неизбежно возникающее при окислении аммония и образовании  $\text{CO}_2$ . Ионы натрия и хлора при высоких концентрациях вызывают солевой стресс, который проявляется в виде специфического клеточного ответа. Альфапротеобактериальные метанотрофы, в основном, менее толерантны к солевому стрессу по сравнению с гаммапротеобактериями, хотя среди последних чувствительность может существенно изменяться от рода к роду [274-275]. В условиях повышенной солёности происходит перестройка метаболических путей, направленная на синтез осмопротекторов, таких как эктоин, а также изменяться общий аминокислотный профиль получаемой биомассы метанотрофов [276]. Галотолерантные метанотрофы I типа, обладающие характерным для этой группы строением мембран, при концентрации  $\text{NaCl}$  2 % образуют значительное количество экзополисахаридов [277]. Добавление витаминов, включающих биотин, рибофлавин, никотинамид, витамин B12 и другие соединения, может быть

необходимо для обеспечения оптимального роста, особенно при культивировании чистых метанотрофных культур [117, 278].

Таким образом, вклад содержания различных компонентов ростовых сред при культивировании метанотрофных микроорганизмов оценён достаточно подробно лишь для небольшого набора наиболее распространённых в биотехнологии МОБ, в то время как для большинства представителей установлены только средние оптимальные концентрации питательных веществ.

### **1.5. Метанотрофные сообщества**

Метанооксиляющие микроорганизмы в природных средах, как и другие бактерии, не существуют изолированно, а вступают в сложные многоуровневые взаимодействия с другими участниками экосистемы, что подтверждается трудоёмкостью и длительностью процесса выделения чистых метанотрофных культур [227]. Принципиально важно, что многие метанотрофы без создания специфичных условий практически неспособны расти отдельно от микроорганизмов, вступающих с ними в энергетический обмен. По данной причине количество культивируемых метанотрофов значительно ниже по сравнению с некультивируемыми [131]. При этом сам вынесенный за пределы одного микроорганизма метанооксиляющий интерактом можно рассматривать в качестве генетически модифицированного или сконструированного штамма, но с более высокой стабильностью [11]. Анализ сетей взаимодействия позволил установить определённые закономерности в формировании метанотрофных сообществ в контексте распространения тех или иных гетеротрофов в зависимости от таксономической принадлежности МОБ [27]. Детальное изучение взаимодействия бактерий в рамках сообществ открывает широкие перспективы их применения, которое может быть более экономически выгодным и производительным по сравнению с чистыми культурами [39, 279].

### 1.5.1. Получение обогащённых метанотрофных сообществ и выделение чистых культур

Ввиду низкого содержания МОБ в природных средах, обычно не превышающего 4 % от общего содержания бактерий, для их целесообразного использования, а также дальнейшего выделения применяется ряд методов обогащения. Итогом подобного подхода является получение консорциумов, в которых МОБ являются системообразующими микроорганизмами, а неметанотрофные участники сосуществуют с основной культурой за счёт устойчивых трофических связей и зависят от метаболизма окисляющих метан бактерий [280].

Процесс обогащения проводится посредством помещения природных сообществ в селективные условия, максимально способствующие росту метанотрофных микроорганизмов, в результате чего их доля в составе сообщества значительно возрастает [227]. Традиционно минеральный состав сред для получения накопительной культуры, особенно на первых этапах процесса, должен быть приближен к составу природного источника, откуда был отобран образец [265]. Увеличить относительное количество большинства нейтрофильных метанотрофов позволяет применение минеральных сред NMS и AMS или их более разбавленных аналогов с добавлением метана в качестве единственного источника органического углерода в количестве от 20 до 50 % от объёма газовой фазы, что будет являться основной движущей силой процесса обогащения [117, 278]. Соответственно, для получения накопительных культур МОБ, относящихся к галофильным, ацидо- и алкалофильным, а также психро- и термофильным представителям, применяют иные условия, являющиеся оптимальными для данных групп [265]. В случае необходимости увеличения численности определённой группы метанотрофов, например способных к фиксации азота или обладающих ферментом sMMO, условия культивирования могут быть соответствующим образом изменены посредством удаления или добавления компонентов сред, затрагивающих непосредственно данные особенности метаболизма целевых организмов [34, 63]. Получение накопительной культуры может быть осуществлено не только в периодических, но

и в непрерывных условиях в проточном реакторе, что позволяет значительно ускорить процедуру, а также селективно отбирать быстрорастущие штаммы, регулируя скорость протока [218, 242]. Также процесс обогащения может быть совмещён с методами адаптивной лабораторной эволюции, благодаря которым посредством индукции постепенных адаптивных изменений происходит перестроение метаболических путей в клетках МОБ для соответствия целям дальнейшего промышленного применения. Так, помимо более интенсивного роста метанотрофов, обогащение может быть приспособлено для получения смешанных культур, способных более эффективно поглощать метан и деградировать органические загрязняющие вещества, синтезировать повышенные количества биополимеров и эктоина, а также обладать необходимым температурным оптимумом [170, 281-282]. Получению специфических накопительных культур может способствовать постепенное создание неоптимальных условий роста, например солевого стресса, пониженных или повышенных значений pH и температуры или высокой концентрации ионов аммония в среде, что приводит к упрощению сообщества и образованию внутри него тесно связанных кластеров сети совместного взаимодействия, способствующих смягчению отрицательного влияния на каждый из микроорганизмов. Данный подход позволяет удалить в ходе обогащения слабо связанные члены сообщества, оставив только тесно взаимодействующие с МОБ бактерии [27, 259].

С целью дальнейшей изоляции и получения чистых культур МОБ обычно применяются методы высева суспензии накопительной культуры на агаризованные и иные твёрдые среды идентичного или отличного от стадии обогащения состава с дальнейшим отбором индивидуальных колоний или же посредством серии предельных разведений с многократным последовательным пересевом суспензии, полученной из максимального разбавления, в котором наблюдался рост метанотрофов [117, 265]. Указанные техники могут быть совмещены и применяться поочерёдно ввиду низкой скорости роста метанотрофных микроорганизмов и невозможности поддержания и эффективного роста на твёрдых питательных средах значительной доли метанооксиляющих штаммов.

### 1.5.2. Роль неметанотрофных микроорганизмов в метанотрофных сообществах

Метанотрофные микроорганизмы в процессе жизнедеятельности и лизиса выделяют в окружающую среду ряд соединений, включая метанол, формальдегид, ацетат и формиат, что наиболее выражено при несбалансированности метаболизма, например при росте на метаноле [256]. Данные соединения при высокой концентрации могут значительно подавлять рост метанооксиляющих бактерий и снижать эффективность культивирования. Установлено, что в метанотрофных сообществах многие гетеротрофные спутники способны потреблять токсичные метаболиты, тем самым повышая метанотрофную активность и обеспечивая стабильность процесса [218]. При этом наличие тех или иных неметанотрофов в накопительных культурах определяется в первую очередь наличием определённых МОБ и особенностей их метаболических путей, а не наоборот [14]. Также обнаружено, что разнообразие гетеротрофных микроорганизмов стимулирует рост самих МОБ за счёт выделения необходимых питательных веществ, которые метанотрофная культура не способна вырабатывать самостоятельно в достаточном количестве [283]. Так, бактерии рода *Rhizobium* синтезируют и выделяют в культуральную жидкость кобаламин, что способствует росту и более интенсивному окислению метана клетками различных метанооксиляющих бактерий [284]. Добавление в ростовую среду супернатанта из исходного метанооксиляющего консорциума при росте чистой культуры *M. methanica* способствовало увеличению скорости потребления метана и выделению метанола клетками МОБ, что также указывает на явление перекрёстного питания с метилотрофами, которое регулируется наличием гетеротрофов и выработкой ими соответствующих метаболитов [204]. Метанолоксиляющие бактерии в данном контексте особенно примечательны ввиду образования с метанотрофными микроорганизмами общих путей усвоения и обмена продуктов окисления C<sub>1</sub>-соединений и веществ цикла трикарбоновых кислот, а также формирования согласованных ответов на изменения условий среды [285].

Роль некоторых неметанотрофных спутников в ходе культивирования была установлена для непрерывной смешанной культуры *Methylococcus* sp. Concept-8. Так, бактерии рода *Azospirillum* продемонстрировали способность использовать метанол и ряд органических кислот в качестве субстрата, а р. *Thermomonas* и р. *Brevibacillus* усваивали ацетат и аминокислоты, образующиеся в ходе лизиса МОБ. Сходные функции удаления метаболитов метанотрофов выполняют *Brevibacillus agri* и представитель рода *Ralstonia*, тесно связанные со штаммом *Methylococcus capsulatus* Bath [286]. Стоит упомянуть исследование по совместному выращиванию до четырёх различных метанотрофных штаммов, по результатам которого авторы указывают на нейтральное либо положительное влияние метанотрофного разнообразия на потребление метана без обнаружения явного конкурентного характера взаимодействия [120].

### 1.5.3. Состав обогащённых метанотрофных сообществ

Исследование состава природных метанотрофных сообществ и накопительных культур способно помочь в установлении функций отдельно взятых участников анализируемых систем и прогнозировании возможных откликов на изменение условий культивирования [281]. Наиболее распространённые спутники МОБ в обогащённых синтрофных консорциумах можно разделить на три различных типа: потребляющие метанол, метаболизирующие малые органические молекулы и разрушающие синтезированные метанотрофами экзополимеры [287]. Анализ взаимодействия бактерий в сообществах обнаружил неравнозначную доступность вышеуказанных веществ для различных групп гетеротрофов в силу межвидовой конкуренции, в результате которой в ходе обогащения сообщества остаётся лишь ограниченное количество неметанотрофных культур, потребляющих те или иные продукты жизнедеятельности метанотрофов и имеющих соответствующие механизмы, дающие преимущества в ходе адаптации. Так, метилотрофы семейства *Methylophilaceae* конкурентно вытесняли других потребителей метанола в

культурах, богатых бактериями *Methylococcaceae*, а грамположительные потребители органических кислот в отличие от грамотрицательных родов *Pseudomonas*, *Janthinobacterium* и *Flavobacterium* зачастую исчезали из накопительных культур с течением времени [288-289]. Отмечено, что сообщества, сформированные вокруг МОБ I типа, характеризуются более высокими темпами роста и эффективностью окисления метана по сравнению с метанотрофами II типа, которые более устойчивы к изменениям параметров культивирования и отличаются повышенным видовым разнообразием [290]. Например, в процессе направленного обогащения образцов активного ила метанотрофами II типа содержание р. *Methylocystis* составило 26,1 %, а основную часть консорциума составляли рода *Sphingomonas*, *Methylophilus*, *Dyella*, *Rhodobacter*, *Humibacter*, *Acidisoma* и *Leifsonia* [291]. В ходе получения быстрорастущего обогащённого термофильного сообщества доминирующей культурой (около 60 % от общего количества клеток) был р. *Methylomonas*, тогда как неметанотрофные спутники относились к родам *Cloacibacterium*, *Hydrogenophaga*, *Methyloversatilis* и *Novosphingobium* [282]. Предполагается, что представители *Burkholderiales* обладают развитым глиоксилатным шунтом, что позволяет им использовать ацетат и потенциально другие продукты метаболизма МОБ, в то время как микроорганизмы, относимые к *Bacteroidetes*, вероятно, деградируют и потребляют различные полимерные вещества, выделяемые метанотрофами [292]. По итогам работы, рассматривающей отклик накопительной культуры с МОБ на различные соотношения метана к кислороду, состав сообщества менялся незначительно, а среди сопутствующих бактерий были распространены *Chryseobacterium*, *Pseudoxanthomonas*, *Hyphomicrobium* и *Flavobacterium*. Отношение ионов  $\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$  также показало значимость в регулировании состава обогащённого сообщества: низкое соотношение 5:5 мкмоль/л стимулировало изобилие р. *Chryseobacterium*, тогда как вследствие увеличения содержания железа в 5-10 раз чаще встречались р. *Azospirillum* и р. *Sphingomonas* [293].

#### 1.5.4. Применение метанотрофных сообществ

Сообщества, сформированные вокруг *Methylococcus capsulatus*, продемонстрировали промышленный потенциал получения белка одноклеточных микроорганизмов. В составе таких сообществ, помимо доминирующего метанотрофа, присутствуют *Cupriavidus* sp., *Aneurinibacillus danicus* и *Brevibacillus agri*, которые способствуют повышению стабильности культивирования в нестерильных условиях [294]. Показано, что смешанные культуры, содержащие представителей родов *Methylomonas* и *Methylophilus*, при выращивании на природном биогазе накапливают биомассу с содержанием белка более 41 % от сухого веса [295].

Метанотрофные сообщества также применяются для получения полигидроксиалканоатов, в первую очередь поли-3-гидроксibuтирата. Установлено, что состав таких сообществ и их способность к накоплению полимера зависят от присутствия ионов меди в среде. В условиях отсутствия меди в сообществах доминирует р. *Methylosinus* в ассоциации с гетеротрофами из родов *Rhodobacter*, *Beijerinckia* и *Pseudomonas*, тогда как добавление меди изменяет структуру консорциума в сторону преобладания представителей р. *Methylocella* совместно с *Beijerinckia*, *Sphingomonas* и *Methylophilus*, причём доля неметанотрофных спутников может достигать 77 % [247]. В обогащённом сообществе с доминированием *Methylocystis* sp. GB25, составляющем более 86 % от общей численности микроорганизмов, присутствие *Acidovorax* sp., *Methylophilus methylotrophus*, *Leifsonia* sp., *Bosea thiooxidans* и *Chryseobacterium* sp. обеспечивало накопление ПГБ до 46 % от массы биомассы [18]. При длительном культивировании в биореакторе сообщалось о преобладании *Methylocystis*, *Huphomicrobium*, *Rubinisphaeraceae* и *Pseudonocardia* после 48 суток непрерывного процесса [253].

#### 1.5.5. Синтетические метанотрофные сообщества

Исходя из необходимости наличия неметанотрофных спутников при культивировании МОБ для обеспечения устойчивого и производительного

процесса, исследования последних лет всё больше ориентируются на создание синтетических метанотрофных сообществ известного состава [296-297]. Данные искусственные консорциумы при правильном подборе микроорганизмов обладают повышенными характеристиками роста и способны производить необходимые в биотехнологии соединения с высокой эффективностью, а также являются более простыми и управляемыми, чем их природные аналоги [288, 298]. Важно отметить, что при создании синтетических сообществ исследователи чаще всего отбирают гетеротрофов из того же или сходного обогащённого природного сообщества, из которого был выделен метанотрофный штамм [21]. Масштабное исследование, охватывающее 9 метанотрофных и 25 гетеротрофных штаммов в рамках попарного культивирования и дальнейшей обработки результатов методом анализа главных компонент, позволило выявить устойчивые ассоциации, в которых неметанотрофный спутник способствовал росту доминантной культуры. Наиболее значительный положительный вклад, который авторы связали с вероятным метаболизмом витаминов, необходимых МОБ, был обнаружен при совместном выращивании *Cupriavidus taiwanensis* и *Methylomonas* sp., а также *Staphylococcus aureus* с *Methylosarcina fibrata*. Более того, ассоциация двух различных метанооксиляющих *Methylomonas* spp. с *M. fibrata* демонстрировала значительное увеличение максимальной плотности суспензии по сравнению со значениями для чистых культур МОБ, а отрицательное влияние гетеротрофа было установлено при росте *Methylobacterium radiotolerans* с *Pseudomonas aeruginosa*, тогда как другие штаммы не оказывали явного негативного эффекта [13]. В другом похожем исследовании была выявлена положительная корреляция между ростом *Methylomonas* spp. в присутствии *Rhizobium radiobacter*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas putida* и *Escherichia coli*, а при увеличении общего числа гетеротрофов вплоть до 10 различных видов в сообществе наблюдалось линейное аддитивное усиление процессов окисления метана [299]. Совместное культивирование представителя семейства *Methylococcaceae* с *Methylophilus methylotrophus*, *Acidovorax* sp. и *Flavobacterium* sp. привело к получению устойчивого метанотрофного консорциума при росте на метане в качестве единственного

источника органического углерода [22]. В ходе культивирования в периодическом режиме *Methylococcus capsulatus* Bath с намеренным добавлением идентифицированных ранее спутников, присутствующих в процессах промышленного получения микробного белка, было установлено, что доля данных гетеротрофных бактерий была стабильна со временем и не превышала 5 %, а сама смешанная культура продемонстрировала более высокую потребность в кислороде, ионах кальция и молибдата по сравнению с чистым метанотрофом [300]. Отдельный интерес представляют эксперименты по созданию синтетических сообществ МОБ *Methyloparacoccus murrelli* с водородокисляющими автотрофными бактериями *Cupriavidus necator*, в ходе которой было установлено, что биомасса консорциума содержит в 1,1-6,1 раза больше белка по сравнению с использованием культур по отдельности, а суспензия консорциума обладала более высокой плотностью, чем аксенические культуры [301-302].

Процессы культивирования метанотрофных сообществ и чистых культур МОБ имеют принципиальные различия, обусловленные влиянием межвидовых взаимодействий на ростовые характеристики и метаболическую активность. Использование обогащённых и синтетических сообществ зачастую приводит к более высокой продуктивности процесса, что проявляется в увеличении концентрации биомассы, скорости потребления метана и содержанию целевых продуктов по сравнению с чистыми культурами [15]. Наличие межвидовых связей в сообществе способствует формированию новых свойств, отсутствующих у изолированных метанотрофов, и позволяет снизить требования к стерильности культивирования за счёт стабильности сложившихся ассоциаций [18]. Поддержание желаемого состава сообщества при этом требует учёта возможных изменений бактериального разнообразия при смене параметров культивирования и целенаправленного подбора штаммов-спутников, обладающих ферментативными системами для утилизации промежуточных продуктов метаболизма МОБ [303-306].

## **Заключение по обзору литературы**

Проведённый анализ литературных данных позволяет сделать вывод о том, что, несмотря на значительный потенциал метанооксиляющих микроорганизмов в биотехнологии, их широкое промышленное внедрение сдерживается рядом актуальных задач инженерного и технологического характера. Оценка современного состояния исследований показывает, что преобладающее количество работ сосредоточено на фундаментальных аспектах метаболизма чистых культур метанотрофов, тогда как для прикладного применения критически важными являются технологическая стабильность и экономическая эффективность процесса. Естественная склонность метанотрофов к образованию синтрофных ассоциаций с гетеротрофными спутниками, обеспечивающая их устойчивость в естественных условиях, в биотехнологии часто игнорируется, а промышленное культивирование чистых культур сопряжено с жёсткими требованиями стерильности, что кратно увеличивает капитальные и эксплуатационные затраты.

До настоящего времени отсутствует обоснованный и воспроизводимый подход к конструированию синтетических метанотрофных консорциумов, который позволял бы целенаправленно подбирать штаммы-спутники на стадии подготовки инокулята для повышения общей продуктивности процесса и ведения ферментации в нестерильных условиях. Важной технической проблемой остаётся низкая продуктивность при получении биомассы метанотрофов, что связано как с физико-химическими ограничениями, так и с несовершенством составов питательных сред, разработанных эмпирически и не обеспечивающих оптимальных ростовых характеристик для конкретных культур и сообществ. Данные о влиянии макро- и микроэлементов на продуктивность метанотрофов и сообществ на их основе зачастую фрагментарны и противоречивы, а существующие технологические схемы ориентированы преимущественно на синтез какого-либо одного соединения, что не позволяет гибко переключать метаболические потоки в сообществе с помощью регулируемых параметров культивирования.

Таким образом, текущий литературный обзор выявил ключевое противоречие, заключающееся в том, что метанотрофы, особенно в рамках сообществ, обладают огромным биотехнологическим потенциалом, но при этом наблюдается отсутствие системных инженерных решений для его реализации. Существующие подходы к созданию сообществ носят случайный характер, а методы управления их ростом и продуктивностью основаны на устаревших эмпирических данных, не позволяющих достигать высоких технико-экономических показателей. Данная диссертационная работа направлена на разработку подхода к целенаправленному конструированию синтетических метанотрофных сообществ на стадии подготовки инокулята и оптимизации условий их культивирования, что является актуальной и практически значимой темой, позволяющей совершить переход от лабораторных исследований к масштабируемым промышленным процессам переработки метана в ценные продукты.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись выделенные из природных сред метанооксиляющие и неметанотрофные микроорганизмы, входящие в состав накопительных культур и синтетических метанотрофных сообществ, метанотрофные штаммы *Methylococcus capsulatus* (ВКМ В-2990), *Methylomonas methanica* (ВКМ В-2110), *Methylosinus trichosporium* (ВКМ В-2118) и *Methylocystis parvus* (ВКМ В-2129), взятые из коллекции кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева, а также выделенный из природного источника и депонированный в Коллекции UNIQEM штамм *Methylococcus capsulatus* KS-24 и смешанное метанотрофное сообщество, сформированное на базе штамма *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874.

### 2.2. Отбор проб природных метанотрофных сообществ

Пробы почв были отобраны из прикорневой зоны сосны на морском берегу (координаты: 43.154681, 40.331367), грота, расположенного в районе оз. Рица (координаты: 43.478496, 40.548453), а также заболоченной местности в Шаховском районе Московской области (координаты 55.50539, 35.32070). Отбор проводили в стерильные герметично закрывающиеся тары, а пробы до проведения эксперимента по получению накопительных культур хранили при температуре  $4 \pm 2$  °С в условиях асептики.

### 2.3. Получение накопительных культур быстрорастущих метанотрофных сообществ

С целью получения накопительных культур, содержащих метанотрофные микроорганизмы, а также ассоциированные и сопутствующие неметанотрофные бактерии, образцы природных сред инкубировали в условиях, способствующих

обогащению сообщества метанотрофными бактериями. Процедуру обогащения проводили в периодическом режиме на колбах с герметично завинчивающейся крышкой и разъемом для подачи метановоздушной смеси (доля метана 30-35 %) в условиях перемешивания при 160 об/мин на шейкере S-3.10M (ELMI, Латвия). Для всех экспериментов, представленных в данной работе за исключением непрерывного культивирования на метане с чистотой 96,75 %, был использован чистый метан (99,9 %), который более предпочтителен природному газу ввиду необходимости снижения независимого роста автотрофов, фиксирующих CO<sub>2</sub>, а также устранения ингибирующих эффектов сероводорода и других соединений [307-308]. Каждый образец культивировали на трёх различных разбавленных стандартных минеральных средах (dNMS, dAMS и M2) с добавлением раствора микроэлементов и подводом рН до 5,5-6,5 калий-фосфатным буфером [265]. Обогащение осуществляли в двух температурных режимах: 27-30 °С и 37-40 °С, постоянство температуры обеспечивали помещением шейкера в термостат. На первом этапе получения накопительной культуры из колб отбирали пробы каждые 2-3 суток, в пробах проводили аналитический контроль оптической плотности (ОП) суспензии при длине волны 600 нм при помощи спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ “Спектр”, Россия), а также видового разнообразия сообщества методом светопольной микроскопии на микроскопе Микромед 1 (“Микромед”, Россия). Пересев 5 % аликвоты суспензии на свежую среду идентичного состава осуществляли каждую неделю в течение первых четырёх месяцев обогащения. В дальнейшем для выделения быстрорастущих метанотрофных сообществ отбор проб проводили раз в 12-48 часов с проведением аналогичного аналитического контроля, а обновление питательной среды выполняли либо при достижении ОП<sub>600</sub> > 0,8-1,0, либо раз в 72 часа в случае более низких значений ОП<sub>600</sub>. Этап получения накопительной культуры считали завершённым по достижении стабильной динамики роста при многократных перeseвах и оценённого по результатам микроскопии неизменного видового состава культивируемого сообщества. Общая длительность процесса получения накопительных культур метанотрофных сообществ составила от 6 до 8 месяцев в зависимости от природного

образца и условий обогащения. В стабильно растущей культуре определяли удельную скорость роста, рассчитываемую в соответствии с уравнением:

$$\mu, (\text{ч}^{-1}) = \frac{\ln(\text{ОП}_{600;2}) - \ln(\text{ОП}_{600;1})}{(t_2 - t_1)} \quad (1),$$

где  $\text{ОП}_{600;1}$ ,  $\text{ОП}_{600;2}$  – значения оптической плотности культуры в начале и конце экспоненциальной фазы роста, ед.;

$t_1$ ,  $t_2$  – время измерения  $\text{ОП}_{600}$  от начала пассажа, ч.

#### **2.4. Выделение чистых культур метанокисляющих и неметанотрофных микроорганизмов**

Выделение чистых метанотрофных бактерий проводили методом предельного разведения на 24-луночных культуральных планшетах (FDCELL, Китай), содержащих среду, аналогичную стадии обогащения и помещённых в эксикатор с разёмом для подачи смеси метана и воздуха. Перенос суспензии на последующую итерацию методики осуществляли из максимального разведения с заметным ростом. Чистые культуры МОБ в дальнейшем высевали на твёрдые агаризованные среды при помощи метода Коха на чашках Петри, которые инкубировали в эксикаторах в атмосфере метана и воздуха в соотношении 30:70 в течение 7 суток. Изолированные колонии повторно оценивали на однородность состава, высевали истончающим штрихом на отдельные чашки Петри и использовали для дальнейших экспериментов и идентификации. В случае отсутствия роста метанотрофов на твёрдых агаризованных средах в её состав с целью стимулирования метанотрофной активности добавляли клеточный лизат исходного обогащённого сообщества в концентрации 0,1 мл/л, полученный путём механической дезинтеграции биомассы, отделённой от культуральной жидкости центрифугированием в стерильных условиях. Также для каждого выделяемого метанотрофа с целью подтверждения облигатного характера метанотрофии проводили контрольный высеv, выдерживаемый в атмосфере, не содержащей  $\text{CH}_4$ . Проводили описание морфологии выделенных метанотрофных бактерий. Для выделения метилотрофных микроорганизмов использовали идентичный подход,

но с наличием в среде 5 мл/л метанола и отсутствием метана в газовой смеси. Чистые гетеротрофные микроорганизмы получали при помощи высева накопительной культуры методом Коха на стандартные агаризованные среды Лурия-Бертани (LB) и R2A с дальнейшим переносом морфологически различных колоний на отдельные чашки Петри. Выделенные метанотрофные и неметанотрофные микроорганизмы хранили при  $4 \pm 2$  °C в пробирках со скошенным агаром, а также в виде суспензии с добавлением 30 об. % глицерина.

## **2.5. Идентификация микроорганизмов, входящих в метанотрофные накопительные культуры**

Идентификацию чистых метанотрофных и неметанотрофных штаммов проводили с использованием оборудования центра коллективного пользования. Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК для исследуемого образца были использованы универсальные праймерные системы, позволяющие детектировать как бактерии (11f-1492r), так и археи (8fa-1492r) [309]. Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 1× буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 67 mM трис-HCl, pH 8.8, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ); по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (“Диалат ЛТД”, Россия). Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2 %-ном геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см. Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США), согласно рекомендациям производителя. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, проводили по методу Сэнгера с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc., США) на генетическом анализаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems).

Полученные последовательности генов 16S рРНК изучаемых микроорганизмов были сгруппированы в операционные таксономические единицы

(OTU) на основе гомологии на уровне видов (с идентичностью от 97 %). Таксономическая идентификацию проводили при помощи базы данных последовательностей рРНК SILVA и классификатора SINA. Программный пакет BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) применяли для поиска ближайших последовательностей генов 16S рРНК в GenBank с настройками по умолчанию. Выделенным и идентифицированным микроорганизмам были присвоены соответствующие шифры с порядковым номером: М# – для метанотрофов; Met# – для метилотрофов; Н# – для неметанотрофных культур.

## **2.6. Определение базовых оптимальных условий роста выделенных метанотрофных культур**

Для каждой изолированной метанотрофной культуры, выделенной из природной среды, а также коллекционных штаммов *M. capsulatus*, *M. methanica*, *M. trichosporium* и *M. parvus*, был проведён подбор оптимальных условий роста по следующим параметрам: рН (от 4,0-8,0 с шагом 0,5); температура (20-50 °С с шагом 5 °С); источник азота (KNO<sub>3</sub>; NH<sub>4</sub>Cl и отсутствие минерального азота в среде). рН среды устанавливали путём изменения соотношения добавляемых солей KН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> и Na<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>. Процесс культивирования проводили в течение семи суток и четырёх последовательных пересевов 10 % суспензии. По окончании заключительных двух пассажей проводили отбор проб с целью определения ОП<sub>600</sub> суспензии как сравнительного показателя роста метанооксиляющих бактерий.

Полученные данные о ростовых характеристиках изолятов и коллекционных культур использовали для их выращивания в дальнейших экспериментах по созданию синтетических метанотрофных сообществ, оптимизации состава ростовой среды и непрерывном культивировании.

## **2.7. Культивирование парных сообществ «метанотроф-неметанотроф»**

Инокулят метанотрофных культур для проведения эксперимента подготавливали на колбах объёмом 50 мл на среде (NMS или AMS), а также рН и

температуре, определённых в п. 2.6 как оптимальные для каждой культуры. Метилотрофные и гетеротрофные спутники поддерживали в активной фазе роста на среде AMS с добавлением метанола в концентрации 5 мл/л и R2A соответственно. Среда R2A для подготовки инокулята была предпочтительнее LB ввиду меньшей концентрации органических источников углерода, влияние которых при культивировании бинарных культур должно быть минимальным.

Чистые культуры инокулята на стадии активного роста и  $ОП_{600} > 0,3$  попарно объединяли по принципу «M# + Met#» и «M# + H#» путём добавления 0,2 мл метанотрофной и 0,1 мл неметанотрофной культуры к 2,7 мл чистой среды на 12-луночных культуральных планшетах (FDCELL, Китай) в атмосфере метана и воздуха в соотношении 30:70 и условиях, при которых происходила подготовка инокулята метанооксиляющего участника сообщества. Каждую парную ассоциацию инкубировали в течение одного 72-часового и двух последующих 48-часовых пассажей с целью получения устойчивых бинарных сообществ, вымывания гетеротрофных микроорганизмов, неспособных к синтрофному росту с метанотрофом в условиях наличия метана в качестве единственного источника углерода, а также удаления из объёма компонентов питательной среды, используемой на стадии подготовки инокулята гетеротрофов. По окончании первого и второго пассажа суспензию парной ассоциации в объёме 0,3 мл пересевали в новые лунки с 2,7 мл чистой среды и продолжали культивирование в аналогичных условиях. Совместное культивирование каждой парной ассоциации проводили в 3-х повторностях. Аналогичным образом для оценки влияния неметанотрофной культуры в качестве контроля проводили культивирование чистых метанотрофных бактерий. По окончании 3-го пассажа определяли оптическую плотность суспензии, а также проводили микроскопию фиксированных препаратов, окрашенных в соответствии с принятой методикой по Граму для оценки наличия и доли неметанотрофных микроорганизмов посредством подсчёта бактерий ассоциации в поле зрения.

Обработку результатов эксперимента проводили аналогично исследованиям, рассматривающим вклад гетеротрофных микроорганизмов в ростовые

характеристики парных сообществ [13]. Так, влияние неметанотрофных культур оценивали как разность двоичных логарифмов нормализованных средних значений  $OP_{600}$  бинарной ассоциации и чистой метанотрофной бактерии (уравнение 2).

$$\text{Влияние Н или } Met = \log_2(OP_{600, \text{ассоциация}}) - \log_2(OP_{600, \text{чистая культура МОБ}}) \quad (2)$$

где  $OP_{600}$  – оптическая плотность суспензии с учётом разбавления, измеренная при длине волны 600 нм и оптической длине пути 10 мм, ед.

За значимое положительное или отрицательное влияние спутника принимали значения более «0,25» и «-0,25» соответственно, что соответствует увеличению или снижению оптической плотности бинарного сообщества относительно чистой культуры приблизительно на 20% и 16% соответственно. Данный установленный предел позволяет не учитывать влияние клеток различной морфологии на измерение оптической плотности, а также избежать ложноположительных и ложноотрицательных результатов ввиду погрешности методики культивирования.

## **2.8. Культивирование тройных сообществ «метанотроф-два неметанотрофа»**

Аналогично п. 2.7. проводились культивирование и оценка роста тройных сообществ, состоящих из одной метанотрофной культуры и двух выделенных неметанотрофных микроорганизмов, продемонстрировавших наиболее выраженное положительное влияние на рост МОБ в составе бинарных ассоциаций.

Несмотря на недостаток подхода, вызванный невозможностью оценить сложные взаимодействия между гетеротрофными бактериями, при которых отброшенные на прошлом этапе культуры могут обнаружить опосредованный позитивный или негативный эффект на рост метанотрофного сообщества, данный метод позволяет выявить положительные взаимодействия непосредственно с культивируемой МОБ, а также оценить аддитивное влияние видового разнообразия ассоциации.

Все композиции, продемонстрировавшие значимое улучшение роста метанооксиляющего сообщества, консервировали в 30 % глицерине, а также поддерживали на твёрдых и жидких питательных средах в оптимальных условиях для проведения дальнейших исследований.

## **2.9. Оптимизация состава ростовой среды для культивирования сконструированных сообществ и увеличения их продуктивности**

Состав ростовой среды, используемый для культивирования сконструированных синтетических сообществ, был оптимизирован на основании двух критериев: максимальная скорость роста (наработка биомассы) и содержание биологически активных веществ в биомассе (белки, полигидроксibuтират). Были подобраны концентрации следующих компонентов:  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , метанол (в качестве стимулятора метанотрофной активности), а также соотношения C/N и долю  $\text{CH}_4$  в газовой смеси. Варьирование доли метана осуществляли за счёт изменения в закачиваемой газовой смеси количества  $\text{CH}_4$ , которое было исследовано в диапазоне не ниже безопасного предела эксплуатации (18 об. %  $\text{CH}_4$ ), что накладывало бы дополнительные ограничения при проектировании и разработке промышленных методов культивирования синтетических метанооксиляющих сообществ. Соотношение C/N исследовали изменением концентрации минерального азота в ростовой среде с учётом установленной пропорции ионов «аммиак-аммоний», определённой как оптимальные по результатам построения поверхности отклика, и рассматривали отдельно для этапов накопления биомассы и повышенного синтеза целевых веществ. По установленным соотношениям C/N, а также нитрат: аммоний с учётом оптимальной доли метана в газовой смеси делали вывод о наиболее подходящей концентрации азотсодержащих солей в среде. Опыты с отсутствием минерального азота для накопления в биомассе полисахаридов и ПГБ проводили отдельно от основного эксперимента по аналогичному принципу.

Эксперименты по оптимизации проводили в колбах на 250 мл (объём жидкой среды 50-65 мл) в периодическом режиме путём переноса аликвоты (5 об. %) инокулята, поддерживаемого на среде, наиболее подходящей по источнику минерального азота отобранным сообществам (AMS или NMS), на среду изменённого состава. С целью учёта адаптации культур к изменениям состава ростовой среды первый пассаж занимал 7 суток (168 часов), а последующие два – 3 суток (72 часа). По окончании процесса культивирования оценивали оптическую плотность суспензии культур на спектрофотометре при длине волны 600 нм с учётом исходного значения  $ОП_{600}$  на момент эксперимента и пересевов, определяли АСВ суспензии и осаждённой биомассы, а также долю белков, сахаров, полигидроксibuтирата и нуклеиновых кислот.

Одновременно с первым этапом оптимизации в аналогичных диапазонах значений проводили подбор параметров, позволяющих достичь наибольшего содержания биологически активных соединений в биомассе или, в случае ЭПС, их выделения в культуральную жидкость. При отсутствии значимого влияния компонента среды на уровень биосинтеза соединений в исследуемом диапазоне за оптимальную концентрацию принимали то значение, при котором установлено максимальное накопление биомассы.

В ходе построения плана эксперимента, а также статистической обработки результатов и построении поверхности отклика использовали программный пакет STATISTICA 12 (StatSoft, США). С целью оценки сходимости и воспроизводимости полученных результатов все эксперименты по культивированию в ходе оптимизации были проведены в трёх повторностях.

### **2.9.1. Однофакторная оптимизация компонентов среды**

Оптимизация концентрации ионов  $Cu^{2+}$  (0-50 мкмоль/л);  $Fe^{2+}$  (0-50 мкмоль/л);  $Ca^{2+}$  (0-200 мкмоль/л),  $Mg^{2+}$  (0-700 мкмоль/л); метанола (0-150 ммоль/л), а также соотношения C/N (от 5 до 60 моль/моль) и  $CH_4$  (объёмная доля в газовой смеси) проводилась в ходе серии однофакторных экспериментов с изменением

целевого параметра. Значения всех рассматриваемых факторов в обозначенных диапазонах варьирования приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Переменные и их значения в однофакторном анализе

Переменная	Единицы измерения	Концентрации, ммоль/л
Fe <sup>2+</sup> (в составе FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	мкмоль/л	0;1; 5; 10; 15; 20; 25; 35; 50
Cu <sup>2+</sup> (в составе CuCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O)		0; 1; 5; 10; 15; 20; 25; 35; 50
Ca <sup>2+</sup> (в составе CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)		0; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 200
Mg <sup>2+</sup> (в составе MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)		0; 50; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 1000
Метанол	ммоль/л	0; 10; 20; 30; 50; 75; 100; 150
C/N	моль/моль	2; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 40; 60
CH <sub>4</sub>	доля	0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50; 0,55; 0,60

### 2.9.2. Двухфакторная оптимизация источника азота и построение поверхности отклика

Пять различных концентраций ионов нитрата и аммония в питательной среде использовали для создания центрального композиционного плана (ЦКП) и построения поверхности отклика. Роль каждой переменной, их взаимодействие и статистический анализ для получения модели, характеризующей отклик оптической плотности суспензии и состава биомассы, описывали с учётом линейного, квадратичного и парного линейного вклада факторов в уравнение регрессии. Значение  $\alpha$  звёздных точек было выбрано равным 1,416 для получения ротатабельного плана. Центральная точка плана соответствует уровню 0 для достижения несмещенной оценки дисперсии ошибки. Значения концентраций ионов в соответствии с построением ЦКП приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Значения переменных центрального композиционного плана (ЦКП)

Переменная	Единицы измерения	Уровни и значения переменных в ЦКП				
		- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
$\text{NO}_3^-$	ммоль/л	0,1	3,0	10,0	17,0	19,9
$\text{NH}_4^+$		0,1	3,0	10,0	17,0	19,9

На основании совокупности полученных результатов разрабатывали составы сред, способствующие наибольшему показателю накопления биомассы созданными метанотрофными синтетическими сообществами, а также содержанию в ней целевых соединений.

## 2.10. Культивирование синтетических сообществ в периодическом режиме

Синтетические сообщества, культивируемые на средах оптимизированного состава, сравнивали по скорости роста и содержанию белка и полигидроксibuтирата в биомассе с растущими на стандартных средах для культивирования метанотрофных микроорганизмов в условиях (температура, pH), определённых в п.2.6, как характерные для того или иного изолята. Сравнительное культивирование проводили в течение 12 суток с пересевами 10 % объёма суспензии и обновлением метановоздушной атмосферы на свежую среду каждые 24 часа в стерильных условиях. Оставшийся объём суспензии использовали для определения оптической плотности и содержания АСВ в суспензии после каждого пассажа, а также аналитических исследований наработанной биомассы. Также в экспоненциальной фазе роста каждого пассажа проводили стерильный отбор проб с целью определения удельной скорости роста сообществ.

На основании полученных результатов делали вывод об эффективности проведения оптимизации и преимуществах применения сконструированных метанотрофных ассоциаций по сравнению с чистыми культурами метанооксиляющих бактерий, а также исходными накопительными быстрорастущими сообществами (в случае выделенной быстрорастущей накопительной культуры №5, из которой был выделен метанотроф *M. capsulatus* KS-24).

## 2.11. Культивирование синтетических сообществ в непрерывном режиме

Эксперименты по глубинному непрерывному культивированию проводили в стеклянном лабораторном биореакторе с магнитным приводом «Фермус-3» (НИЦ «Биоавтоматика», Россия) с рабочим объёмом от 2 до 3,5 л (общий объём 5,0 л) при условиях и составе среды, установленных как оптимальные для накопления биомассы сконструированными синтетическими сообществами и наибольшего содержания в них целевых веществ (белки, ПГБ) в стерильных и нестерильных условиях с контролем температуры, растворённого кислорода и автоматическим регулированием pH (подтитровка KOH или H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Испытания проводили в хемостатном режиме при подаче метановоздушной смеси в условиях атмосферного давления. Перемешивание обеспечивали двухъярусной лопастной мешалкой; скорость перемешивания варьировали в диапазоне 300–750 об/мин для поддержания заданного уровня массопередачи. Подачу ростовой среды и титранта осуществляли посредством перистальтических насосов LongerPump BT100-2J (LongerPump, Китай). Для управления процессом культивирования использовали программное обеспечение «BioDrome».

Общая продолжительность каждого длительного непрерывного эксперимента составляла не менее 21 суток; дальнейшее увеличение срока культивирования зачастую приводило к значимому снижению стабильности и продуктивности процесса, что выражалось в резком падении концентрации биомассы (более чем на 20 % по АСВ за время, соответствующее полному обновлению среды в реакторе при данной скорости протока) и последующим неконтролируемым изменением состава сообщества.

Для стандартизации условий запуска процесса культивирования инокулят получали из стабильно растущей непрерывной культуры соответствующего сообщества, предварительно высеянного с колб. На первом этапе биореактор засеивали 10 % (по объёму) подготовленным инокулятом. Культивирование начинали в периодическом режиме (без подачи свежей среды) при постоянной подаче метановоздушной смеси, состоящей из метана и воздуха в объёмном

соотношении 1:1. Расход газа устанавливали на уровне, необходимом для обеспечения и поддержания значения растворённого кислорода  $pO_2$  в диапазоне 10–20 % от насыщения. Показатель pH среды поддерживали на оптимальном для каждого сообщества уровне за счёт подтитровки суспензии раствором КОН или  $H_2SO_4$ . Выход синтетического сообщества из лаг-фазы определяли по трём характерным признакам: снижению уровня растворённого кислорода вследствие роста метаболической активности сообщества; снижению pH (расходу титранта на подщелачивание среды); росту концентрации АСВ суспензии до 2–3 г АСВ/л для сообщества МС5 и до 0,5–1 г АСВ/л для сообщества МС7.

Дальнейший этап выхода на стабильный хемостат включал подачу ростовой среды на низкой скорости протока, достаточной для поддержания концентрации АСВ суспензии в рамках указанного ранее диапазона, а также контроль расхода метановоздушной смеси (соотношение  $CH_4$ : воздух = 1:4) из расчёта 1,25 мл/мин на 1 мл среды в биореакторе для сообщества МС5 и 0,75 мл/мин на 1 мл среды в биореакторе для сообщества МС7 для сохранения содержания растворённого кислорода в пределах 10–20 % от насыщения. После фиксации стабильного состояния процесса осуществляли ступенчатое (с шагом 0,02–0,03 ч<sup>-1</sup>) увеличение скорости разбавления, одновременно корректируя подачу газовой смеси для поддержания заданного  $pO_2$ . Концентрацию компонентов питательной среды (кроме метанола) при росте оптической плотности суспензиикратно в соответствии с концентрацией АСВ суспензии повышали для исключения лимита по содержащимся в ней соединениям. Увеличение продолжали до достижения максимальной рабочей скорости разбавления для данного сообщества при выбранных условиях, при которых обеспечивается максимальная производительность по биомассе.

Из реактора отбирали пробы для определения оптической плотности и концентрации биомассы в культивируемой суспензии, исследования состава биомассы, а также оценки стабильности состава синтетических метанотрофных сообществ. Определяли максимальный проток  $D_{max}$ , (ч<sup>-1</sup>), обеспечивающий стабильную наработку биомассы синтетических метанотрофных сообществ.

### **2.11.1 Непрерывное культивирования синтетических сообществ в стерильных условиях**

Стерильность процесса культивирования обеспечивали посредством автоклавирования биореактора, ростовой среды и шлангов. Стерильность потока подачи метановоздушной смеси обеспечивали её прохождением через стерилизующие фильтры с размером пор 0,22 мкм.

### **2.11.2 Непрерывное культивирования синтетических сообществ в нестерильных условиях**

Эксперименты по нестерильному культивированию проводили для каждого из синтетических сообществ способом, аналогичным описанному выше, за исключением стерилизации биореактора и питательной среды.

### **2.11.3 Непрерывное культивирование синтетических сообществ на техническом метане**

Эксперименты по культивированию проводили для каждого из синтетических сообществ способом, аналогичным описанному выше в стерильных и нестерильных условиях, но в качестве источника органического углерода вместо метана с чистотой 99,9 % применяли газ, содержащий 96,75 %  $\text{CH}_4$ , а также примеси этана и пропана.

### **2.11.4 Исследование стабильности состава синтетических метанотрофных сообществ при культивировании в непрерывном режиме**

С целью анализа стабильности созданных синтетических ассоциаций с изменением условий наработки биомассы в нестерильных условиях в ходе каждого цикла культивирования из биореактора стерильно отбирали пробу суспензии, которую направляли на исследование гена 16S рРНК с использованием системы

PacBio. В качестве анализированных проб брали образцы, полученные при наибольшей продуктивности процесса культивирования. Исследование проводили на базе компании ООО "АЛЬГАВИТАПРО" (Москва) с выделением соответствующего генетического материала и последующей биоинформатической обработкой результатов. Полноразмерный ген 16S рРНК амплифицировали из геномной ДНК (5 нг) с использованием универсальных праймеров 5'GCATC/barcode/AGRGTTYGATYMTGGCTCAG3' и 5'GCATC/barcode/RGYTACSTTGTTACGACTT3' (PN 101-599-700 PacBio Protocol), каждый из которых был помечен штрих-кодами PacBio, специфичными для образца, для мультиплексного секвенирования. ПЦР-амплификация проводилась в течение 30 циклов: денатурация при 95 °С в течение 30 с, отжиг при 57 °С в течение 30 с и удлинение при 72 °С в течение 60 с. Качество после ПЦР оценивалось с помощью биоанализатора 2100 (Agilent Technologies), и эквимольные концентрации ДНК из каждого образца объединялись в пул. Для подготовки библиотек использовали набор SMRTbell prep kit 3.0 (PacBio) в соответствии с протоколом 16S SMRTbell от PacBio. Концентрацию и размер библиотек измеряли с помощью набора Qubit HS DNA Kit (Invitrogen) и анализатора фрагментов. Секвенирование проводили на системе PacBio Sequel IIe.

Демультимплексирование чтений секвенирования проводили с помощью программы PacBio lima (2.5.1). HiFi чтения (CCS чтения с предсказанной точностью  $\geq Q20$ ) были извлечены с помощью SAMtools (1.13) и преобразованы в формат FASTQ с помощью PacBio bam2fastq (1.3.1). Качество файлов FASTQ анализировалось с помощью ПО FastQC (версия 0.11.5-cegat).

Праймеры были обрезаны из каждого чтения с помощью cutadapt (4.2). Перед качественной обрезкой, денуазированием, исправлением ошибок и удалением химер с помощью пакета DADA2 на R проводилась фильтрация чтений, содержащих Ns и низкокачественные основания. Полученные FASTA-файлы были сопоставлены с пользовательской базой данных, основанной на базе данных SILVA версии 138 nr99, с помощью MINIMAP2. Таксономическое размещение проводилось с использованием алгоритма Lowest Common Ancestor (LCA),

реализованного в MEGAN6 Ultimate Edition (версия 6.18.7). Учитывались только таксоны с относительным обилием последовательностей выше 0,01 % [310].

### **2.11.5. Непрерывное культивирование сообщества на основе *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874**

Для сопоставления продуктивности разработанной синтетической ассоциации МС5 с аналогом в непрерывном режиме культивировали сообщество, основу которого составлял штамм *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874. Процесс вели в нестерильных условиях на техническом метане по методике, полностью аналогичной описанной в разделах 2.11.2 и 2.11.3. Параметры культивирования (температура, рН, состав питательной среды, соотношение метан: воздух, скорость разбавления) устанавливали в соответствии с оптимальными для данного сообщества значениями, определёнными в ходе предварительных экспериментов. Все остальные условия (оборудование, система контроля и управления процессом, методы отбора проб и аналитического контроля) соответствовали приведённым в разделах 2.11-2.12.

### **2.12. Расчёт показателей непрерывного культивирования синтетических сообществ**

В ходе непрерывного культивирования синтетических сообществ и промышленного аналога были определены ключевые технологические показатели, позволяющие оценить эффективность разработанного подхода к получению высокобелковой биомассы, а также сырья для получения полигидроксibuтирата. На основании полученных данных производили расчёт оптимальной скорости разбавления, продуктивности по биомассе и целевому продукту (уравнения 3-5).

$$D = \frac{F}{V_{\phi}}, \quad (3)$$

где  $D$  – скорость разбавления,  $ч^{-1}$ ;

$F$  – скорость протока, м<sup>3</sup>/ч;

$V$  – рабочий объем ферментера, м<sup>3</sup>.

$$P_X = D \cdot X_{ACB} \quad (4)$$

где  $P_X$  – продуктивность по АСВ биомассы, г/(м<sup>3</sup>·ч);

$D$  – скорость разбавления, ч<sup>-1</sup>;

$X_{ACB}$  – концентрация АСВ в суспензии, кг/м<sup>3</sup>.

$$P_{\text{белок или ПГБ}} = D \cdot X_{ACB} \cdot \omega_{\text{белка или ПГБ}} \quad (5)$$

где  $P_{\text{белок или ПГБ}}$  – продуктивность по целевому продукту, г<sub>белка или ПГБ</sub>/(м<sup>3</sup>·ч);

$D$  – скорость разбавления, ч<sup>-1</sup>;

$X_{ACB}$  – концентрация АСВ в суспензии, кг/м<sup>3</sup>;

$\omega_{\text{белка или ПГБ}}$  – массовая доля белка или ПГБ от АСВ биомассы.

По результатам культивирования определяли коэффициент стабильности процесса, который характеризует долю времени работы системы, в течение которой фактические значения контролируемых параметров находились в пределах установленного диапазона. (уравнение 6):

$$K_{\text{ст}} = \frac{\sum T_{\text{ст}}}{T_{\text{общ}}} \cdot 100\% \quad (6)$$

где  $\sum T_{\text{ст}}$  – суммарное время нахождения процесса в стабильном состоянии (в пределах допустимых диапазонов) за весь период культивирования, час;

$T_{\text{общ}}$  – общее время работы после выхода на режим, час.

Допустимый диапазон стабильного процесса для каждого культивирования определяли на основе статистической обработки экспериментальных данных. За стабильное состояние принимали такой ход процесса, при котором выполнялись все перечисленные условия:

- концентрация биомассы ( $X$ , г АСВ/л) находилась в интервале  $\bar{X} \pm \sigma_x$ , где  $\bar{X}$  - среднее значение концентрации для данного режима, а  $\sigma_x$  – стандартное отклонение;
- доля целевого продукта от АСВ ( $\omega$ , % от АСВ) для МС5 (сырого протеина) и МС7 (ПГБ) находилось в интервале  $\omega \pm \sigma_p$ , где  $\omega$  - среднее значение содержания целевого соединения в биомассе, а  $\sigma_p$  - стандартное отклонение;
- при микроскопии препаратов, окрашенных по Граму, визуально идентифицировались все три компонента синтетического сообщества;
- наличие в суспензии контаминирующей микрофлоры в количестве не превышала 50% от общего состава микробной популяции.

Также устанавливали время выхода на высокопроизводительный хеостатный режим культивирования разработанного сообщества ( $\tau_{ст}$ ), определяемый как интервал времени от момента запуска процесса до момента достижения хеостатного режима в стабильном состоянии.

Производительность процесса по биомассе ( $M_x$ ) и по целевому продукту ( $M_p$ ) рассчитывали как суммарное количество биомассы или продукта, наработанное в биореакторе и отобранное с потоком культуральной жидкости за весь период культивирования, включая этапы запуска процесса и выхода на стабильный режим работы.

Полученные показатели совокупно анализировали для выбора оптимального подхода к ведению культивирования, а также сравнения оптимизированных ростовых сред для наработки биомассы и увеличения содержания в ней целевых веществ.

Полученные показатели для синтетического сообщества МС5 сравнивали с аналогичными характеристиками для результатов по культивированию сообщества с *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874. Для культуры *Methylosinus trichosporium* ОВЗб с целью последующего сравнения с МС7 данные были взяты из научных публикаций [165, 249, 311-314].

### **2.13. Биосинтез наночастиц серебра чистыми метанотрофными культурами и синтетическими метанотрофными сообществами**

Все используемые в данной работе чистые метанотрофные культуры, а также наиболее перспективные метанотрофные сообщества, отобранные в п 2.6. и 2.7. были исследованы на предмет способности синтезировать внеклеточные наночастицы серебра как в условиях фотоиндукции, так и без воздействия света. С данной целью чистые метанотрофные культуры, а также сконструированные продуктивные метанооксиляющие ассоциации в экспоненциальной фазе роста добавляли в 12-луночные культуральные планшеты со средой NMS, содержащей также от 25, 50 или 75 мг  $\text{Ag}^+/\text{л}$  в составе  $\text{AgNO}_3$ . Планшеты помещали в метановоздушную атмосферу и инкубировали в условиях перемешивания (180-200 об/мин) в течение 48 часов при температуре, оптимальной для роста культуры. Эксперимент проводили в присутствии освещения (600-1000 Лм), а также отсутствии естественных или искусственных источников света. По окончании инкубирования фиксировали изменение цвета суспензии до тёмно-жёлтого или коричневого, что обусловлено явлением поверхностного плазмонного резонанса наночастиц серебра [315]. Отобранные на основании первичного скрининга суспензии чистых и смешанных культур центрифугировали на микроцентрифуге TC-Meteor 4K-7.2K-10K (TOPSCIEN INSTRUMENT, Китай) при 3260 g в течение 10 минут для отделения культуральной жидкости от биомассы. Полученные супернатанты, содержащие внеклеточное наносеребро, анализировали спектрофотометрически, а также методом динамического рассеяния света (ДРС) для оценки распределения наносеребра по размеру. Размер, форма и склонность к агрегации была изучена методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Образцы для проведения СЭМ были приготовлены путем нанесения, отмывки дистиллированной водой и высушивания капель суспензий серебряных наночастиц на медных сетках.

## **2.14. Аналитические методы**

При проведении аналитических измерений руководствовались требованиями нормативных документов (ГОСТ, ОФС), а при их отсутствии – релевантными методами, описанными в научных публикациях последних лет и адаптированными к условиям эксперимента.

### **2.14.1. Определение абсолютно сухого веса (АСВ)**

Определение абсолютно сухого веса проводили в соответствии с ГОСТ 31640-2012 [316]. Для определения АСВ биомассы суспензию клеток предварительно подвергали центрифугированию на центрифуге Eppendorf 5810R («Eppendorf», Германия) при 5000 g в течение 15 минут. С целью удаления остаточного количества солей и метаболитов, растворённых в жидкой фазе осаждённой влажной биомассы, осадок ресуспендировали в дистиллированной воде и повторно центрифугировали при аналогичных условиях.

### **2.14.2. Определение сырого протеина**

Высушенные для определения АСВ пробы в дальнейшем использовали для определения содержания сырого протеина методом Кьельдаля. Сжигание и дальнейшую перегонку проб осуществляли на дигесторе ПМП-4М и полуавтоматическом аппарате Кьельдаля АКВ-10 (оба - «Вилитек», Россия) в соответствии с методикой по ГОСТ 32044.1-2012 [317].

### **2.14.3. Определение белка методом Лоури**

Определение содержания белков проводили методом Лоури на основании с предварительным гидролизом биомассы, осаждённой при 5000 g в течение 15 минут [318]. Гидролиз образцов проводили в присутствии 1 М NaOH в течение 60 минут и температуре 90 °С [319].

#### **2.14.4. Определение сахаров**

Концентрацию экзополисахаридов в культуральной жидкости, а также общее содержание сахаров в биомассе определяли модифицированным колориметрическим фенол-сернокислым методом Дюбуа с проведением предварительного гидролиза биомассы в 2 % серной кислоте на кипящей водяной бане в течение 45 минут [320]. В качестве стандарта для построения калибровочной прямой применяли сочетание декстрана, ксантана и глюкозы [321].

#### **2.14.5. Первичный скрининг бактерий, синтезирующих полигидроксibuтират**

Для определения бактерий, способных к биосинтезу значительному накоплению ПГБ в клетках, проводили окрашивание фиксированных препаратов 0,3 % раствором Судана Чёрного Б в 60 % этаноле в течение 10 минут. Далее предметное стекло промывали дистиллированной водой, а на препарат наносили 0,5 % водный раствор сафранина, который выдерживали перед повторной промывкой 4-5 минут. Клетки, имеющие характерные вкрапления синего цвета, обнаруживаемые при помощи фазово-контрастной микроскопии, содержат ПГБ [206].

#### **2.14.6. Определение полигидроксibuтирата**

Количественное определение ПГБ в биомассе проводили модифицированным методом Лоу [322]. Для предварительной экстракции водорастворимых соединений из биомассы биомассу гидролизовали 2 М соляной кислотой на кипящей водяной бане 60 минут с дальнейшим центрифугированием при 5000 g в течение 10 минут. ПГБ, находящийся в подсушенном осадке, экстрагировали хлороформом с инкубацией смеси при 28-30 °С в течение 12 часов при постоянном перемешивании. Далее смесь центрифугировали в аналогичных условиях, отбирали хлороформ-содержащую фракцию, которую высушивали на воздухе в течение 24 часов в вытяжном шкафу и температуре 25 °С.

Образовавшийся осадок белого цвета (ПГБ) обрабатывали концентрированной серной кислотой, которая при нагревании в течение 60 минут приводила к образованию кротоновой кислоты. Измеряли поглощение раствора при 235 нм и определяли концентрацию ПГБ в соответствии с построенной по стандартному соединению калибровочной прямой.

#### **2.14.7. Определение содержания нуклеиновых кислот**

Массовую долю нуклеиновых кислот в микробной биомассе, осаждённой при 5000g в течение 10 минут и гидролизованной в 0,5 н хлорной кислоте, определяли методом Спирина в соответствии с ОФС.1.7.2.0018.15 [323].

#### **2.14.8. Определение минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной концентрации наночастиц серебра**

Для определения минимальной ингибирующей (МИК) и минимальной бактерицидной (МБК) концентрации были выбраны четыре модельных патогенных штамма: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Bacillus cereus*. Определение МИК проводили на 96-луночных культуральных планшетах (FDCELL, Китай) со средой LB с использованием серийных разведений синтезированных наночастиц серебра в концентрациях от 10 до 150 мг Ag<sup>+</sup>/л, а также положительным (микроорганизм LB) и отрицательным контролем (LB). МИК определяли после 24 ч инкубации при температуре 37 °С с начальным количеством инокулята  $\sim 1 \cdot 10^5$  КОЕ/мл. МИК представляет собой самую низкую концентрацию наносеребра, которая полностью визуальнo подавляет роста тестируемых микроорганизмов. Также была определена концентрация наночастиц, способная подавлять видимый рост 50 % популяции микроорганизмов (МИК<sub>50</sub>). После определения МИК аликвоты по 50 мкл из всех лунок, в которых не наблюдалось видимого роста, высевали на чашки с агаризованной средой LB и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. МБК определяли как самую низкую

концентрацию наносеребра при отсутствии роста на среде LB (то есть убивающую 100 % исходной микробной популяции) [324-325].

### **2.15. Статистическая обработка полученных результатов**

Все эксперименты, представленные в работе, выполнялись не менее чем в трёх биологических повторностях. Для каждой биологической повторности аналитические измерения проводили до получения трёх сходящихся повторностей в соответствии с методикой измерения. Результаты экспериментов и измерений представлены в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием стандартных методов вариационной статистики. Достоверность различий между средними значениями оценивали с помощью t-критерия Стьюдента при уровне значимости  $p < 0,05$ . При множественных сравнениях использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующей оценкой значимости различий между группами.

Для планирования экспериментов, включая разработку центрального композиционного плана, построения поверхностей отклика и анализа полученных данных использовали программный пакет Statistica 12 оснащенный набором инструментов для анализа данных. При построении регрессионных моделей оценивали значимость коэффициентов регрессии, адекватность моделей и величину доверительных интервалов. Предварительную обработку данных и построение графиков выполняли с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Быстрорастущие накопительные метанотрофные культуры

В ходе процесса обогащения суммарно было выделено пять стабильных быстрорастущих метанотрофных сообществ с максимальной удельной скоростью роста в диапазоне от 0,13 до 0,20 ч<sup>-1</sup>, условия получения которых представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Накопительные культуры

№ накопительной культуры	Источник выделения	Среда на стадии обогащения	Температурный режим, °С	Максимальная удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>
1	Прикорневая зона сосны	dAMS	37-40	0,13
2		M2	27-30	0,16
3	Грот	dNMS	27-30	0,15
4		M2	27-30	0,18
5	Заболоченная почва	dAMS	37-40	0,20

Микрофотографии препаратов накопительных культур, окрашенных раствором фуксина, при 1000-кратном увеличении приведены на рисунке 3 (а-д).

Бактерии, составляющие сообщества, преимущественно имели форму небольших коротких или длинных, иногда слегка изогнутых палочек, а также моно- или диплококков различного диаметра. В небольших количествах в сообществах №1, 3 и 5 наблюдали бактерии нитевидной формы.

Накопительные культуры, получаемые при других условиях процесса, либо полностью вымывались при частых пересевах, либо демонстрировали удельную скорость роста в экспоненциальной фазе менее 0,1 ч<sup>-1</sup>, что не позволяет отнести их к быстрорастущим метанотрофным сообществам.

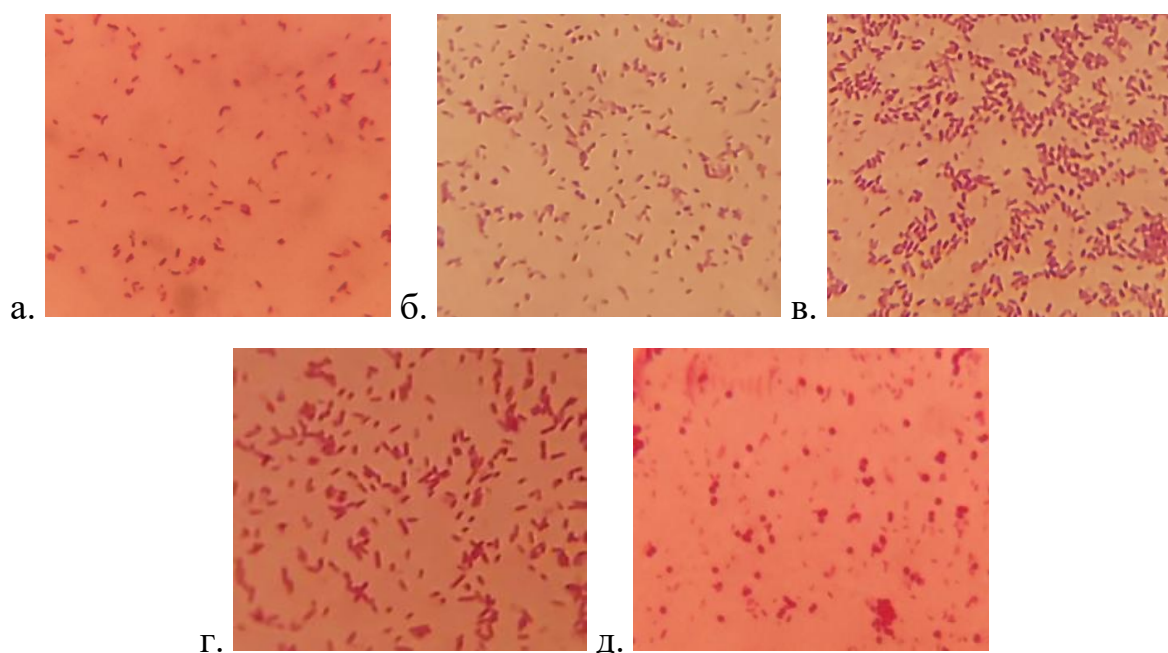


Рисунок 3 – Накопительные метанотрофные культуры. Буквенные обозначения «а-д» соответствуют номерам сообществ 1-5

### 3.2. Состав метанотрофных сообществ

Из каждой быстрорастущей накопительной культуры были выделены доминирующие изоляты метанооксиляющих бактерий, которые в дальнейшем идентифицировали посредством анализа последовательности 16S – рРНК и сопоставления с последовательностями базы данных GenBank. Результаты идентификации, приведённые в таблице 4, указывают на соответствие метанооксиляющих бактерий четырём родам: *Methylomonas*, *Methylosinus*, *Methylocystis* и *Methylococcus*. При этом представители р. *Methylocystis* выделены из двух природных источников при использовании одной и той же среды (M2), но имеют различных ближайших представителей в базе GenBank. Выделение различных метанотрофных изолятов из одной пробы при сходных условиях обогащения (температура и нитратный источник азота) может быть объяснено разницей в содержании микроэлементов, среди которых наибольшее влияние на рост МОБ имеет концентрация ионов меди и железа, которые при использовании среды dNMS были значительно меньше, чем в случае применения M2.

Таблица 4 – Выделенные метанооксиляющие изоляты

№ накопительной культуры	Класс	Ближайший родственник (номер доступа GenBank)	Сходство, %	Наименование (шифр) изолята
1	<i>Gamma</i> proteobacteria	<i>Methylomonas</i> sp. (PP068855.1)	97,8	M1
2	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylocystis</i> sp. (LC849105.1)	98,1	M2
3	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylosinus</i> sp. (M95664.1)	98,0	M3
4	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylocystis parvus</i> (AF150805.1)	97,2	M4
5	<i>Gamma</i> proteobacteria	<i>Methylococcus</i> sp. (NR042183.1)	98,7	M5

С учётом высокой скорости роста и потенциальной биотехнологической значимости изолята *Methylococcus* sp., он был депонирован в Коллекции UNIQEM как *Methylococcus capsulatus* KS-24 для поддержания в коллекции микроорганизмов и дальнейшего использования в научно-исследовательских и опытно-промышленных работах (Приложение А).

Также в совокупности было выделено 24 изолята неметанотрофных культур, в том числе 4 метилотрофных представителя, продемонстрировавших выраженный рост на агаризованной среде с содержанием метанола в концентрации 5 мл/л (таблица 5). На основании сходных условий обогащения из одного природного источника и результатов идентификации ряду микроорганизмов был присвоен одинаковый шифр ввиду их идентичности. Установлено, что наиболее распространёнными неметанотрофными участниками метанооксиляющих накопительных культур являются бактерии родов *Brevibacillus*, *Chryseobacterium*, *Methylobacterium* и *Burkholderia* (встречаются в 3 из 5 быстрорастущих сообществ), а также *Ralstonia*, *Azospirillum* и *Methylorubrum* (все – в 2 из 5). Большинство выделенных неметанотрофных микроорганизмы были ранее обнаружены в различных природных и обогащённых сообществах и являются их типичными представителями [291-293]. Данный факт также подтверждает утверждение о

тесной взаимосвязи метанотрофных бактерий с ограниченным количеством возможных спутников, способных к наиболее полному и быстрому потреблению промежуточных продуктов окисления метана, внеклеточных полимерных веществ, а также соединений, высвобождаемых в ходе лизиса МОБ [283, 299].

Таблица 5 – Неметанотрофные спутники метаноокисляющих накопительных культур

№ накопительной культуры	Выделенный метанотрофный изолят	Родовая принадлежность спутника	Ближайший родственник (% сходства)	Наименование (шифр) изолята
1	<i>Methylomonas</i> sp. M1	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylobacterium aminovorans</i> (97,90)	Met1
		<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium lecithinasegens</i> (98,70)	H1
		<i>Ralstonia</i>	<i>Ralstonia mannitolilytica</i> (99,79)	H2
		<i>Microvirga</i>	<i>Microvirga subterranea</i> (99,30)	H3
		<i>Leifsonia</i>	<i>Leifsonia shinshuensis</i> (99,16)	H4
2	<i>Methylocystis</i> sp. M2	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylobacterium</i> sp. штамм SH18 (99,68)	Met2
		<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia multivorans</i> (98,15)	H5
		<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium lecithinasegens</i> (98,70)	H6
		<i>Brucella</i>	<i>Brucella intermedia</i> (99,71)	H7
		<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (97,82)	H8
		<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> штамм DSM 50071 (99,96)	H9
3	<i>Methylosinus</i> sp. M3	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylobacterium extorquens</i> (99,42)	Met3
		<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia latens</i> (99,59)	H10
		<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i> (99,85)	H11
		<i>Cohnella</i>	<i>Cohnella</i> sp. штамм JJ-181 (97,98)	H12
		<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus brevis</i> (98,71)	H13
		<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus necator</i> (99,50)	H14

Продолжение таблицы 5

№ накопительной культуры	Выделенный метанотрофный изолят	Родовая принадлежность спутника	Ближайший родственник (% сходства)	Наименование (шифр) изолята
4	<i>Methylocystis</i> sp. M4	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylobacterium extorquens</i> (99,40)	Met3
		<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia latens</i> (99,44)	H10
		<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus brevis</i> (99,16)	H13
		<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i> (99,92)	H11
		<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia farcinica</i> (99,20)	H15
5	<i>Methylococcus</i> sp. M5 ( <i>Methylococcus capsulatus</i> KS-24)	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylobacterium</i> sp. штамм B9.1 (97,48)	Met4
		<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium gleum</i> (99,65)	H16
		<i>Ralstonia</i>	<i>Ralstonia pickettii</i> (98,50)	H17
		<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus agri</i> (99,53)	H18
		<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> (99,80)	H19
		<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus albus</i> (99,98)	H20

Отмечено выделение метилотрофных изолятов, относимых только к семейству *Methylobacteriaceae*, что может быть объяснено конкурентным преимуществом за доступ к метанолу, выделяемому клетками МОБ в ходе метаболических процессов, перед иными потребляющими метанол бактериями [288-289]. Наблюдается соответствие ряда гетеротрофных спутников (рода *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Methylobacterium* и *Ralstonia*) наличию определённого класса метанооксиляющих бактерий в составе накопительной культуры, что указывает на специфические синтрофные взаимодействия между участниками обогащённого сообщества [299]. Примечательно отсутствие часто распространённых в метанотрофных сообществах р. *Sphingomonas* и р. *Beijerinckia*, что может быть вызвано более низкой скоростью роста данных участников и их вымывании при получении быстрорастущих накопительных культур [169, 204, 247, 291].

### 3.3. Ростовые характеристики метанотрофных изолятов

На первом этапе определения ростовых характеристик были установлены оптимальные диапазоны температур для всех выделенных метанотрофных культур (M1-M5), а также коллекционных штаммов *M. methanica* (M6), *M. trichosporium* (M7) и *M. parvus* (M8) *M. capsulatus* (M9) (рисунок 4).

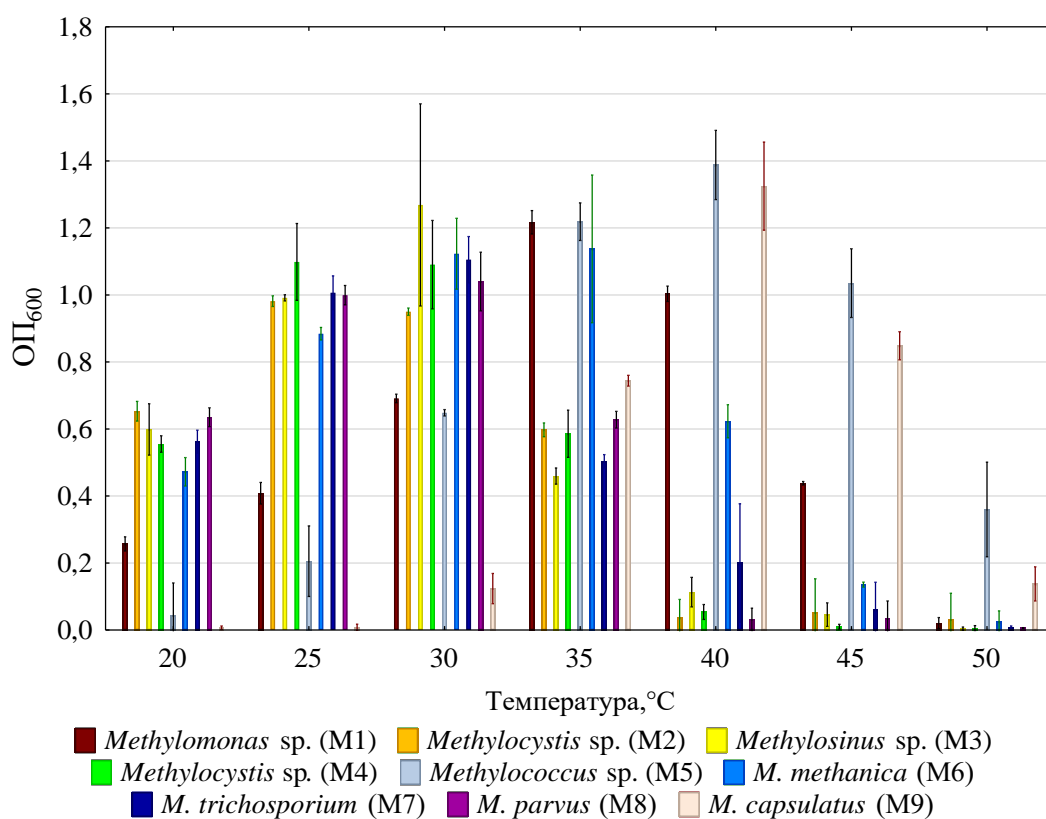


Рисунок 4 – Накопление биомассы метанотрофными культурами при различных температурах

Изолированные представители *Alphaproteobacteria* по значениям оптимальных температур (25-30 °C) в целом соответствуют широко распространённым в исследованиях типовым штаммам. Однако, оба представителя *Gamma*proteobacteria продемонстрировали значимые отличия. Так изолят, относимый к р. *Methylomonas*, лучше рос при более высоких температурах, чем коллекционный штамм (оптимум 35-40 °C против 25-35 °C), а выделенный штамм *Methylococcus capsulatus* KS-24 (M5) продемонстрировал более широкий диапазон

температурных значений (35-45 °С), при которых наблюдалась выраженная активность бактерии по сравнению с коллекционным штаммом.

Оптимальные значения рН, определённые при наиболее подходящей температуре для каждого микроорганизма, продемонстрировали сходные показатели между выделенными изолятами и коллекционными метанотрофными штаммами и являются типичными для бактерий соответствующих родов, являющихся нейтрофильными или умеренно-ацидофильными МОБ (рисунок 5).

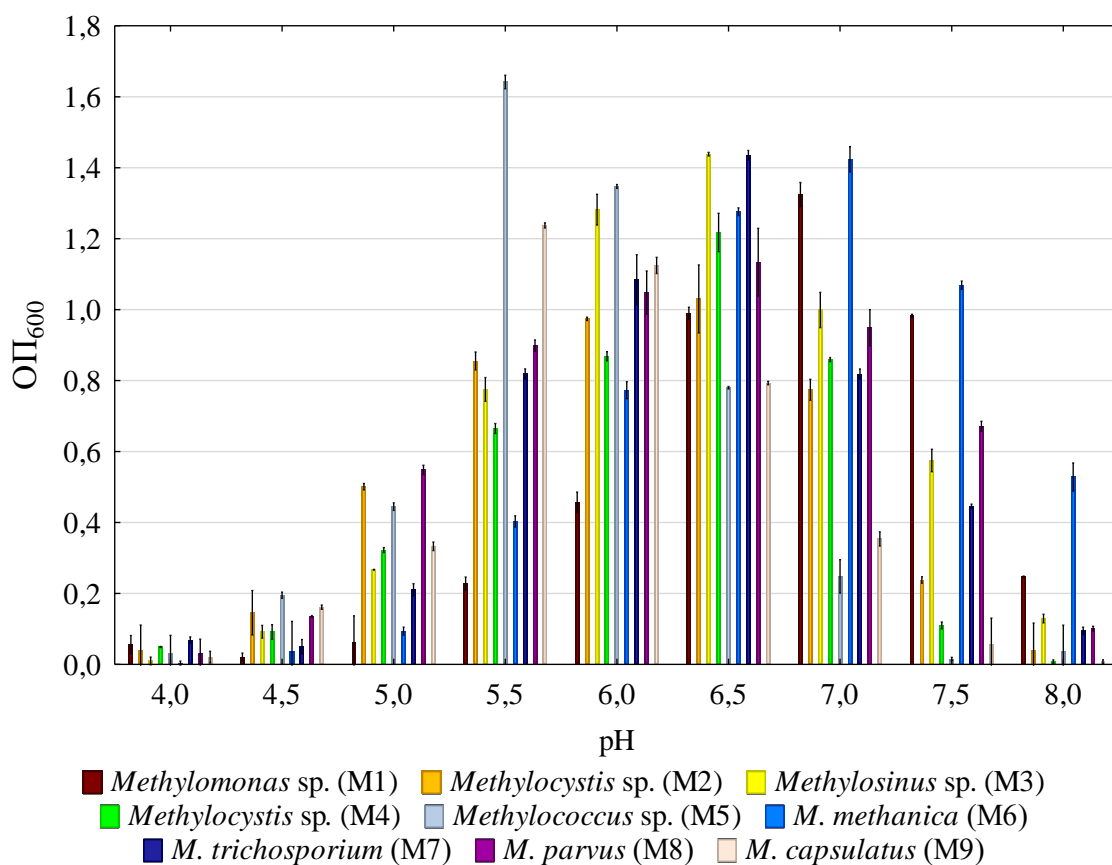


Рисунок 5 – Накопление биомассы метанотрофными культурами при различных значениях рН

На заключительном этапе (таблица 6) установления ростовых характеристик были определены источники азота в ростовой среде (NMS, AMS и среда минерального аналогичного состава без азота), обеспечивающие наибольшую

скорость роста анализируемых микроорганизмов при установленной температуре и значении pH.

Таблица 6 – Определение оптимального источника азота

Метанотрофная культура	Источник азота	ОП <sub>600</sub> , ед.
<i>Methylomonas</i> sp. M1	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,167 ± 0,039
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,983 ± 0,077
	N <sub>2</sub>	Отсутствие роста
<i>Methylocystis</i> sp. M2	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,902 ± 0,044
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1,039 ± 0,090
	N <sub>2</sub>	0,226 ± 0,064
<i>Methylosinus</i> sp. M3	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,884 ± 0,031
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1,037 ± 0,105
	N <sub>2</sub>	0,467 ± 0,025
<i>Methylocystis</i> sp. M4	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,792 ± 0,102
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1,080 ± 0,050
	N <sub>2</sub>	0,155 ± 0,070
<i>Methylococcus</i> sp. M5	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,637 ± 0,190
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,869 ± 0,073
	N <sub>2</sub>	Отсутствие роста
<i>M. methanica</i> M6	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,120 ± 0,092
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,563 ± 0,021
	N <sub>2</sub>	Отсутствие роста
<i>M. trichosporium</i> M7	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,235 ± 0,118
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1,414 ± 0,172
	N <sub>2</sub>	0,511 ± 0,087
<i>M. parvus</i> M8	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,904 ± 0,024
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,986 ± 0,066
	N <sub>2</sub>	0,109 ± 0,010
<i>M. capsulatus</i> M9	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,534 ± 0,181
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,927 ± 0,056
	N <sub>2</sub>	0,264 ± 0,018

Рода *Methylomonas* и *Methylococcus* продемонстрировали наибольший прирост оптической плотности суспензии при использовании аммонийного азота в ходе инкубирования, в то время как р. *Methylocystis* и *Methylosinus* несколько лучше росли при наличии нитрат-ионов. Способность к азотофиксации была обнаружена у всех метанотрофов Па типа (M2-M4; M7-M8), а также *M. capsulatus* (M9), но не у выделенного изолята того же рода (M5), однако скорость роста при данном источнике азота оказалась значительно ниже для всех культур.

Совокупность результатов позволила установить базовые ростовые характеристики исследуемых метанотрофных микроорганизмов, что даёт возможность вести процессы культивирования чистых культур с наибольшей эффективностью, а также учитывать особенности конкретного объекта. Таким образом, оптимальными параметрами для накопления биомассы метанооксиляющими изолятами, а также дальнейшей разработки синтетических сообществ являются:

- Для M1 (*Methylomonas* sp.): 35-40 °C (оптимум 37,5 °C); pH 6,5-7,5 (оптимум 7,0); аммонийный источник азота;
- Для M2 (*Methylocystis* sp.): 25-30 °C (оптимум 27,5 °C); pH 5,5-7,0 (оптимум 6,5); нитратный источник азота;
- Для M3 (*Methylosinus* sp.): 25-30 °C (оптимум 27,5 °C); pH 6,0-7,0 (оптимум 6,5); нитратный источник азота;
- Для M4 (*Methylocystis* sp.): 25-30 °C (оптимум 27,5 °C); pH 6,0-7,0 (оптимум 6,5); нитратный источник азота;
- Для M5 (*Methylococcus capsulatus* KS-24): 35-45 °C (оптимум 40,0 °C); pH 5,5-6,0 (оптимум 5,75); аммонийный источник азота;
- Для M6 (*M. methanica*): 25-35 °C (оптимум 32,5 °C); pH 6,5-7,5 (оптимум 7,0); аммонийный источник азота;
- Для M7 (*M. trichosporium*): 25-30 °C (оптимум 27,5 °C); pH 5,5-7,0 (оптимум 6,5); нитратный источник азота;

- Для М8 (*M. parvus*): 25-30 °С (оптимум 27,5 °С); рН 6,0 – 7,0 (оптимум 6,5); нитратный источник азота;
- Для М9 (*M. capsulatus*): 40-45 °С (оптимум 42,5 °С); рН 5,5 – 6,0 (оптимум 5,75); аммонийный источник азота.

### 3.4. Влияние неметанотрофных спутников на рост бинарных сообществ

Оценку влияния неметанотрофных микроорганизмов на рост метанотрофных культур проводили согласно методике, подробно описанной в разделе 2.7. Для каждой парной ассоциации «метанотроф – неметанотроф» после трёх последовательных пассажей определяли оптическую плотность суспензии при длине волны 600 нм и рассчитывали показатель влияния как разность двоичных логарифмов нормализованных значений для ассоциации и чистой метанотрофной культуры (уравнение 2). Значения более +0,25 интерпретировали как значимое положительное влияние (стимуляция роста), значения менее –0,25 – как значимое отрицательное влияние (подавление роста). Промежуточные значения принимали за отсутствие значимого эффекта неметанотрофного микроорганизма на рост метанотрофа.

Неметанотрофные культуры сохранялись по итогам 3-го пассажа во всех парных сообществах, продемонстрировавших значимо больший показатель оптической плотности суспензии по сравнению с контрольным выращиванием чистой культуры, а их доля составляла от 10 до 25 % от общего числа клеток, что свидетельствует об образовании устойчивых ассоциаций. Результаты проведения культивирования бинарных сообществ «метанотроф-неметанотроф» указывают на различный характер взаимодействия между культурами различных групп (таблица 7). Так, исходя из полученных данных, заметна меньшая зависимость роста МОБ рода *Methylocystis* от наличия того или иного неметанотрофного микроорганизма. В тоже время, метанооксиляющие бактерии родов *Methylococcus* и *Methylosinus* (М3, М5, М7 и М9) в большей степени откликались на добавление в суспензию неметанотрофного спутника. Наибольший прирост биомассы наблюдали при

совместном культивировании изолята рода *Methylococcus* (M5) с *Brevibacillus* spp. (H13 и H18), *Cupriavidus* sp. (H14) и *Ralstonia* sp (H17); *M. trichosporium* в присутствии родов *Methylorubrum* (Met3), *Ralstonia* (H2), *Azospirillum* (H11), *Brevibacillus* (H13) и *Cupriavidus* (H14). Также отмечается положительное влияние бактерий р. *Brevibacillus* и р. *Cupriavidus* на рост большинства исследуемых парных ассоциаций вне зависимости от применяемых условий культивирования.

Таблица 7 – Скрининг бинарных ассоциаций: оценка влияния неметанотрофных микроорганизмов на накопление биомассы метанотрофным сообществом

	$\log_2(\text{ОП}_{600(\text{ассоциация})}) - \log_2(\text{ОП}_{600(\text{чистая культура})})$								
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
Met1	<b>0,261</b>	-0,193	0,124	-0,089	<i>-0,324</i>	0,138	-0,035	-0,030	<b>0,311</b>
Met2	0,128	0,230	0,054	0,017	-0,183	0,022	0,219	0,139	-0,066
Met3	-0,006	-0,095	0,230	0,173	0,042	-0,199	<b>0,567</b>	-0,033	<b>0,262</b>
Met4	<b>0,360</b>	0,059	0,126	0,211	-0,109	-0,036	0,150	0,088	0,217
H1	0,034	<i>-0,372</i>	0,106	0,085	0,021	<b>0,251</b>	-0,163	0,160	-0,035
H2	0,152	0,020	<b>0,388</b>	0,044	0,196	-0,199	<b>0,590</b>	0,038	<i>-0,292</i>
H3	<b>0,462</b>	<b>0,391</b>	-0,020	0,124	-0,030	0,073	0,098	<b>0,327</b>	0,122
H4	0,060	0,022	-0,214	0,084	0,109	0,062	0,020	-0,039	0,049
H5	-0,153	0,177	0,007	0,035	-0,029	<i>-0,320</i>	0,026	0,166	-0,103
H6	0,207	-0,053	-0,247	<b>0,294</b>	0,182	0,192	-0,088	0,128	0,041
H7	-0,052	<b>0,274</b>	0,010	-0,124	<i>-0,379</i>	0,129	-0,054	<b>0,275</b>	-0,063
H8	0,161	0,093	-0,023	0,048	0,109	-0,077	0,038	0,149	0,050
H9	<i>-0,270</i>	0,121	-0,018	0,097	0,085	0,041	<i>-0,272</i>	-0,014	0,122
H10	-0,098	0,177	0,012	-0,204	0,002	-0,064	0,192	0,020	-0,031
H11	0,011	0,194	<b>0,277</b>	0,056	<i>-0,293</i>	-0,070	<b>0,509</b>	0,102	-0,095
H12	0,105	0,028	0,109	-0,003	0,032	0,142	0,069	-0,134	0,075
H13	<b>0,505</b>	0,204	<b>0,428</b>	<b>0,319</b>	<b>0,836</b>	0,033	<b>0,687</b>	0,179	<b>0,537</b>
H14	0,026	0,189	<b>0,290</b>	0,181	<b>0,535</b>	0,173	<b>0,983</b>	0,072	<b>0,305</b>
H15	-0,105	<i>-0,279</i>	<i>-1,316</i>	<i>-0,518</i>	-0,086	0,019	<i>-0,953</i>	<i>-0,644</i>	<i>-0,324</i>
H16	-0,242	0,116	0,027	0,052	0,149	-0,018	0,161	0,197	-0,067
H17	0,188	0,082	<i>-0,268</i>	-0,160	<b>0,699</b>	<b>0,268</b>	0,059	-0,106	<b>0,440</b>
H18	<b>0,308</b>	0,237	<b>0,309</b>	-0,042	<b>0,750</b>	0,100	0,097	0,133	0,068
H19	-0,053	-0,145	0,006	0,080	0,193	-0,177	-0,055	0,046	<b>0,259</b>
H20	0,144	-0,073	0,240	0,039	<b>0,328</b>	0,024	0,200	<i>-0,256</i>	<b>0,306</b>

Примечание – Полужирным шрифтом выделены значения, соответствующие значимому положительному влиянию ( $\geq +0,25$ ); курсивом – значимому отрицательному влиянию ( $\leq -0,25$ ).

Также в ряде бинарных сообществ наблюдали значительное увеличение оптической плотности по сравнению со контрольным высевом чистых культур метанотрофов, проявляющееся только на начальном этапе эксперимента. Для пары *Methylocystis* sp. (M2) – *Methylobacterium* sp. (Met2) показатель разности двоичных логарифмов оптической плотности при 600 нм, характеризующий количество нарабатываемой биомассы относительно чистой культуры, по окончании первого пассажа был наибольшим из всех полученных значений и равнялся 1,416. Схожие результаты после первого пассажа также наблюдали для пар *Methylosinus* sp. (M3) – *Cohnella* sp. (H12) и *Methylococcus capsulatus* KS-24 – *Acinetobacter* sp. (H19) (0,957 и 0,882 соответственно по окончании первого пассажа). Однако, по итогам эксперимента (3-го пересева) для данных бинарных сообществ разница с чистой культурой не являлась значимой, а доля неметанотрофного спутника на основании подсчёта клеток в поле зрения не превосходила 5 %, что указывает на неустойчивость выбранных ассоциаций в рамках низкого видового разнообразия. Данные результаты могут быть использованы в дальнейшем при разработке сообществ более высокого порядка, но не рассматривались в рамках текущей работы.

Полученные результаты указывают на то, что положительный вклад гетеротрофа в увеличение наработки биомассы бинарным сообществом требует детального рассмотрения потенциальных трофических путей взаимодействия между метанотрофной и неметанотрофной культурой. Так, р. *Brevibacillus*, обнаруженный также в сообществах в ходе промышленного культивирования *M. capsulatus*, отличается ростом на широком спектре углеродсодержащих субстратов, способен метаболизировать формальдегид, соли органических кислот (в том числе ацетат) и аминокислоты, которые могут высвободиться в ходе жизнедеятельности и лизиса клеток МОБ [15, 286, 326]. Повышенный уровень накопления метанотрофной биомассы родственными р. *Ralstonia* и р. *Cupriavidus*, относимых к семейству *Burkholderiaceae*, может быть объяснён двумя причинами. Во-первых, многие представители данных родов демонстрируют рост на формальдегиде, формиате, и других органических кислотах, потенциально выделяемых метанооксиляющими бактериями, тем самым снижая их ингибирующее воздействие

на доминирующую культуру, что также подтверждается упоминанием образования устойчивых ассоциаций с метанонокисляющими бактериями [327-328]. Во-вторых, ряд микроорганизмов рассматриваемых групп, например *Cupriavidus necator*, способны к автотрофному росту в отсутствие доступных источников органического углерода, что может характеризовать их как сопутствующих участников метанотрофного сообщества, не образующих тесных трофических связей с МОБ [329-330]. Несмотря на возможность независимого роста данных культур в присутствии метанотрофов, существует перспектива их применения для получения таких ценных биологически активных соединений в составе сообщества, как белки и ПГБ, [331-332]. Более того, среди *Cupriavidus* и *Ralstonia* встречается значительное количество денитрифицирующих представителей, которые, как было установлено, тесно взаимодействуют с МОБ в процессах обмена азота, что может быть наиболее выражено при использовании солей нитрата в составе питательных сред [333-334]. Также отмечается устойчивый рост метанотрофных ассоциации изолята и коллекционной культурой рода *Methylosinus* с выделенными азотофиксирующими *Azospirillum* sp. Метаболические пути азоспирилл, часто обнаруживаемых в природных метанонокисляющих сообществах, позволяют потреблять органические кислоты (ацетат, лактат, малат, фумарат и сукцинат), а также такие продукты окисления метана как формиат, формальдегид и в меньшей степени метанол [29, 286, 335.]. По итогам исследования не было обнаружено закономерности взаимодействия между метилотрофными и метанотрофными микроорганизмами – наблюдалась как стимуляция роста ассоциации (наиболее выражено в присутствии МОБ Ia и Ib типа), так и отсутствие эффекта или даже подавление роста сообщества. Вероятно, в паре «метанотроф – метилотроф» скорость роста ассоциации находится в сильной зависимости от способности бактерий, окисляющих метан, распределять метаболические потоки пути ассимиляции метана, компенсировать потери секретлируемого в культуральную жидкость метанола ростом активности ММО, а также вкладом метанонокисляющих бактерий в совместные циклы обмена веществ [204, 288-289]. Полученные данные указывают на крайне индивидуальных характер

взаимодействий между рассматриваемыми группами микроорганизмов, который может в значительной степени меняться от организма к организму даже внутри одного отдельно взятого рода.

Ещё одним наблюдением является отсутствие выраженного отрицательного влияния всех неметанотрофных микроорганизмов на рост метанооксиляющей бактерии, с которой они сосуществовали в накопительной культуре (за исключением р. *Nocardia*), что указывает на преобладание нейтральных и положительных связей между участниками устойчивых метанооксиляющих сообществ. Снижение актиномицетами темпов роста ассоциаций может быть обусловлено выделением в ростовую среду антибиотических веществ, подавляющих рост метанотрофной культуры, хотя польза, получаемая гетеротрофной культурой от антагонистических отношений, требует дополнительных исследований [336].

### 3.5. Создание трёхсоставных сообществ

Неметанотрофные культуры, продемонстрировавшие значимый положительный вклад в рост метанотрофной ассоциации были попарно совмещены для культивирования с соответствующим метанотрофом. Перечень продуктивных трёхсоставных сообществ, представленный в таблице 8, указывает, что только некоторые комбинации спутников демонстрируют аддитивное влияние на наработку биомассы в ходе культивирования смешанных сообществ, в то время как остальные композиции продемонстрировали характеристики, сходные с бинарными сборками.

Из полученных данных видно, что значительный прирост оптической плотности чаще всего наблюдался при совмещении бактерий таких родов, как *Brevibacillus*, *Ralstonia* и *Cupriavidus*. Примечательно, что наличие родственных гетеротрофов родов *Brevibacillus* в составе одной трёхсоставной ассоциации практически не изменяло показатели роста по сравнению с их попарным культивированием с МОБ. Данное явление может быть объяснено конкуренцией

неметанотрофных микроорганизмов за доступ к продуктам синтеза и лизиса метанотрофных бактерий, количество и доступность которых не позволяет интенсивно расти одновременно двум претендующим на них видам. Во многих других случаях совмещение гетеротрофов не привело к значимому росту ассоциаций, что указывает также на наличие дополнительных воздействий между двумя спутниками, и на необходимость детальных исследований связи всех участников метанооксиляющего сообщества.

Таблица 8 – Продуктивные трёхсоставные сообщества

Метанотрофный микроорганизм	Композиция неметанотрофных спутников	Оценка роста в сравнении с чистой культурой
<i>Methylomonas</i> sp. (M1)	Met1 + H13	0,627
<i>Methylosinus</i> sp. (M3)	H14 + H18	0,722
<i>Methylococcus</i> sp. (M5)	H13 + H17	1,526
<i>Methylosinus trichosporium</i> (M7)	H11 + H13	1,048
	H2 + H14	1,432
<i>Methylococcus</i> sp. (M9)	H13 + H19	0,741
	H17 + H20	0,678

Из созданных ассоциаций было отобрано два высокопродуктивных трёхсоставных сообщества, характеризующихся значительным ростом оптической плотности суспензии, и следовательно, приростом биомассы. Выбранные ассоциации состояли из изолята *Methylococcus* sp. (M5) с *Brevibacillus* sp. (H13) и *Ralstonia* sp. (H17), а также из коллекционного штамма *Methylosinus trichosporium* (M7) с *Ralstonia* sp (H2) и *Cupriavidus* sp. (H14). Для простоты интерпретации в ходе дальнейших исследований данным ассоциациям был присвоен шифр MC5 (Methanotrophic Community 5) и MC7 (Methanotrophic Community 7). Соответственно, базовой ростовой средой на основании наиболее подходящего источника минерального азота для дальнейшей оптимизации MC5 была выбрана AMS, а для MC7 – NMS.

### 3.6. Оптимизация сред для накопления биомассы синтетическими метанотрофными сообществами

Были определены концентрации  $\text{Cu}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ; метанола, соотношения C/N и доли  $\text{CH}_4$ , а также источник и концентрация минерального азота в среде, способствующие максимальному накоплению биомассы синтетическими сообществами MC5 и MC7.

Значения оптимальных концентраций меди в ростовой среде различались между выбранными метанотрофными сообществами (рисунок 6-7).

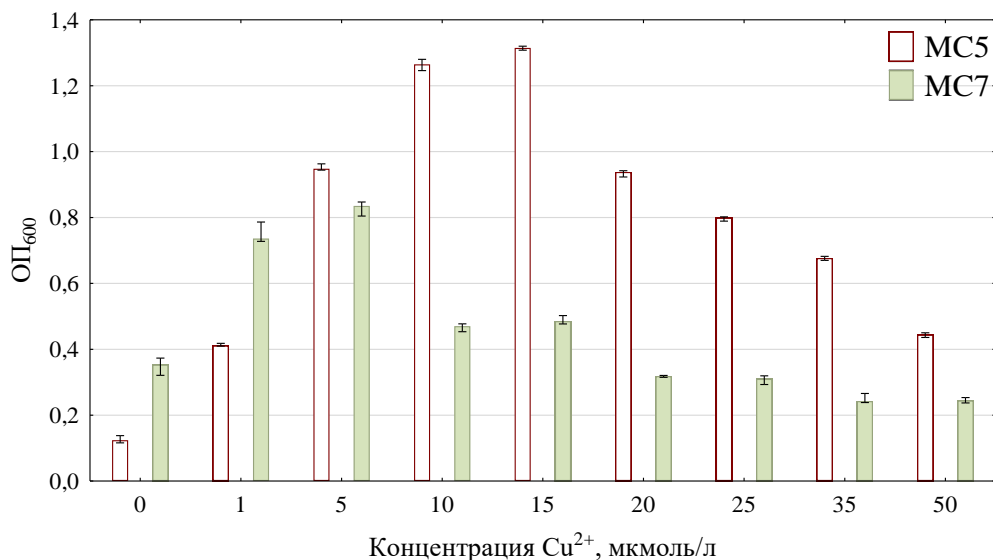


Рисунок 6 – Влияние содержания меди на накопление биомассы сконструированными сообществами

Так, содержание ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , способствующее наибольшему росту ассоциации на основе *Methylococcus* sp. (10-15 мкмоль/л), превысило более, чем в два раза оптимальный показатель для ассоциации с *Methylosinus trichosporium*, находящийся в диапазоне 1-5 мкмоль/л. Данное различие может быть обусловлено различной способностью метанотрофных бактерий, составляющих искусственные ассоциации, интенсифицировать синтез растворимой метанмонооксигеназы (pММО) в ответ на повышение концентрации ионов меди в среде, что приводит к большей скорости окисления метана клетками, и, как следствие, большей скоростью их роста [99, 337].

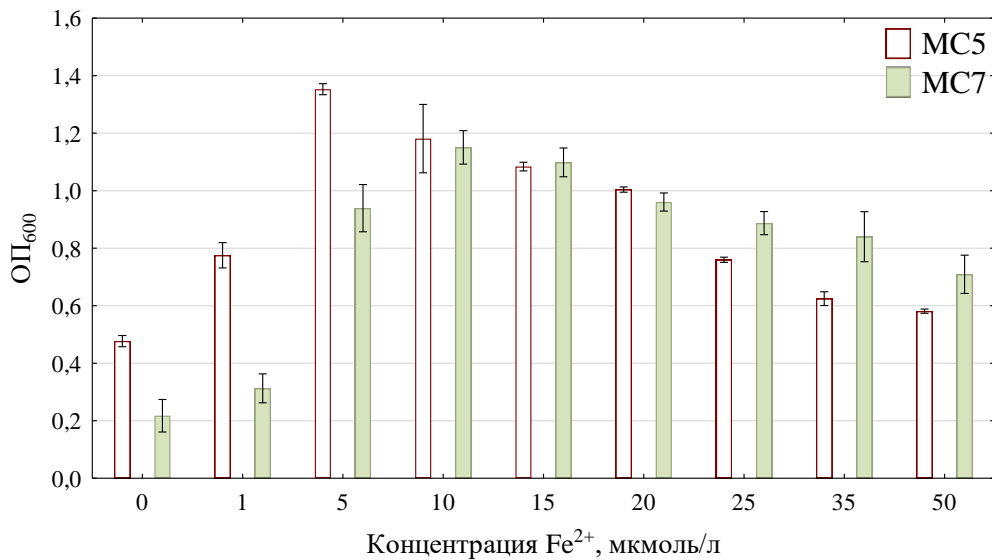


Рисунок 7 – Влияние содержания железа на накопление биомассы сконструированными сообществами

В ходе исследования оптимального содержания ионов железа в ростовой среде не наблюдали столь выраженного влияния концентрации на рост ассоциаций. Наибольшее накопление биомассы наблюдали при 5-10 и 10-15 мкмоль Fe<sup>2+</sup>/л для MC5 и MC7 соответственно, при этом отсутствие данного соединения практически полностью подавляло рост всего сообщества.

Синтетическое сообщество MC5 продемонстрировало большую зависимость от концентрации кальция в среде: рост консорциума наблюдали при содержании Ca<sup>2+</sup> более 20 мкмоль/л с оптимумом в диапазоне 80-120 мкмоль/л и значительном ингибировании при 200 мкмоль/л. Для сообщества MC7, составленного на основе р. *Methylosinus*, концентрация 60-100 мкмоль/л данного иона в среде привела к наибольшему накоплению биомассы, а более высокие и низкие значения не оказывали столь сильного эффекта по сравнению с MC5, что отображено на рисунке 8. Подавление роста культур при дефиците кальция связано с необходимостью наличия данного иона для работы фермента метанолдегидрогеназы, и, следовательно, ассимиляции метана метанотрофами [56].

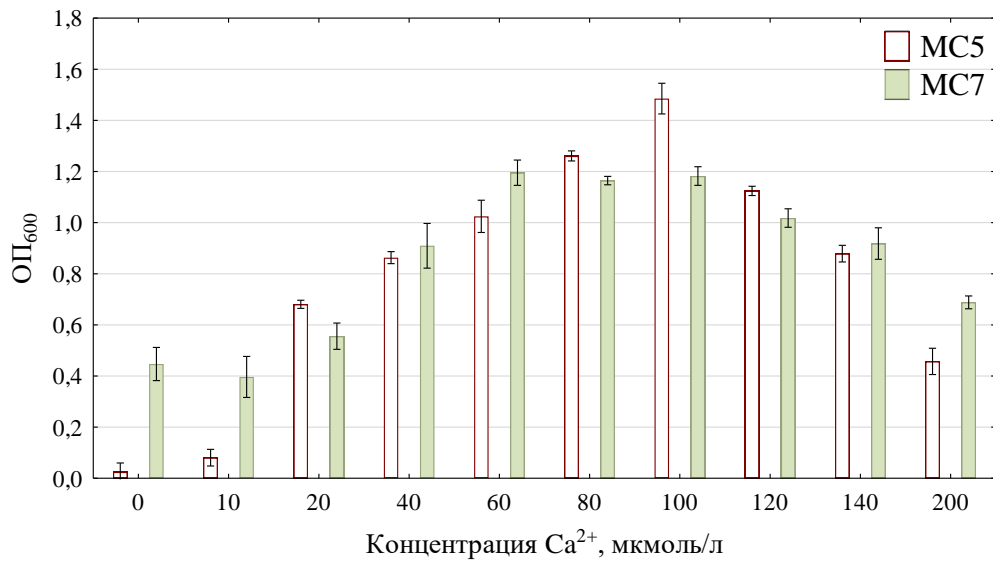


Рисунок 8 – Влияние содержания кальция на накопление биомассы сконструированными сообществами

Установлена необходимость наличия ионов магния в ростовой среде, что подтверждается снижением оптической плотности суспензий обоих сообществ (рисунок 9).

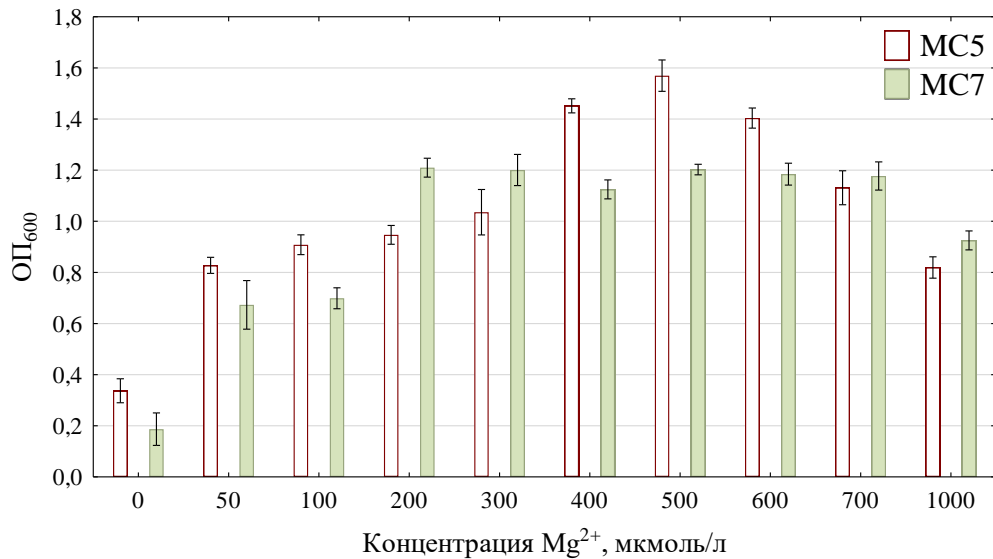


Рисунок 9 – Влияние содержания магния на накопление биомассы сконструированными сообществами

При этом ингибирование роста ассоциаций избытком  $Mg^{2+}$  не было выраженным в исследуемом диапазоне концентраций. Оптимальное содержание магния для МС5 составило 400-600 мкмоль/л, а для МС7 практически идентичная оптическая плотность суспензии сообщества сохранялась в широком диапазоне от 200 до 700 мкмоль/л.

Небольшие концентрации метанола (до 10-20 ммоль/л) незначительно стимулировали рост сконструированных метанотрофных сообществ, однако дальнейшее увеличение концентрации данного соединения в ростовой среде значительно подавляло накопление биомассы в ходе культивирования (рисунок 10). Данное явление может быть вызвано как ингибирующим воздействием метанола на самих участников сообщества (одного или нескольких), так и изменением путей обмена веществ между организмами-спутниками и метанотрофной культурой ввиду появления в среде дополнительного источника углерода. Полученные результаты подтверждают утверждение, что реакция синтетических сообществ на добавление органических субстратов находится в сильной зависимости от состава созданной ассоциации, индивидуальных ростовых характеристик его участников, а также их взаимного влияния друг на друга [204, 256].

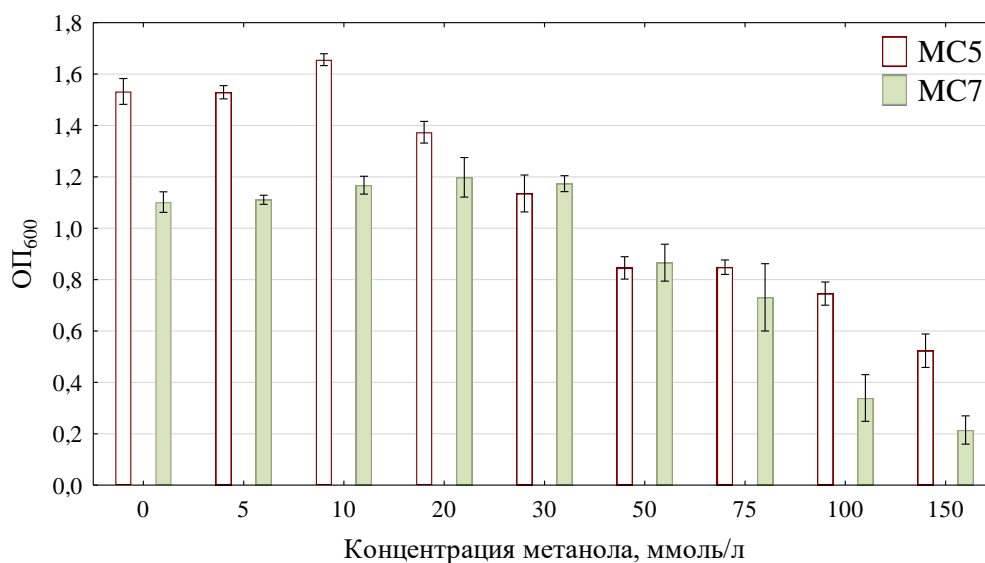


Рисунок 10 – Влияние содержания метанола на накопление биомассы сконструированными сообществами

Важными факторами, влияющими на процесс подбора оптимального состава газовой среды в ходе культивирования МОБ, выступают количество метана в качестве углеродсодержащего субстрата и доля кислорода, необходимого для осуществления процессов окисления метанотрофами и находящимися в сообществе неметанотрофами. Было установлено, что при содержании метана 25-30 % для MC5 и 30 % для MC7 от объёма метановоздушной смеси исследуемые сообщества демонстрируют наибольший уровень накопления биомассы в суспензии (рисунок 11). 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 [81].

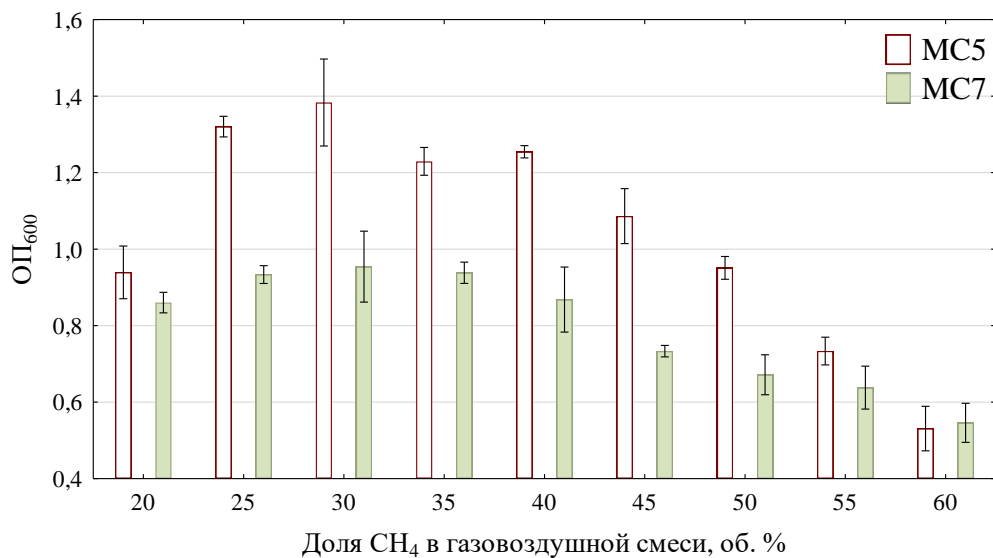


Рисунок 11 – Влияние доли метана на накопление биомассы сконструированными сообществами

По результатам проведения двухфакторной оптимизации, построения поверхности отклика и описывающего её уравнения регрессии было установлено, что для ассоциации MC7 сочетание обоих источников минерального азота в соотношении нитрат: аммоний около 4,2:1 (что соответствует максимуму функции

отклика при 9,40 ммоль  $\text{NO}_3^-$  и 2,23 ммоль  $\text{NH}_4^+$  в литре ростовой среды) наилучшим образом сказывается на показателе накопления биомассы (рисунок 12). Все анализируемые переменные уравнения, включая линейное парное взаимодействие факторов, оказались значимыми. В соответствии с построенной поверхностью выраженное ингибирование роста ассоциации МС7 источником азота наблюдается при суммарной концентрации ионов более 30 ммоль/л, что также подтверждается значением  $p\text{-value} < 0,05$  для квадратичного вклада обоих ионов, при этом  $\text{NH}_4^+$  в большей степени при высоком содержании подавлял рост культивируемой ассоциации.

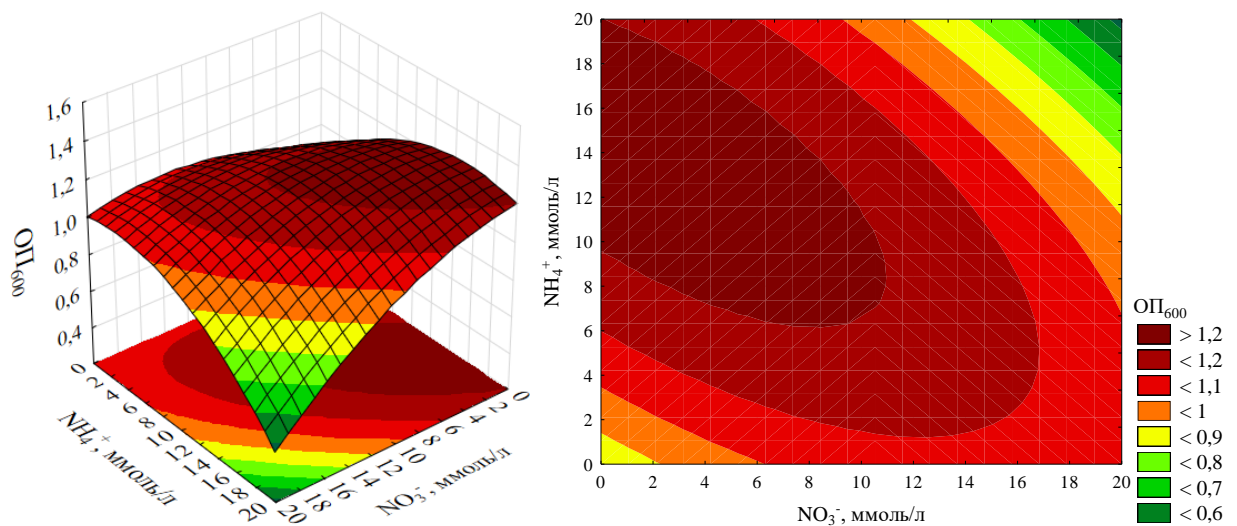


Рисунок 12 – Влияние концентрации и источника азота на рост метанотрофного сообщества МС7

Для синтетического сообщества на основе *M. capsulatus* (M5) наиболее предпочтительным источником азота выступал аммоний (рисунок 13), а низкие концентрации как  $\text{NO}_3^-$ , так и  $\text{NH}_4^+$ , в большей степени по сравнению с сообществом МС7 ограничивали рост ассоциации. Было установлено, что содержание аммония в среде в отсутствие нитратов, либо при мольном соотношении нитрат: аммоний в диапазоне 1:6-1:7 (максимум функции отклика при 13,61 ммоль  $\text{NH}_4^+$ /л и 2,08 ммоль  $\text{NO}_3^-$ /л) позволяет достичь наибольшей возможной оптической плотности суспензии. Важно отметить отсутствие

выраженного ингибирования в исследуемом диапазоне при увеличении концентрации источников азота в среде, что с учётом результатов для МС7, указывает на высокую специфичность применяемых параметров для конкретно взятых метаноокисляющих бактерий и композиций на их основе.

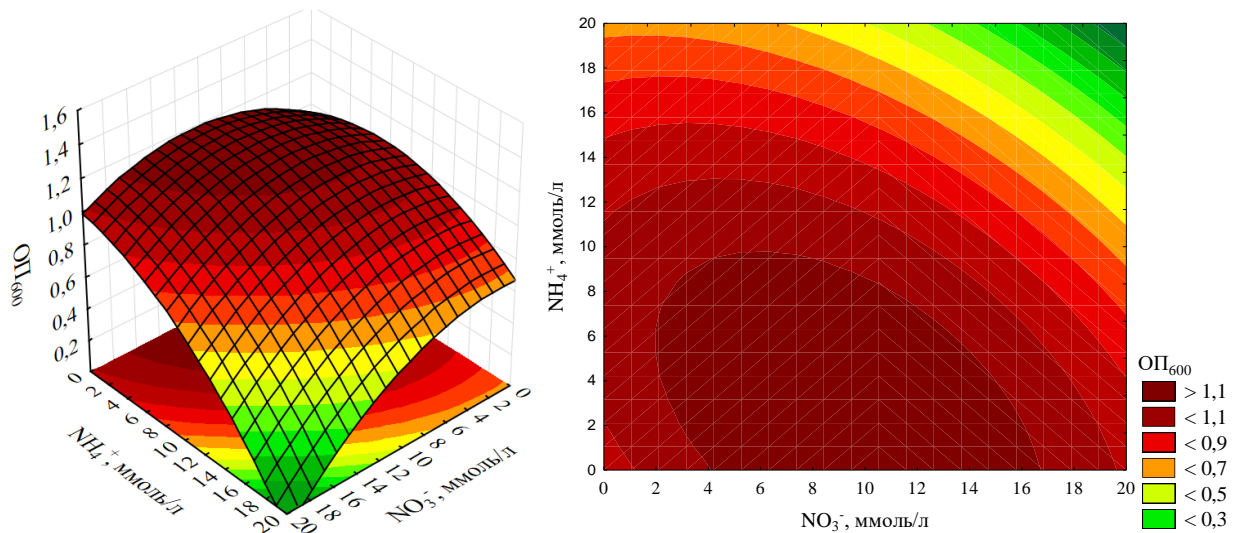


Рисунок 13 – Влияние концентрации и источника азота на рост метанотрофного сообщества МС5

На основании ранее проведённого определения оптимальной мольной пропорции  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  в среде (1:6,5 и 4,2:1 для МС5 и МС7 соответственно), а также доли метана в газовой смеси для каждого из сообществ был проведён эксперимент по установлению соотношения углерода к азоту, результаты которого представлены на рисунке 14. Установлено, что показатель C/N, равный 5 для МС5 и 5-10 для МС7 соответствует максимальному росту сконструированных метанотрофных сообществ. Полученные значения позволяют установить оптимальные концентрации нитрата и аммония: для МС5 – 13,09 ммоль  $\text{NH}_4^+$ /л и 2,00 ммоль  $\text{NO}_3^-$ /л; для МС7 – 1,25 ммоль  $\text{NH}_4^+$ /л и 5,28 ммоль  $\text{NO}_3^-$ /л. Для метаноокисляющей ассоциации МС7, основанной на культуре *M. trichosporium*, отмечается сохранение темпов роста при C/N более 40:1, что обусловлено возможным переходом на процессы азотфиксации, присущие метаноокисляющим бактериям II типа.

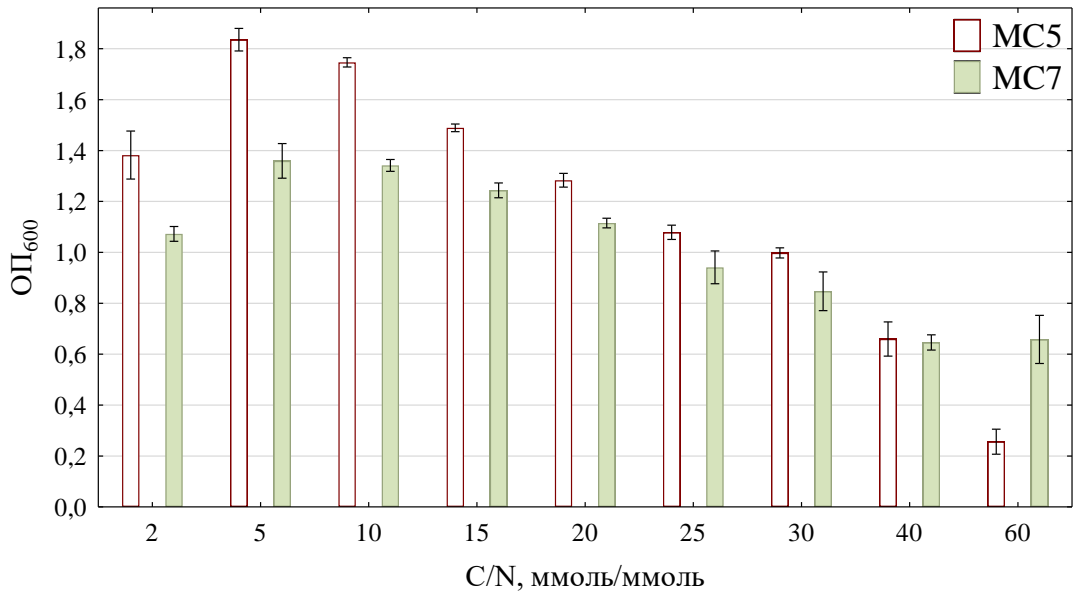


Рисунок 14 – Оптимальное соотношение C/N для исследуемых синтетических сообществ

Проведённые исследования позволили определить оптимальный состав ростовых сред для периодического режима культивирования (с учётом неоптимизированных компонентов).

- Для композиции MC5 (*Methylococcus* sp. (M5), *Brevibacillus* sp. (H13), *Ralstonia* sp. (H17)) в расчёте на 1 литр среды: 0,20 г KNO<sub>3</sub>; 0,70 г NH<sub>4</sub>Cl; 0,12 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,015 г CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,526 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,048 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O; 0,5 мг Na<sub>2</sub>ЭДТА; 2,81 мг CuCl<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O; 2,09 мг FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,03 мг H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,01 мг ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,02 мг CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,003 мг MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; 0,002 мг NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,003 мг Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 0,2 мл метанола; 27,5 % доля CH<sub>4</sub> в газовой смеси.
- Для композиции MC7 (*Methylosinus trichosporium* (M7), *Ralstonia* sp (M2), *Cupriavidus* sp. (H14)) в расчёте на 1 литр среды: 0,53 г KNO<sub>3</sub>; 0,07 г NH<sub>4</sub>Cl; 0,06 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,01 г CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,455 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,234 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O; 0,5 мг Na<sub>2</sub>ЭДТА; 0,56 мг CuCl<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O; 3,48 мг FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,03 мг H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,01 мг ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,02 мг CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,003 мг MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; 0,002 мг NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,003 мг Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 0,5 мл метанола; 30,0 % доля CH<sub>4</sub> в газовой смеси.

Завершающим этапом оптимизации явилось сравнительное исследование ростовых характеристик чистых и накопительных культур, а также

сконструированных синтетических сообществ на разработанных питательных средах в сопоставлении с исходными (неоптимизированными) составами. Целью данного этапа являлась комплексная оценка эффективности проведённой оптимизации и выявление преимуществ, достигаемых при использовании синтетических сообществ в условиях периодического культивирования.

### 3.7. Периодическое культивирование синтетических сообществ на средах оптимизированного состава

Результаты сравнительного культивирования в периодических условиях демонстрирую значительное увеличение как максимальной удельной скорости роста в экспоненциальной фазе для обеих сконструированных ассоциаций и чистых культур, так и максимального накопления биомассы сообществом (таблица 9).

Таблица 9 – Результаты оптимизации состава ростовой среды и газовой фазы

Метанотрофная культура или ассоциация	г АСВ /л (стандартная среда)	г АСВ /л (оптимизированная среда)	$\mu_{\max}$ (стандартная среда), ч <sup>-1</sup>	$\mu_{\max}$ (оптимизированная среда), ч <sup>-1</sup>
Исходное сообщество №5	0,42 ± 0,04	0,57 ± 0,05	0,20	0,26
<i>M. capsulatus</i> KS-24 (M5)	0,37 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,18	0,23
MC5	0,48 ± 0,01	0,66 ± 0,03	0,24	0,32
<i>Methylosinus trichosporium</i> (M7)	0,28 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,12	0,14
MC7	0,33 ± 0,02	0,45 ± 0,01	0,15	0,20

Полученные значения также подтверждают преимущество применения синтетических сообществ по сравнению с несконструированными накопительными культурами, где рост сообщества может быть ограничен отрицательным вкладом ряда гетеротрофных представителей. При увеличении

масштабов культивирования с культуральных планшетов до колб сообщество МС5 превосходило исходное, из которой метанотроф *M. capsulatus* KS-24 был выделен, на 17% по максимальной удельной скорости роста, а также на 13% по концентрации биомассы до проведения оптимизации. Также наблюдали превосходство сконструированных сообществ по удельной скорости роста на 22-25 % и по накоплению биомассы на 13-20 % относительно чистых культур. Результаты демонстрируют положительный эффект оптимизации состава среды на ростовые показатели сообщества более чем на 25 % для МС5 и МС7. Улучшение для чистых метаноокисляющих микроорганизмов было выражено не так сильно (рост на 10-15 %), но также является показателем успешно проведённой разработки состава среды. Таким образом, применённый подход к оптимизации ростовых сред и условий культивирования позволяет значительно повысить наработку биомассы метаноокисляющими бактериями и синтетическими сообществами на их основе и может применяться для повышения эффективности процесса культивирования МОБ.

### 3.8. Состав биомассы сконструированных сообществ

Проведённые аналитические исследования указывают на существенные различия в составе биомассы между созданными синтетическими ассоциациями, что согласуется с принадлежностью отобранных МОБ к различным типам (таблица 10). Так, ассоциация МС5 продемонстрировала значительное содержание белка и сравнительно небольшое для бактерий количество нуклеиновых кислот в биомассе, позволяющее рассматривать её в качестве потенциального продуцента высокобелковых продуктов. Сообщество МС7 не продемонстрировало повышенного уровня синтеза рассматриваемых соединений, что вероятно, связано со специфическими условиями культивирования МОБ II типа, при которых возможное повышенное содержание в клетке таких веществ, как ПГБ, связано с неоптимальным составом среды.

Таблица 10 – Состав биомассы ассоциаций в оптимальных условиях роста

Анализируемый показатель	МС5	МС7
Сырой протеин (по Кьельдалю), % от АСВ	71,62 ± 1,54	63,40 ± 1,10
Белок по Лоури, % от АСВ	63,43 ± 0,37	56,92 ± 1,37
Нуклеиновые кислоты, % от АСВ	8,21 ± 0,13	8,10 ± 0,50
Полигидроксибутират, % от АСВ	0,12 ± 0,04	3,25 ± 0,11
Сахара, % от АСВ	6,32 ± 1,09	4,5 ± 0,80
Экзополисахариды, г/г АСВ	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,01

### 3.9. Оптимизация синтеза ценных биологически активных веществ синтетическими ассоциациями

Проведённые одновременно с оптимизацией ростовой среды аналитические исследования состава нарабатываемой биомассы синтетических метанотрофных сообществ позволили установить условия, способствующие максимальному синтезу белков, ПГБ и внеклеточных полисахаридов. Обнаружено, что состав среды, оптимизированной для накопления биомассы, в значительной степени соответствует наибольшему содержанию белка в метанооксиляющих сообществах (таблица 11).

Таблица 11 – Оптимизация факторов, влияющих на накопление белка в биомассе

Оптимизируемый фактор	Единицы измерения	МС5		МС7	
		Оптимальное значение фактора	% сырого протеина от АСВ	Оптимальное значение фактора	% сырого протеина от АСВ
Cu <sup>2+</sup>	мкмоль/л	20	74,85	5	64,34
Fe <sup>2+</sup>		5	74,92	12,5	62,68
Ca <sup>2+</sup>		100	73,12	80	65,58
Mg <sup>2+</sup>		700	73,48	600	63,87
СН <sub>3</sub> ОН	ммоль/л	0	74,05	15	62,99
СН <sub>4</sub>	%	30,0	72,69	30,0	65,81
Источник азота	ммоль NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / ммоль NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1/7	76,29	1/3	65,69
С/Ν	моль/моль	5	72,88	5	65,52

Заметные отличия были обнаружены в значениях концентрации меди, магния и метанола для МС5, а также концентрации магния, соотношении источников азота и доли метана для МС7. Важно отметить, что наиболее значимое влияние на содержание белка в биомассе ассоциации МС7 оказало преимущественное наличие аммония вместо нитрата. Изменение состава оптимизированной ростовой среды с целью увеличения содержания белка в биомассе привело к частичному снижению скорости роста сообществ (на 12,5 % для МС5 и на 15 % для МС7).

Разработка состава среды в соответствии с данными значениями позволила достичь следующих показателей:

- Для МС5 содержание сырого протеина увеличилось до  $76,45 \pm 0,28$  %, а белка по Лоури до  $68,02 \pm 0,11$  % при максимальной удельной скорости роста сообщества  $0,28 \text{ ч}^{-1}$ .

Таким образом, среда для синтетического метанотрофного сообщества МС5 с целью получения высокобелковой биомассы имела следующий состав (в расчёте на 1 литр среды):  $0,102 \text{ г KNO}_3$ ;  $0,376 \text{ г NH}_4\text{Cl}$ ;  $0,173 \text{ г MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,015 \text{ г CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,526 \text{ г KH}_2\text{PO}_4$ ;  $0,048 \text{ г Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ ;  $0,5 \text{ мг Na}_2\text{ЭДТА}$ ;  $4,89 \text{ мг CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $1,39 \text{ мг FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,03 \text{ мг H}_3\text{BO}_3$ ;  $0,01 \text{ мг ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,02 \text{ мг CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,003 \text{ мг MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,002 \text{ мг NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,003 \text{ мг Na}_2\text{MoO}_4$ ; 30,0 % доля  $\text{CH}_4$  в газовой смеси.

- Для МС7 содержание сырого протеина увеличилось до  $66,23 \pm 0,58$  %, а белка по Лоури до  $60,71 \pm 0,51$  % при максимальной удельной скорости роста сообщества  $0,17 \text{ ч}^{-1}$ .

Среда для синтетического метанотрофного сообщества МС7 предназначенная для получения высокобелковой биомассы имела следующий состав (в расчёте на 1 литр среды):  $0,203 \text{ г KNO}_3$ ;  $0,322 \text{ г NH}_4\text{Cl}$ ;  $0,148 \text{ г MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,012 \text{ г CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,455 \text{ г KH}_2\text{PO}_4$ ;  $0,234 \text{ г Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ ;  $0,5 \text{ мг Na}_2\text{ЭДТА}$ ;  $1,22 \text{ мг CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $3,48 \text{ мг FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,03 \text{ мг H}_3\text{BO}_3$ ;  $0,01 \text{ мг ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,02 \text{ мг CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,003 \text{ мг MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,002 \text{ мг NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,003 \text{ мг Na}_2\text{MoO}_4$ ;  $0,61 \text{ мл метанола}$ ; 30,0 % доля  $\text{CH}_4$  в газовой смеси.

Состав биомассы, в первую очередь для содержащей *Methylococcus* sp. ассоциации МС5, является сопоставимым с промышленными метанотрофными культурами, используемыми для синтеза одноклеточного белка, и может рассматриваться как их прямая альтернатива. Композиция МС7 является менее привлекательной в первую очередь из-за более низкой скорости роста.

Подбор оптимальных условий культивирования для получения наибольшего количества полигидроксibuтирата в получаемой биомассе обнаружил лишь незначительное увеличение доли ПГБ (не более 4 %) при использовании безазотной среды для ассоциации МС5. Данный факт обусловлен отсутствием необходимых метаболических путей у *M. capsulatus* для синтеза данного биополимера, а его принципиальное наличие в составе биомассы вызван способностью к накоплению ПГБ неметанотрофными участниками синтетического сообщества. Напротив, для синтетического сообщества МС7 процесс оптимизации позволил значительно увеличить содержание данного соединения, которое в значительном количестве наблюдали по результатам окрашивания фиксированных препаратов Суданом чёрным Б, на микрофотографиях которых заметны чётко различимые тёмные вкрапления внутри клеток (рисунок 15 а-б).

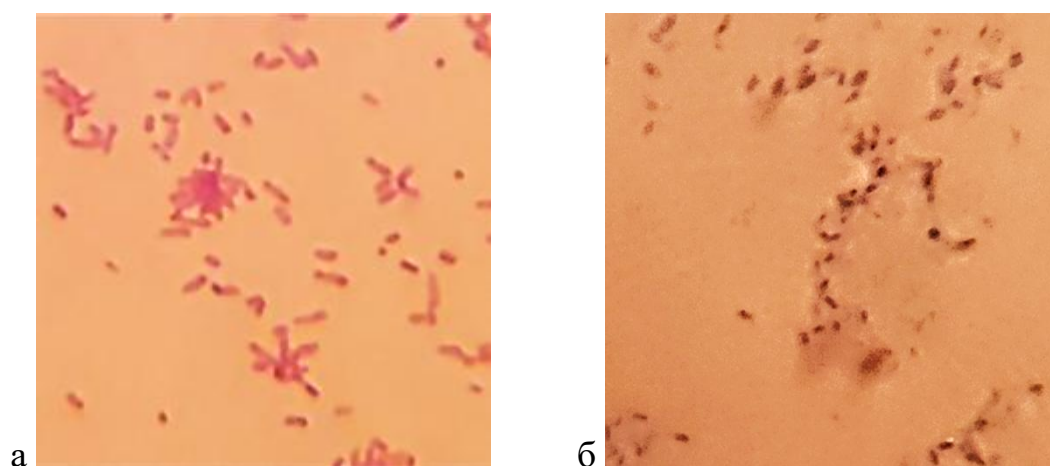


Рисунок 15 – ПГБ в клетках ассоциации МС7. а – начало эксперимента; б – окончание эксперимента при культивировании на среде, оптимизированной для синтеза ПГБ

Наличие источников азота и, следовательно, соотношение C/N оказало наибольшее влияние на способность микробной композиции накапливать ПГБ (таблица 12). Так, сопоставимые результаты были получены при использовании среды, не содержащей минеральный азот и среды с нитратом в качестве единственной азотсодержащей соли при соотношении C/N около 60:1.

Таблица 12 – Оптимизация факторов, влияющих на накопление ПГБ в биомассе синтетического сообщества МС7

Оптимизируемый фактор	Единицы измерения	Оптимальное значение фактора
Cu <sup>2+</sup>	мкмоль/л	10
Fe <sup>2+</sup>		12,5
Ca <sup>2+</sup>		80
Mg <sup>2+</sup>		400
CH <sub>3</sub> OH	ммоль/л	25
CH <sub>4</sub>	%	30
Источник азота	ммоль NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / ммоль NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Только нитрат либо отсутствие минеральных источников азота
C/N	моль/моль	≥ 60/1

Доля метана в газовой среде, концентрация метанола и ионов меди также значительно коррелировали с количеством целевого биополимера, содержание которого достигало 39,7 % от АСВ биомассы в периодическом режиме. Вероятно, за синтез ПГБ в ассоциации МС7 отвечает не только *M. trichosporium*, но и спутник рода *Cupriavidus*, представители которого используются для получения производных полигидроксиалканоата в крупнотоннажных процессах. Удельная скорость роста синтетического сообщества МС7 при оптимальных для синтеза ПГБ условиях оказалась значительно ниже подобранной для накопления биомассы и составила 0,07 ч<sup>-1</sup>, что указывает на необходимость рассмотрения для получения микробного ПГБ двухстадийной схемы культивирования, состоящей из первоначального создания условий, обеспечивающих наибольшую наработку бактериальной биомассы с дальнейшим переходом на накопления в ней целевого биополимера.

Таким образом, оптимизированная среда для синтетического метанотрофного сообщества МС7, позволяющая накапливать наибольшее количество полигидроксibuтирата в клетках, имела следующий состав (в расчёте на 1 литр среды): 0,045 г  $\text{KNO}_3$  или отсутствие минеральных источников азота; 0,099 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,012 г  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,455 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,234 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 мг  $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ ; 2,45 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  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 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  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ; 1,01 мл метанола; 30,0 % доля  $\text{CH}_4$  в газовой смеси.

Проведение оптимизации синтеза экзополисахаридов не привело к значимому увеличению синтеза данных соединений в культуральную жидкость и составило 0,10-0,13 г сахаров / г АСВ для МС5 при соотношении С/Н более 40 и 0,08-0,10 г сахаров / г АСВ для МС7 при соотношении С/Н более 30, в то время как остальные факторы в анализируемых диапазонах никак не повлияли на функцию отклика. Данный факт может быть обусловлен несколькими причинами. Во-первых, секреции ЭПС могут способствовать иные специфические условия культивирования, например, осмотический стресс, не исследуемый в данной работе. Во-вторых, концентрация ЭПС может быть ниже действительного уровня выработки из-за потребления данного вещества гетеротрофными участниками сообщества, что потенциально может ограничить область применения метанотрофных ассоциаций в данной области биотехнологии.

Таким образом, в ходе проведённых исследований были оптимизированы составы питательных сред, обеспечивающих направленное на накопление биомассы или целевых соединений культивирование разработанных синтетических метанотрофных ассоциаций в периодическом режиме. Важно отметить, что данные среды могут быть использованы не только на этапе подготовки инокулята для высокопроизводительных непрерывных процессов, но и непосредственно в ходе самого непрерывного культивирования, что будет продемонстрировано в следующем разделе работы.

### 3.10. Культивирование синтетических сообществ в непрерывном режиме

Результаты непрерывного культивирования свидетельствуют о принципиальной возможности высокоэффективной направленной наработки биомассы метанотрофного сообщества во всех рассмотренных условиях (таблица 13-14). Эффективность процесса в наибольшей степени зависела от условий стерильности и состава оптимизированной среды, и принципиально различалась для разработанных синтетических сообществ МС5 и МС7.

Для метанотрофной ассоциации, содержащей *M. capsulatus* KS-24 в составе сообщества МС5, наибольшей скорости разбавления и концентрации АСВ удалось достичь при применении среды, оптимизированной для наработки биомассы. В стерильных условиях на метане высокой чистоты и протоке  $0,27 \text{ ч}^{-1}$  концентрация АСВ достигала  $10,06 \pm 1,18 \text{ г/л}$ , а содержание сырого протеина составило  $73,72 \pm 1,59 \%$ . Замена чистого метана на технический во всех рассмотренных условиях приводила к незначительному снижению концентрации биомассы и содержания белка, что указывает на высокую устойчивость сообщества при наличии примесей, присутствующим в техническом газе. При культивировании в нестерильных условиях на той же среде концентрация биомассы и содержание белка в аналогичном диапазоне, однако время выхода на стабильный непрерывный режим возрастало по сравнению со стерильным процессом. При использовании среды, оптимизированной для увеличения доли белка в биомассе, содержание сырого протеина увеличивалась и достигала  $75,64 \pm 2,42 \%$ , в то время как концентрация биомассы снижалась до  $9 \text{ г/л}$ , а время выхода на стабильный режим значительно увеличивалось. Важно отметить, что использование среды, оптимизированной для накопления биомассы, обеспечивает не только высокую продуктивность, но и наибольшую стабильность процесса, которая при переходе на технический метан и нестерильные условия сохранялась на высоком уровне, что открывает перспективы для снижения эксплуатационных затрат для обеспечения асептики. Сравнение с результатами для культивирования сообщества на основе ВСБ-874 показывает существенное превосходство синтетического сообщества МС5 по основным

показателям. Наблюдалось сокращение времени достижения хемостатного режима в 1,1–1,6 раза, а процесс характеризовался более высокой стабильностью, что подтверждается значительно меньшим разбросом концентрации биомассы относительно среднего значения.

В случае ассоциации МС7 наблюдается крайне выраженное влияние выбора ростовой среды: максимальная скорость разбавления при значимом содержании полигидроксibuтирата в биомассе составляла 40 % от аналогичного показателя для среды, оптимизированной для накопления микробной массы, а концентрация АСВ оказалась ниже более чем на 45 %. Как было указано ранее, активный синтез полигидроксibuтирата связан с неоптимальными условиями роста МОБ, зачастую вызванными дефицитом азота. Стоит отметить, что в оптимальных условиях роста синтетической метанотрофной ассоциации наблюдали значительное увеличение содержания ПГБ в биомассе по сравнению с результатами оптимизации в периодических условиях, которые, тем не менее, остались ниже показателей для среды с дефицитом по источнику минерального азота и составили в среднем 13,58–14,65 %. В нестерильных условиях на данной среде концентрация биомассы снижалась до 3,2–3,9 г/л, а доля ПГБ падала до 4,9–6,8 %. Применение нестерильных условий на данной среде значительно увеличивало длительность выхода на стабильный хемостат, чего не наблюдается в условиях, подходящих для накопления ПГБ. Чистота подаваемого метана в исследуемом диапазоне оказывает значимое влияние на результаты испытаний только при использовании среды, предназначенной для наработки ПГБ. Однако, переход к нестерильному культивированию приводил к резкому падению устойчивости процесса. При использовании среды, стимулирующей синтез ПГБ, стабильность процесса в стерильных условиях была сопоставима (76–78 %), а в нестерильных условиях на техническом метане даже несколько возрастала, несмотря на более низкую продуктивность по биомассе. Данный факт может указывать на то, что специфические условия, при которых наблюдается интенсивный синтез ПГБ, подавляют развитие сторонних микроорганизмов, тем самым способствуя сохранению целевого консорциума.

Таблица 13 – Непрерывное культивирование синтетического сообщества МС5

Анализируемый параметр	Среда, оптимизированная для наработки биомассы				Среда, оптимизированная для увеличения содержания белка в биомассе				Сообщество на основе <i>Methylococcus capsulatus</i> ВСБ-874
	Стерильные условия		Нестерильные условия		Стерильные условия		Нестерильные условия		
	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	
D, ч <sup>-1</sup>	<b>0,27</b>	<b>0,27</b>	<b>0,27</b>	<b>0,27</b>	<b>0,27</b>	<b>0,27</b>	0,25	0,25	0,23
КонцАСВ, г/л	<b>10,06 ± 1,18</b>	9,82 ± 1,33	9,95 ± 1,29	9,67 ± 1,15	9,15 ± 1,35	9,05 ± 1,22	9,49 ± 1,17	9,32 ± 1,48	9,25 ± 2,38
Сырой протеин от АСВ, %	73,72 ± 1,59	73,25 ± 1,95	72,95 ± 2,67	72,09 ± 1,55	<b>75,64 ± 2,42</b>	74,69 ± 2,09	74,81 ± 1,72	73,99 ± 1,55	71,20 ± 1,23
τ <sub>ст</sub> , ч	<b>20,0</b>	25,5	22,5	26,0	26,5	28,5	28,0	29,5	32,0
K <sub>ст</sub> , %	<b>84</b>	80	<b>84</b>	82	80	81	75	71	74

Таблица 14 – Непрерывное культивирование синтетического сообщества МС7

Анализируемый параметр	Среда, оптимизированная для наработки биомассы				Среда, оптимизированная для увеличения содержания ПГБ в биомассе				Смешанные культуры на основе <i>M. trichosporium</i> [100, 165, 249, 311-314]
	Стерильные условия		Нестерильные условия		Стерильные условия		Нестерильные условия		
	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	
D, ч <sup>-1</sup>	<b>0,10</b>	<b>0,10</b>	0,06	0,07	0,03	0,03	0,04	0,04	0,01 – 0,08
КонцАСВ, г/л	3,92 ± 0,71	<b>4,29 ± 0,56</b>	3,25 ± 0,28	3,87 ± 0,46	2,16 ± 0,26	1,95 ± 0,42	2,20 ± 0,37	1,94 ± 0,35	2,0 – 5,0
ПГБ от АСВ, %	14,65 ± 1,46	13,58 ± 0,80	6,80 ± 0,42	4,87 ± 0,47	34,09 ± 1,58	35,42 ± 3,09	34,75 ± 2,23	<b>38,13 ± 1,41</b>	30 – 55
τ <sub>ст</sub> , ч	<b>24,5</b>	<b>24,5</b>	29,0	32,0	30,5	32,0	34,0	36,5	24 – 48
K <sub>ст</sub> , %	<b>80</b>	75	68	62	78	76	70	78	75 – 85

### 3.11. Устойчивость состава синтетических сообществ в непрерывном режиме культивирования

Анализ видового состава сообщества с использованием системы PacBio (платформы для высокопроизводительного секвенирования, позволяющей получать полноразмерные последовательности генов 16S рРНК), согласуется с результатами проводимой в ходе культивирования светопольной микроскопии проб. Установлено, что в нестерильных условиях помимо участников разработанного синтетического сообщества наблюдается присутствие контаминирующей микрофлоры, которая, однако, не является доминирующей и не превышает 21 % и 29 % для МС5 и МС7 соответственно от общей популяции в суспензии и не сказывается в значимой степени на состав и базовые параметры культивирования. Данный факт свидетельствует об устойчивости разработанных синтетических консорциумов и является большим технологическим и экономическим преимуществом, позволяющим исключить затраты на обеспечение асептических условий (рисунок 16-17). Наибольший вклад в наличие микроорганизмов, не представленных в созданных синтетических сообществах, вносит чистота используемого метана. Так, для синтетического сообщества МС5 нестерильное культивирование приводит к стабильному присутствию культуры рода *Hydrothalea*, которая является спутником в некоторых метанотрофных сообществах, но не присутствовала в исследуемых накопительных культурах [338]. Отсутствие снижения продуктивности в нестерильном процессе указывает на возможное «дотраивание» разработанного синтетического сообщества до более сложного, что при высокой скорости протока приводит к автоселекции контаминирующей микрофлоры. Представленность метанотрофной культуры *M. trichosporium* в значительно увеличивалась при использовании среды для накопления ПГБ, что объясняется дополнительным созданием селективных условий при отсутствии минерального азота.

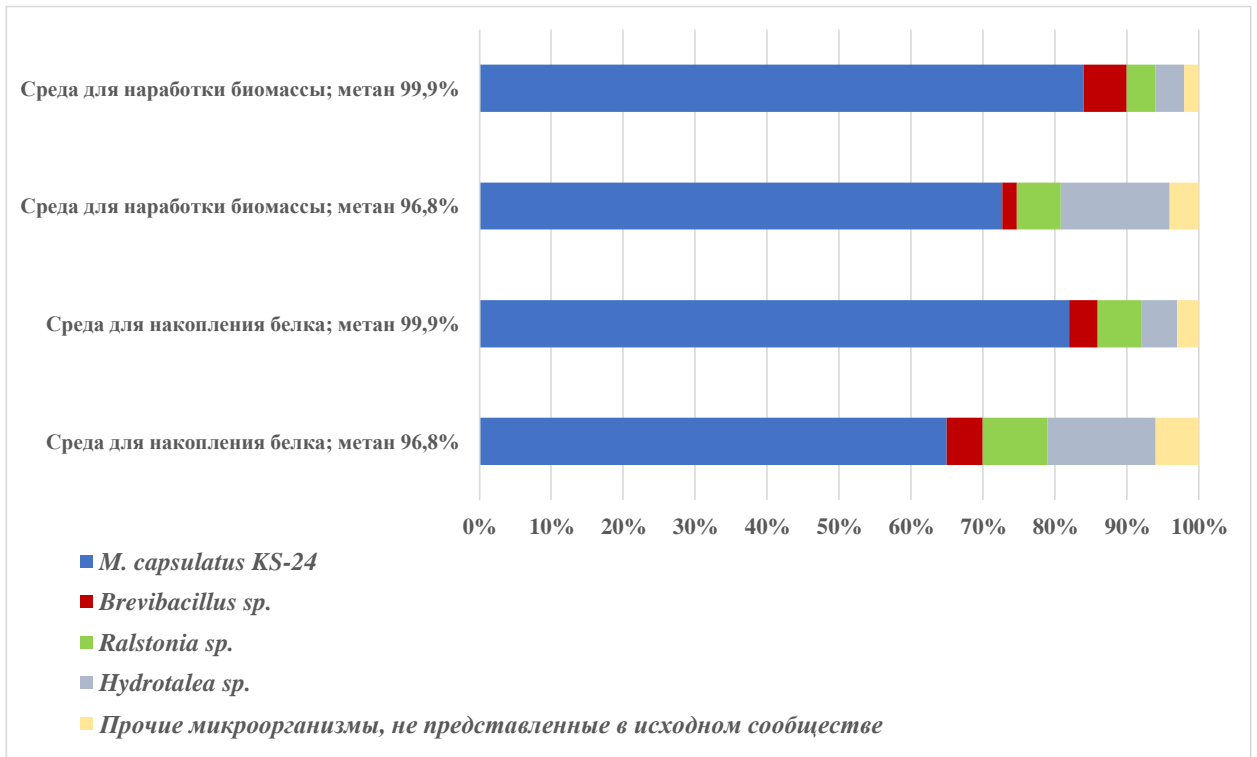


Рисунок 16 – Состав синтетического сообщества MC5 при нестерильном культивировании

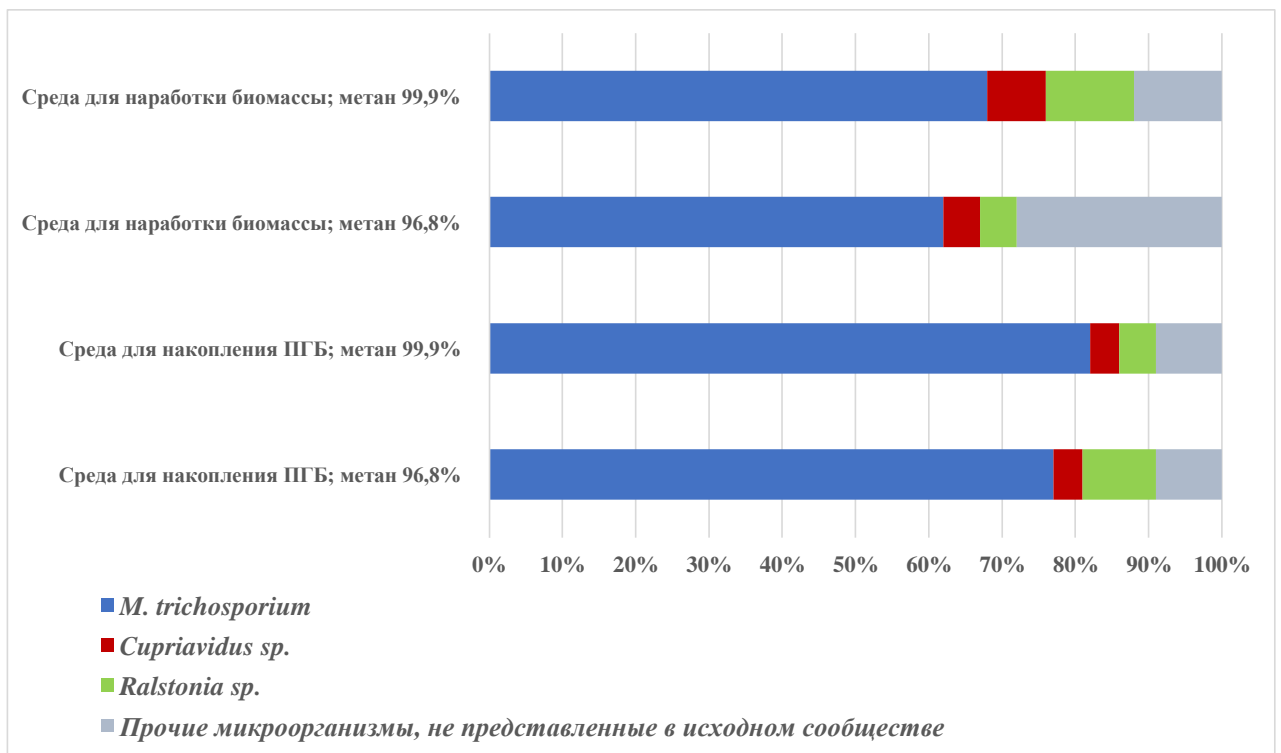


Рисунок 17 – Состав синтетического сообщества MC7 при нестерильном культивировании

### 3.12. Расчёт первичных показателей непрерывного культивирования

Сравнительный расчёт ключевых показателей, характеризующих процесс культивирования созданных сообществ приведён в таблицах 15-16. Для синтетического сообщества МС5 использование среды, оптимизированной для накопления биомассы, обеспечивает более высокие значения продуктивности и производительности по сравнению со средой, направленной на увеличение содержания белка, что также обусловлено более быстрым выходом на режим стабильного хемостата. Так, в стерильных условиях с метаном чистотой 99,9 % продуктивность по биомассе на среде для накопления составляет  $2,72 \pm 0,32$  кг/(м<sup>3</sup>·ч) в сравнении с  $2,47 \pm 0,36$  кг/(м<sup>3</sup>·ч) на среде для увеличения доли белка при производительности за цикл  $4,23 \pm 0,50$  и  $3,42 \pm 0,50$  кг по АСВ соответственно. При этом содержание сырого протеина в биомассе различается не столь существенно (среднее значение 73,7 % против 75,6 %), что делает среду для накопления биомассы предпочтительной с точки зрения общего выхода целевого продукта. Снижение чистоты СН<sub>4</sub> в стерильных условиях приводит к небольшому снижению продуктивности, а переход к нестерильным условиям на среде для накопления биомассы с техническим метаном практически не отражается на продуктивности и производительности культивирования. Данные результаты свидетельствуют о высокой устойчивости сообщества МС5 к контаминации и принципиальной возможности ведения процесса без затрат на обеспечение асептики. Напротив, в нестерильных условиях на среде, оптимизированной для увеличения белка, наблюдается заметное падение продуктивности до  $2,33 \pm 0,12$  кг/(м<sup>3</sup>·ч), что делает этот вариант менее привлекательным. Сопоставление с ближайшим аналогом выявляет преимущества разработанного консорциума. При значимом превосходстве в скорости разбавления ( $0,27$  ч<sup>-1</sup> у МС5 против  $0,23$  ч<sup>-1</sup> у аналога на основе *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874) продуктивность по биомассе у МС5 в оптимальных режимах оказалась выше на 20-28 %, а производительность за цикл возросла на 32-38 %.

Среда, оптимизированная для накопления биомассы синтетическим сообществом МС7, демонстрирует показатели продуктивности по биомассе  $0,429 \pm 0,056$  кг/(м<sup>3</sup>·ч) и производительность  $0,639 \pm 0,083$  кг АСВ, что находится на верхней границе диапазона показателей для известных процессов на основе *M. trichosporium*. Переход к нестерильным условиям на этой среде ожидаемо ухудшает показатели: продуктивность снижается до  $0,271 \pm 0,032$  кг/(м<sup>3</sup>·ч), что связано с негативным влиянием контаминирующей микрофлоры на рост сообщества. При использовании среды, оптимизированной для увеличения содержания ПГБ, наблюдали значительные отличия. В стерильных условиях с метаном чистоты 99,9 % продуктивность по биомассе снижается до  $0,065 \pm 0,008$  кг/(м<sup>3</sup>·ч), однако продуктивность по ПГБ достигает  $0,020 \pm 0,003$  кг/(м<sup>3</sup>·ч). В нестерильных условиях на этой среде с техническим метаном получены наилучшие показатели по синтезу полимера: содержание ПГБ в биомассе составляет  $38,13 \pm 1,41$  % при продуктивности по ПГБ  $0,029 \pm 0,006$  кг/(м<sup>3</sup>·ч) и производительности по ПГБ за цикл культивирования  $0,038 \pm 0,007$  кг. Сравнение с литературными данными для смешанных культур на основе *M. trichosporium* показывает, что разработанное сообщество МС7 по показателям продуктивности и производительности по биомассе находится в диапазоне или даже превосходит сообщества, культивируемые в сходных условиях, а по содержанию ПГБ в биомассе располагается в районе верхней границы известных значений.

Таким образом, продемонстрированная устойчивость разработанных сообществ к снижению стерильности и чистоте субстрата при сохранении высокой продуктивности культивирования формирует основу для создания экономически эффективных биотехнологических производств, минимизирующих капитальные и эксплуатационные затраты при получении ценных соединений.

Таблица 15 – Первичные показатели культивирования синтетического сообщества МС5

Анализируемый параметр	Среда, оптимизированная для наработки биомассы				Среда, оптимизированная для увеличения содержания белка в биомассе				Сообщество на основе <i>M. capsulatus</i> ВСБ-874
	Стерильные условия		Нестерильные условия		Стерильные условия		Нестерильные условия		
	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	
Продуктивность по биомассе, кг/(м <sup>3</sup> ·ч)	2,72 ± 0,32	2,65 ± 0,36	2,69 ± 0,35	2,61 ± 0,31	2,47 ± 0,36	2,44 ± 0,33	2,37 ± 0,32	2,33 ± 0,40	2,13 ± 0,55
Продуктивность по белку, кг/(м <sup>3</sup> ·ч)	2,00 ± 0,24	1,94 ± 0,26	1,96 ± 0,26	1,88 ± 0,22	1,87 ± 0,27	1,82 ± 0,25	1,78 ± 0,24	1,72 ± 0,30	1,52 ± 0,39
Производительность по биомассе, кг АСВ	4,23 ± 0,50	3,78 ± 0,51	4,05 ± 0,53	3,73 ± 0,44	3,42 ± 0,50	3,28 ± 0,44	3,25 ± 0,41	2,94 ± 0,47	2,70 ± 0,70
Производительность по белку, кг	3,11 ± 0,37	2,77 ± 0,37	2,95 ± 0,39	2,69 ± 0,31	2,59 ± 0,37	2,45 ± 0,34	2,43 ± 0,30	2,17 ± 0,35	1,92 ± 0,49

Таблица 16 – Первичные показатели культивирования синтетического сообщества МС7

Анализируемый параметр	Среда, оптимизированная для наработки биомассы				Среда, оптимизированная для увеличения содержания ПГБ в биомассе				Средние данные для смешанных культур на основе <i>M. trichosporium</i> [100, 165, 249, 311-314]
	Стерильные условия		Нестерильные условия		Стерильные условия		Нестерильные условия		
	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	СН <sub>4</sub> 99,9 %	СН <sub>4</sub> 96,8 %	
Продуктивность по биомассе, кг/(м <sup>3</sup> ·ч)	0,392 ± 0,071	0,429 ± 0,056	0,195 ± 0,017	0,271 ± 0,032	0,065 ± 0,008	0,059 ± 0,013	0,088 ± 0,015	0,078 ± 0,014	0,150-0,350
Продуктивность по ПГБ, кг/(м <sup>3</sup> ·ч)	0,057 ± 0,011	0,058 ± 0,008	0,013 ± 0,001	0,013 ± 0,002	0,022 ± 0,003	0,021 ± 0,005	0,031 ± 0,005	0,029 ± 0,006	0,030-0,165
Производительность по биомассе, кг АСВ	0,600 ± 0,109	0,639 ± 0,083	0,263 ± 0,023	0,340 ± 0,041	0,091 ± 0,011	0,079 ± 0,017	0,112 ± 0,019	0,100 ± 0,018	0,260-0,510
Производительность по ПГБ, кг	0,088 ± 0,016	0,087 ± 0,011	0,018 ± 0,002	0,016 ± 0,002	0,031 ± 0,004	0,028 ± 0,006	0,039 ± 0,007	0,038 ± 0,007	0,077-0,282

### 3.13. Скрининг метанотрофов, синтезирующих наночастицы серебра

Скрининг четырёх метанотрофных культур продемонстрировал, что способностью к внеклеточному биосинтезу наночастиц серебра обладают *M. trichosporium* и *M. capsulatus*. Синтез наблюдали как в условиях фотоиндукции, так и в темноте (рисунок 18 а-б). Интенсивность окрашивания суспензии возрастала при увеличении концентрации ионов серебра с 25 до 50 мг/л, однако дальнейшее повышение концентрации до 75 мг/л не приводило к заметному усилению окраски, что, вероятно, связано с достижением при значениях близких к 50 мг  $\text{Ag}^+$ /л ингибирующей концентрации ионов серебра в растворе, либо о пределе удельной способности данного количества клеток в объёме суспензии (мг  $\text{Ag}^+$ /мг биомассы) восстанавливать вносимые катионы и синтезировать НЧ. В случае использования бесклеточной культуральной жидкости образование наночастиц фиксировали только при фотоиндукции, а интенсивность окрашивания была значительно ниже, чем в присутствии активно растущих клеток (рисунок 18 в). Это указывает на то, что ключевую роль в восстановлении ионов серебра играют специфические компоненты, продуцируемые живыми клетками в ответ на токсическое воздействие катионов  $\text{Ag}^+$ .

Обнаруженная способность не может быть однозначно соотнесена с определённым типом метанотрофов, поскольку синтез наблюдали у *M. capsulatus* (типа X/Ib) и *M. trichosporium* (тип II), но не у *M. methanica* (тип Ia) и *M. parva* (тип II). Это позволяет предположить, что процесс не связан напрямую с путями ассимиляции метана, а, вероятно, опосредован наличием специфических хелатирующих соединений - халькофоров. Данное предположение согласуется с литературными данными о высокой аффинности метанобактина к ионам  $\text{Ag}^+$ , а также с тем, что наиболее высокий уровень продукции метанобактина (или его аналогов) характерен именно для *M. trichosporium* и *M. capsulatus*, в то время как у *M. parva* структура метанобактина отличается, что может объяснять отсутствие восстановления ионов серебра у этого вида [211, 236]. Тем не менее, наблюдаемый

биосинтез наночастиц серебра в активной фазе роста метанотрофных культур позволяет рассматривать способность к восстановлению ионов  $Ag^+$  как дополнительный индикатор метаболической активности клеток, поскольку, вероятно именно активный ответ на их повышенную концентрацию в среде ведёт к образованию наносеребра в высоких количествах, которые просто детектировать.

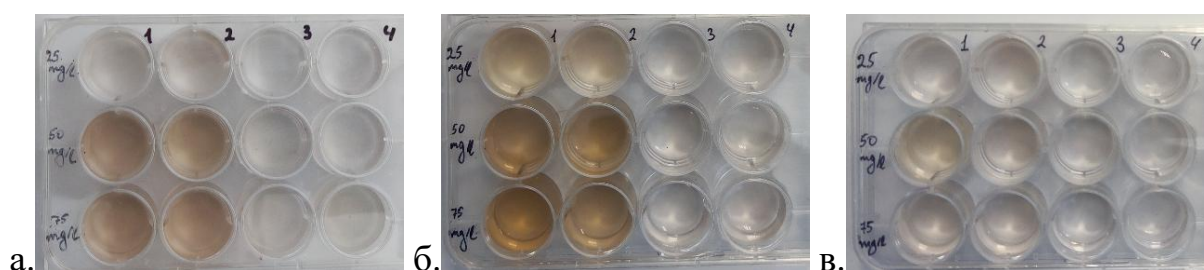


Рисунок 18 – Синтез наночастиц серебра некоторыми исследуемыми метанотрофными культурами. а – суспензия культур в темноте; б – суспензия культур в условиях фотоиндукции; в – супернатанты исследуемых метанотрофных культур в условиях фотоиндукции. 1 – *M. capsulatus*; 2 – *M. trichosporium*; 3 – *M. methanica*; 4 – *M. parva*

Сводная таблица 17 наглядно демонстрирует, что важную роль в образовании наносеребра имел факт наличия освещения в процессе биосинтеза – интенсивность цвета, присущего явлению поверхностного плазмонного резонанса НЧ серебра, увеличивалась во всех исследуемых культурах. Сконструированные тройные синтетические ассоциации МС5 и МС7 также продемонстрировали склонность к образованию наночастиц серебра, при этом в случае МС5 их наличие было зафиксировано даже в супернатанте в условиях отсутствия фотоиндукции, что свидетельствует о восстанавливающей способности метаболитов, выделяемых данным микроорганизмом. Данная закономерность открывает перспективы использования способности метанотрофных культур к восстановлению ионов серебра в качестве экспресс-метода оценки их физиологического состояния при оптимизации процессов культивирования, поскольку интенсивность биосинтеза

наночастиц напрямую коррелирует с метаболической активностью клеток в экспоненциальной фазе роста.

Таблица 17 – Способность метанотрофных бактерий и ассоциаций синтезировать наночастицы серебра («+» – да; «-» – нет)

Исследуемая культура	Суспензия		Супернатант	
	hv-	hv+	hv-	hv+
<i>Methylomonas</i> sp. (M1)	-	-	-	-
<i>Methylocystis</i> sp. (M2)	-	-	-	-
<i>Methylosinus</i> sp. (M3)	-	+	-	-
<i>Methylocystis</i> sp. (M4)	-	-	-	-
<i>M. capsulatus</i> KS-24 (M5)	+	+	-	+
<i>M. methanica</i> (M6)	-	-	-	-
<i>M. trichosporium</i> (M7)	+	+	-	-
<i>M. parvus</i> (M8)	-	-	-	-
<i>M. capsulatus</i> (M9)	+	+	-	+
MC5	+	+	+	+
MC7	+	+	-	-

Для анализа непосредственного влияния метанотрофного микроорганизма на характеристики наночастиц были отобраны суспензии наносеребра, образованные чистыми культурами метаноокисляющих микроорганизмов.

### 3.13.1. Характеристика наночастиц серебра

Спектры поглощения отобранных суспензий и супернатантов продемонстрировали пик поглощения в диапазоне 405-460 нм (рисунок 19). Как для живых культур *M. trichosporium* и *M. capsulatus*, так и для сообществ MC5 и MC7, наблюдали более выраженное поглощение в районе 405-410 нм в случае фотоиндукции, а также смещение и сглаживание пика ближе к 430-440 нм при отсутствии освещения. Данный факт может быть связан с увеличением размера и ростом полидисперсности образуемых наночастиц [339-340]. Спектры поглощения при использовании надосадочных жидкостей демонстрируют пологие пики в

диапазоне 420 – 460 нм, что характеризует получаемую систему как обладающую НЧ со значительным распределением по размеру.

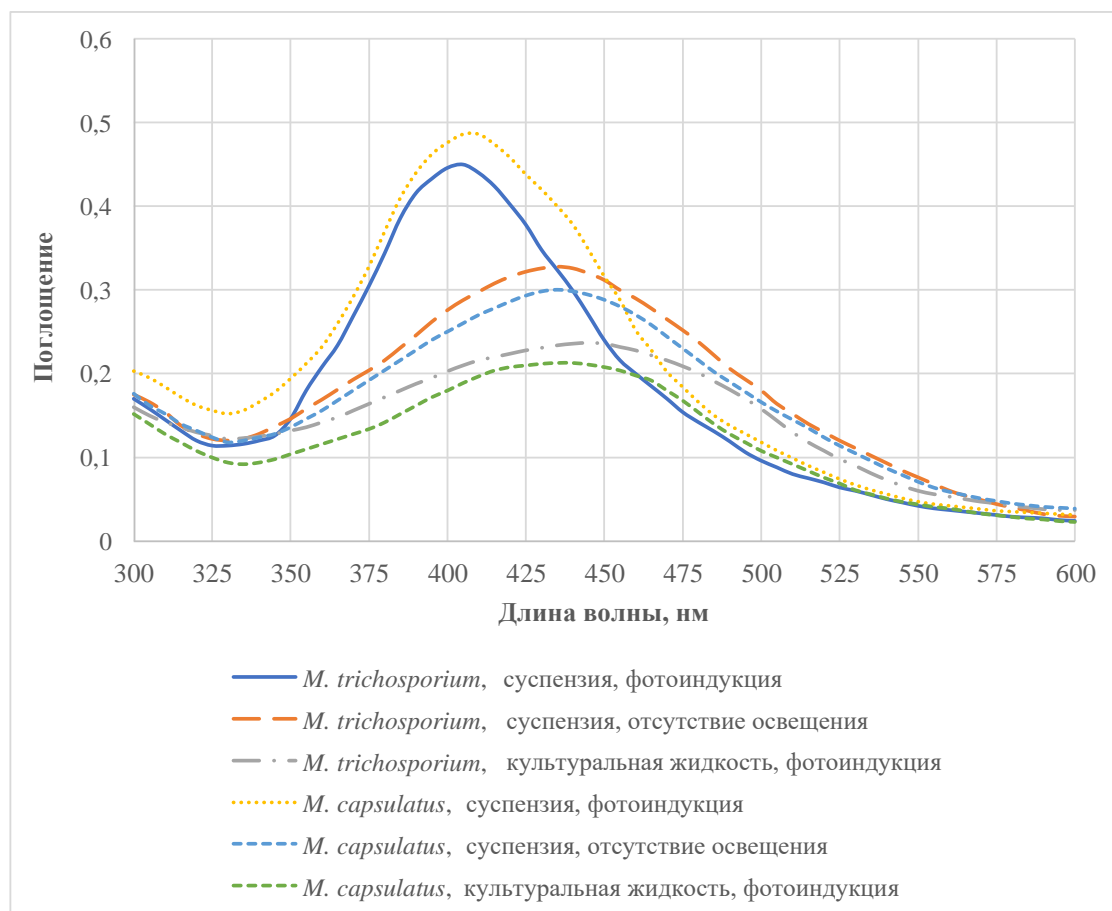


Рисунок 19 – Спектры поглощения суспензий наночастиц серебра при концентрации 50 мг Ag<sup>+</sup>/л

Результаты анализа распределения частиц по размеру методом ДРС (Рисунок 20 а-е) указывают на то, что в условиях фотоиндукции активно метанотрофные культуры синтезировали НЧ малого размера (рисунок 20 а-б): для культуры *M. trichosporium* показатель составил 5-7 нм, а для *M. capsulatus* – 10-20 нм. Поскольку известно, что наночастицы с уменьшением размера приобретают более выраженный антимикробный эффект, рассмотрение именно активных клеток метанотрофов с применением светового облучения в ходе биосинтеза представляет наибольший интерес для дальнейших исследований. В случае отсутствия освещённости обе метаноокисляющие бактерии образовывали внеклеточное

наносеребро с размером частиц преимущественно от 20 до 40 нм (рисунок 20 в-г). В свою очередь, добавление ионов серебра в культуральную жидкость, отделённую от клеток указанных культур, при дополнительном световом облучении приводило к образованию полидисперсных наночастиц в диапазоне размеров от 36 до 100 нм (рисунок 20 д-е). Полученные при помощи применения метода динамического рассеяния света данные согласуются с расположением и формой пиков поглощения, наблюдаемых в ходе анализа суспензии методом УФ-видимой спектроскопии.

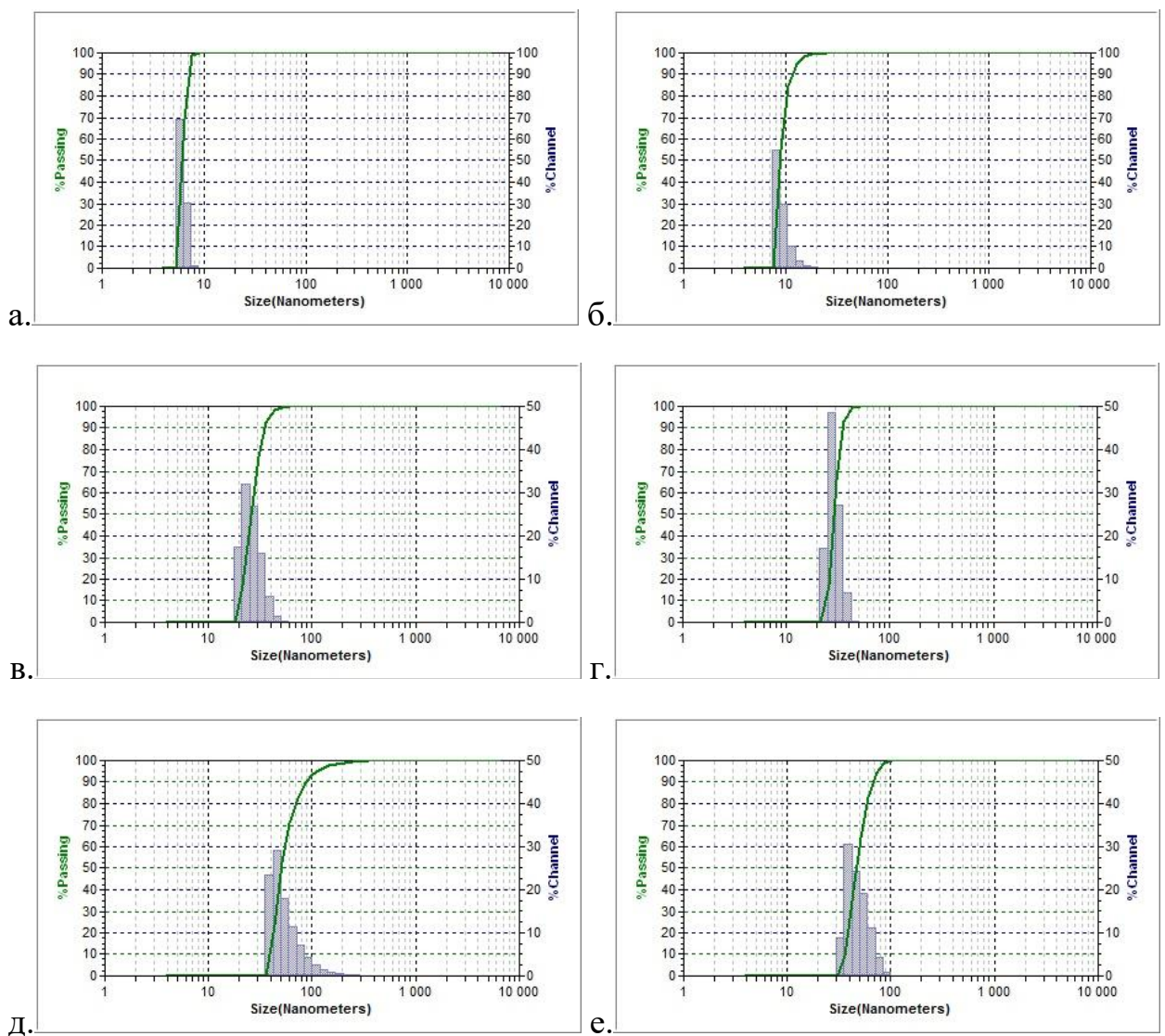


Рисунок 20 а-е. – Распределение синтезированных наночастиц серебра по размеру

Исследование микрофотографий, полученных методом СЭМ, указывает на сферическую форму частиц, покрытых оболочкой и склонных к незначительной агрегации (рисунок 21 а-е). Следует учитывать, что действительный размер металлического ядра наночастиц может быть несколько меньше, чем показатель, полученный по результатам ДРС и СЭМ.

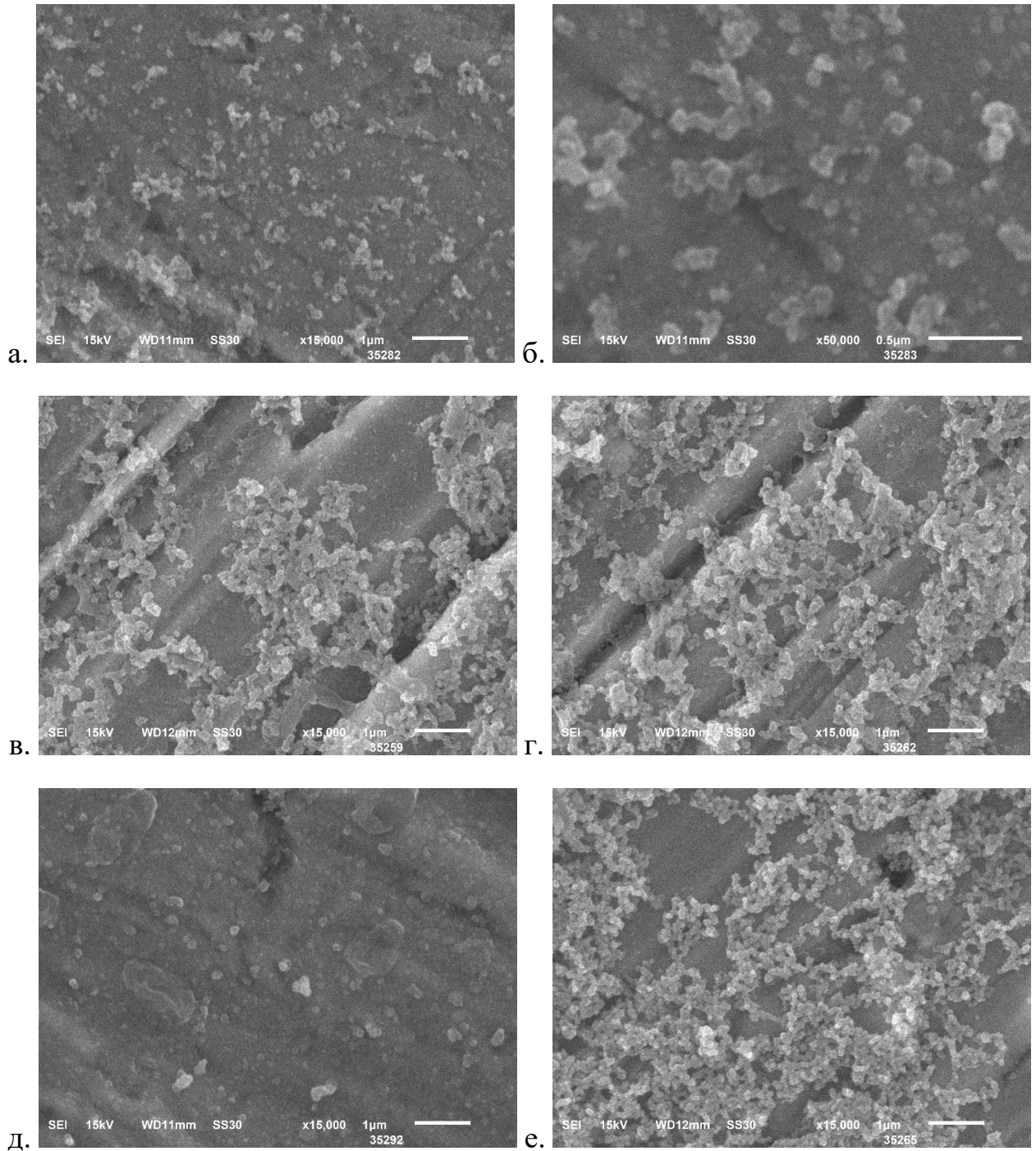


Рисунок 21 а-е. – Изучение морфологии наночастиц

### 3.13.2. Ингибирующая и бактерицидная концентрации наночастиц серебра

Определение ингибирующей и бактерицидной концентраций полученных наночастиц позволило сделать вывод об их различном влиянии на грамположительные и грамотрицательные патогенные микроорганизмы (таблица 18).

Таблица 18 – Антимикробная активность наночастиц серебра

Продуцент наночастиц	Патоген (принадлежность по Граму)	МИК <sub>100</sub> , мг НЧ/л	МИК <sub>50</sub> , мг НЧ/л	МБК, мг НЧ/л
<i>M. capsulatus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Г+)	100-150	75-100	≥ 200
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Г-)	25-50	≤ 25	≥ 100
	<i>Escherichia coli</i> (Г-)	50-75	25-50	≥ 100
	<i>Bacillus cereus</i> (Г+)	150-200	100-150	> 200
<i>M. trichosporium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Г+)	150-200	100-150	> 200
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Г-)	50-75	25-50	≥ 100
	<i>Escherichia coli</i> (Г-)	100-150	75-100	> 200
	<i>Bacillus cereus</i> (Г+)	≥ 200	150-200	> 200

Наблюдали более выраженный эффект в подавлении роста и жизнеспособности исследуемых культур в случае Г- видов, при этом нанокристаллы размером 10-20 нм, синтезированные в системе с *M. capsulatus* продемонстрировали меньшие концентрации, необходимые для достижения как МИК, так и МБК. Наночастицы, образованные *M. trichosporium* размером 5-7 нм, несмотря на меньший размер, оказались менее бактерицидными и не подавляли полностью жизнедеятельность исследуемых Г+ бактерий в выбранном диапазоне концентраций. По-видимому, размер частиц не является единственным

параметром, определяющим бактерицидную активность НЧ. Поскольку сравнивали показатели МИК и МБК нанокристаллов серебра, синтезированных метанотрофами различных типов, биополимерная оболочка могла иметь различный химический состав, также определяющий их воздействие на модельные патогены. Сообщалось, что состав и размер оболочек, имеющих чаще всего белковую и полисахаридную природу, может влиять на антимикробную активность НЧ серебра. Контроль высвобождения ионов серебра в среду посредством применения того или иного метанотрофа, синтезирующего оболочки уникального химического состава, может позволить получать продукт с заданной антимикробной активностью, направленный на определённую группу патогенов [341].

### **Заключение по главе 3**

Результатом исследований, изложенных в данной главе, стала реализация подходов, позволивших перейти от анализа природных метанотрофных культур к созданию и культивированию высокопродуктивных синтетических сообществ. Разработан метод направленного конструирования таких сообществ, основанный на количественной оценке парных взаимодействий метанотрофов и их неметанотрофных спутников, что позволило обеспечить синергетический эффект в том числе в трёхкомпонентных системах. Дальнейшая оптимизация составов питательных сред и газовой фазы с использованием методов математического планирования эксперимента позволила реализовать потенциал созданных сообществ и обеспечить возможность направленного управления их метаболизмом. Ключевым этапом, подтвердившим практическую значимость разработанных подходов, стали испытания в непрерывном режиме, где экспериментально доказана принципиальная возможность длительного стабильного культивирования созданных синтетических сообществ, в том числе в нестерильных условиях и использовании технического метана.

## ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ МЕТАНОТРОФНЫХ СООБЩЕСТВ

### 4.1. Обоснование схемы и условий культивирования разработанных синтетических метанотрофных сообществ

Совокупность результатов, полученных в третьей главе, позволила не только создать высокопродуктивные синтетические сообщества МС5 и МС7, но и определить оптимальные режимы их культивирования, обеспечивающие максимальную эффективность процессов биоконверсии метана в биомассу с высоким содержанием продуктов с добавленной стоимостью.

Наиболее важными параметрами для выбора условий культивирования сообщества МС5 на основе *Methylococcus capsulatus* KS-24 являлись данные о его устойчивости к контаминации при длительном непрерывном культивировании. Как было показано в разделе 3.11, при ведении процесса в нестерильных условиях с использованием технического метана доля целевых микроорганизмов в сообществе сохранялась на высоком уровне, тогда как продуктивность по биомассе и содержание сырого протеина были сопоставимы с показателями, достигаемыми в стерильных условиях. Данный факт имеет принципиальное значение для масштабирования, поскольку исключение требований к асептическому ведению процесса позволяет существенно снизить капитальные и эксплуатационные затраты. Также важно отметить, что эффективное культивирование сообщества на техническом метане с чистотой 96,75 % открывает перспективы использования природного газа или биогаза после их предварительной подготовки, чтократно снижает затраты на сырьё по сравнению с использованием чистого метана. Таким образом, для промышленной реализации процесса получения высокобелковой биомассы на основе сообщества МС5 обоснованным является одностадийное непрерывное культивирование в нестерильных условиях на техническом метане.

Для сообщества МС7, рассматриваемого в качестве сырья для получения полигидроксibuтирата, выбор технологической схемы обусловлен другими закономерностями. Было установлено, что максимальная продуктивность сообщества по биомассе и наибольшее содержание ПГБ в клетках достигаются при различных условиях, основанных не только на составе среды, но и на влиянии стерильности процесса. Данный факт указывает на невозможность одновременного достижения высоких показателей по обоим критериям в рамках одностадийного процесса и обуславливает необходимость применения двухстадийной схемы культивирования. С учётом вышеизложенного предлагается создание системы двух связанных систем биореакторов, в каждой из которых создаются специфические условия, соответствующие целям культивирования. На первой стадии целесообразно вести процесс в режиме, обеспечивающем максимальную скорость накопления биомассы. Учитывая относительно невысокую удельную скорость роста *M. trichosporium* и чувствительность этого метанотрофа к контаминации, подтверждённую снижением продуктивности в нестерильных условиях, данную стадию следует проводить в стерильных условиях. На второй стадии, после достижения необходимой плотности культуры, происходит изменение подаваемой питательной среды на состав, стимулирующий накопление полигидроксibuтирата. В этих условиях, как было показано экспериментально, сообщество МС7 способно эффективно функционировать даже в нестерильном режиме, поскольку селективное давление, создаваемое дефицитом минеральных источников азота, подавляет развитие большинства контаминирующих микроорганизмов и обеспечивает стабильное доминирование целевого консорциума.

#### **4.1.1. Требования, предъявляемые к получаемому продукту**

Разработаны требования, предъявляемые к получаемой биомассе синтетических сообществ МС5 и МС7 с учётом природы целевого соединения и области его дальнейшего применения (таблица 19), что позволит контролировать

качество производимой продукции и обеспечивать соответствие установленным нормам.

Таблица 19 – Требования к физико-химическим и микробиологическим показателям биомассы синтетических сообществ МС5 и МС7

Показатель	Единица измерения	Продукт		Метод определения
		МС5 (высокобелковая биомасса)	МС7 (биомасса для получения ПГБ)	
Внешний вид	-	однородный порошок от бежевого до коричневого цвета	однородный порошок от светло-бежевого до светло-коричневого цвета	визуальный
Влажность	≤ %	10	5	ГОСТ 31640-2012
Зольность	% от АСВ	5-9	8-12	ГОСТ 26226-95
Содержание сырого протеина	% от АСВ	70-78	не регламентировано	ГОСТ 32044.1-2012
Содержание полигидроксibuтирата	≥ % от АСВ	не регламентировано	35	сертифицированная лабораторная методика (спектрофотометрия, ВЭЖХ, газовая хроматография)
Общая токсичность	-	не токсичен	не регламентировано	ГОСТ 31674-2012
Наличие живых клеток-продуцентов	-	не допускается	не регламентировано	высев на минеральные среды с наличием 25-35% метана в газовой фазе
Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов	КОЕ/г, не более	1·10 <sup>5</sup>	не регламентировано	ГОСТ ISO 7218-2015
Бактерии группы кишечной палочки	в 1,0 г	не допускается		
Патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы	в 25,0 г	не допускается		

#### 4.1.2 Основные расчётные формулы, используемые при технико-экономическом обосновании

Расчёт ключевых параметров процессов культивирования синтетических метанотрофных сообществ, а также технико-экономических показателей производства выполнен на основе единой системы общих уравнений, приведённых ниже. Каждая из зависимостей используется многократно в представленном виде или выражена через другие приведённые формулы с учётом наименования потока, стадии получения продукта, а также размерности, что отражено в соответствующих индексах.

$$T_{\text{ном}} = T_{\text{кал}} - T_{\text{пр}}, \quad (7)$$

где  $T_{\text{ном}}$  – номинальное время работы оборудования в течение года, ч;

$T_{\text{кал}}$  – календарный фонд времени (8760 ч/год);

$T_{\text{пр}}$  – суммарное время простоев на ремонт, санитарную обработку и регламентные работы в течение года, ч/год.

$$n_{\text{ц}} = \frac{T_{\text{ном}} - T_{\text{подг}}}{T_{\text{ц}}}, \quad (8)$$

где  $n_{\text{ц}}$  – количество полных циклов культивирования за год;

$T_{\text{подг}}$  – суммарное время подготовки посевного материала и пусконаладочных работ для первого цикла, ч;

$$T_{\text{эфф}} = (T_{\text{ном}} - n_{\text{ц}} \cdot \tau_{\text{ст}}) \cdot K_{\text{ст}}, \quad (9)$$

где  $T_{\text{эфф}}$  – эффективный фонд рабочего времени оборудования, ч;

$\tau_{\text{ст}}$  – время выхода на стабильный хеMOSTATный режим в одном цикле, ч;

$K_{\text{ст}}$  – коэффициент стабильности процесса, доли.

$$G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}} = \frac{M_{\text{АСВ}}}{T_{\text{эфф}}} = W_{\text{общ}}^{\text{ср}} \cdot X, \quad (10)$$

где  $G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}}$  – производительность по АСВ, кг/ч;

$M_{\text{АСВ}}$  – масса АСВ, подлежащая производству за год, кг;

$W_{\text{общ}}^{\text{ср}}$  – суммарный часовой расход среды, м<sup>3</sup>/ч;

$X$  – концентрация АСВ в суспензии, кг/м<sup>3</sup>.

$$V_{\text{ф}}^{\text{раб}} = \frac{M_{\text{АСВ}}}{P_X \cdot T_{\text{эфф}}}, \quad (11)$$

где  $V_{\text{ф}}^{\text{раб}}$  – суммарный рабочий объём биореакторов, м<sup>3</sup>;

$P_X$  – продуктивность процесса по АСВ, кг/(м<sup>3</sup>·ч);

$$W^{\text{ср}} = V^{\text{раб}} \cdot D, \quad (12)$$

где  $W^{\text{ср}}$  – часовой расход среды, м<sup>3</sup>/ч;

$V^{\text{раб}}$  – рабочий объём ферментёров, м<sup>3</sup>;

$D$  – скорость разбавления, ч<sup>-1</sup>.

$$W^{\text{г}} = \frac{k_{\text{г}} \cdot V^{\text{раб}}}{\text{мин}}, \quad (14)$$

где  $W^{\text{г}}$  – расход газовой смеси, м<sup>3</sup>/мин;

$k_{\text{г}}$  – удельный расход газовой смеси, м<sup>3</sup>/(м<sup>3</sup>·мин);

$$W^{\text{CH}_4} = W^{\text{г}} \cdot \varphi_{\text{CH}_4}, \quad (15)$$

где  $W^{\text{CH}_4}$  – объёмный расход метана, м<sup>3</sup>/ч;

$\varphi_{\text{CH}_4}$  – объёмная доля метана в газовой смеси с учётом чистоты.

$$G^{\text{CH}_4} = W^{\text{CH}_4} \cdot \rho_{\text{CH}_4}, \quad (16)$$

где  $G^{\text{CH}_4}$  – массовый расход метана, кг/ч;

$W^{\text{CH}_4}$  – объёмный расход метана, м<sup>3</sup>/ч;

$\rho_{\text{CH}_4}$  – плотность метана при нормальных условиях, кг/м<sup>3</sup>

$$W^{\text{возд}} = W^{\text{г}} - W^{\text{CH}_4}, \quad (17)$$

где  $W^{\text{возд}}$  – объёмный расход воздуха, м<sup>3</sup>/ч;

$$G^{O_2} = W^{\text{возд}} \cdot \varphi_{O_2} \cdot \rho_{O_2}, \quad (18)$$

где  $G^{O_2}$  – массовый расход кислорода, кг/ч;

$\varphi_{O_2}$  - объёмная доля кислорода в воздухе;

$\rho_{O_2}$  – плотность кислорода при нормальных условиях, кг/м<sup>3</sup>.

$$\eta_{CH_4} = \frac{G_{\text{потр}}^{CH_4}}{G_{\text{общ}}^{CH_4}}, \quad (19)$$

где  $\eta_{CH_4}$  – степень потребления метана;

$G_{\text{потр}}^{CH_4}$  – массовый расход метана, усвоенного микроорганизмами, кг/ч;

$G_{\text{общ}}^{CH_4}$  – массовый расход подаваемого метана, кг/ч.

$$Q_{\text{ж}} = G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}} \cdot q_{\text{ж}}, \quad (20)$$

где  $Q_{\text{ж}}$  – тепловая нагрузка, обусловленная процессами жизнедеятельности, ккал/ч;

$q_{\text{ж}}$  – удельная теплота жизнедеятельности, ккал/кг АСВ.

$$G^{\text{об.воды}} = \frac{Q_{\text{ж}}}{c_{\text{в}} \cdot \rho_{H_2O} \cdot \Delta t}, \quad (21)$$

где  $G^{\text{об.воды}}$  – расход оборотной воды, м<sup>3</sup>/ч;

$c_{\text{в}}$  – удельная теплоёмкость воды, кДж/(кг·К);

$\rho_{H_2O}$  – плотность воды, кг/м<sup>3</sup>;

$\Delta t$  – перепад температур на охлаждении, К.

$$W_{\text{сеп}}^{\text{сгущ.б}} = \frac{G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}}}{C_{\text{сеп}}^{\text{б}}}, \quad (22)$$

где  $W_{\text{сеп}}^{\text{б}}$  – объёмный поток сгущённой биомассы после сепарирования, м<sup>3</sup>/ч;

$C_{\text{сеп}}^{\text{б}}$  – концентрация биомассы в сгущённой пасте, кг/м<sup>3</sup>.

$$V_{\text{общ}}^{\text{инакт}} = W_{\text{сеп}}^{\text{пром.б}} \cdot \tau_{\text{выд}}, \quad (23)$$

где  $V_{\text{общ}}^{\text{инакт}}$  – рабочий объём инактиватора, м<sup>3</sup>;

$\tau_{\text{выд}}$  – время инактивации (выдержки), ч.

$$Q_{\text{инакт}} = G_{\text{сеп}}^{\text{б}} \cdot c_{\text{б}} \cdot \Delta t, \quad (24)$$

где  $Q_{\text{инакт}}$  – тепловая нагрузка на инактивацию, кДж/ч;

$G_{\text{сеп}}^{\text{б}}$  – массовый поток промытой сгущённой пасты, кг/ч;

$c_{\text{б}}$  – удельная теплоёмкость пасты биомассы, кДж/(кг·К);

$\Delta t$  – разность температур, К

$$G_{\text{инакт}}^{\text{пар}} = \frac{Q_{\text{общ}}}{r}, \quad (25)$$

где  $G_{\text{инакт}}^{\text{пар}}$  – расход пара на инактивацию, кг/ч;

$Q_{\text{общ}}$  – общая тепловая нагрузка с учётом потерь, кДж/ч;

$r$  – удельная теплота парообразования воды, кДж/кг.

$$G_{\text{исп}}^{\text{H}_2\text{O}} = G_{\text{нач}}^{\text{H}_2\text{O}} - G_{\text{продукт}}^{\text{H}_2\text{O}}, \quad (26)$$

где  $G_{\text{исп}}^{\text{H}_2\text{O}}$  – количество испаряемой влаги, кг/ч;

$G_{\text{нач}}^{\text{H}_2\text{O}}$  – начальная масса влаги в сгущённой суспензии, кг/ч;

$G_{\text{продукт}}^{\text{H}_2\text{O}}$  – масса влаги в сухом продукте, кг/ч.

Приведённые выше формулы использованы в разделах 4.3-4.5 для расчёта параметров технологических процессов и технико-экономических показателей производства на основе экспериментальных данных, полученных для синтетических сообществ МС5 и МС7. Конкретные значения, подставляемые в зависимости, а также результаты расчётов представлены в соответствующих подразделах.

## 4.2. Блок-схема культивирования синтетического сообщества МС5

На основании обоснованных в предыдущем разделе условий ведения культивирования для сообщества МС5 была разработана принципиальная блок-

схема, отражающая последовательность основных технологических операций и материальных потоков. Предлагаемая схема базируется на одностадийном непрерывном режиме культивирования в нестерильных условиях с использованием технического метана в качестве субстрата и среды, оптимизированной для накопления биомассы. При построении блок-схемы учитывалась необходимость подготовки посевного материала, приготовления питательной среды, подачи метановоздушной смеси, а также стадий последующего сгущения, инактивации и сушки биомассы. На рисунке 22 представлена блок-схема, иллюстрирующая ключевые этапы предлагаемого технологического процесса.

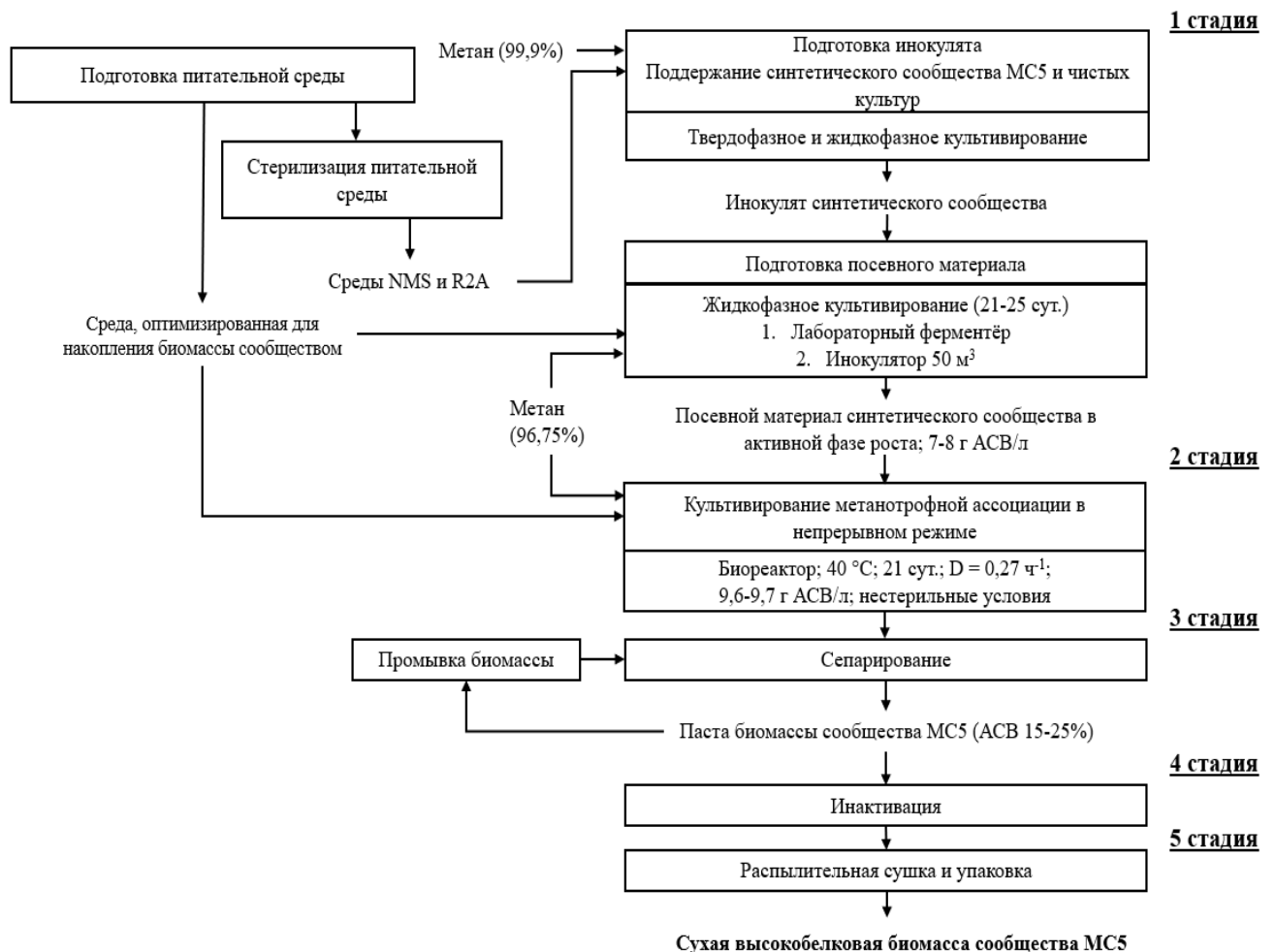


Рисунок 22 – Блок-схема культивирования сообщества MC5

Разработанная блок-схема предусматривает получение высушенной биомассы метанотрофного сообщества с высоким содержанием белка в качестве продукта.

На первой стадии осуществляют процесс поддержания и подготовки инокулята разработанного сообщества. С данной целью музейные культуры *M. capsulatus* KS-24, а также выбранные на основании скрининга парных и тройных сообществ неметанотрофные спутники (в данной работе *Brevibacillus* sp. и *Ralstonia* sp.) поддерживают на твёрдых агаризованных средах AMS и R2A соответственно при температуре 40 °С. Для получения готового сообщества чистые культуры переносят в колбы объёмом 250 мл (объём среды 100 мл) и культивируют в периодическом режиме в стерильных условиях на среде AMS при температуре 40 °С и перемешивании 150-200 об/мин в течение трёх последовательных пересевов длительностью каждого, равную 4 суткам, и пересевом на следующий пассаж 5 об. % суспензии. На данном этапе используют метан высокой чистоты (99,9%). Результат создания синтетического метанотрофного сообщества оценивают методом светопольной микроскопии, а также на основании ростовых характеристик ассоциации.

Проводят процесс масштабирования процесса культивирования с переходом на непрерывные условия процесса. Инокулят выращивают на лабораторном ферментёре и далее на инокуляторе объёмом 50 м<sup>3</sup> мл со средой, оптимизированной для наработки биомассы при сходных условиях. Суммарное время данной стадии составляет 21-25 суток. Посевной материал сообщества в активной фазе роста направляют на стадию культивирования.

На второй стадии проводят процесс культивирования синтетического метанотрофного сообщества в непрерывном режиме и нестерильных условиях при использовании метана технической чистоты на среде, оптимизированной для увеличения наработки бактериальной биомассы в концентрации, необходимой для отсутствия лимитирования по компонентам. В стабильном хемостате удельная скорость разбавления составляет 0,27 ч<sup>-1</sup>, а концентрация биомассы находится в

диапазоне 9,6-9,7 г АСВ/л. Длительность одного цикла непрерывного культивирования равняется 21 суткам.

Суспензию метанотрофного синтетического сообщества на третьей стадии сгущают на сепараторе до показателя АСВ 20 % в получаемой пасте. С целью удаления остаточного содержания компонентов среды и внеклеточных метаболитов, оставшихся во влажном продукте, пасту ресуспендируют в воде и сепарируют повторно.

Четвёртая стадия включает инактивацию получаемой биомассы острым водяным паром при температуре 121 °С в течение 15 минут. Внедрение данной стадии позволяет соответствовать требованиям к отсутствию живых клеток продуцентов при производстве высокобелковой биомассы с потенциалом применения в кормовых целях [342].

На пятой стадии биомассу высушивают методом распылительной сушки до остаточного содержания влаги, не превышающего 10 %. Сухой порошок упаковывают в герметичные тары, ограничивающие попадание влаги.

#### **4.3. Расчёт технико-экономических показателей для сообщества МС5 при годовом объёме производства 10000 тонн сухой по биомассе**

На основании выбранного в разделе 4.1 оптимального режима культивирования синтетического сообщества МС5 и разработанной схемы технологического процесса (раздел 4.2) ниже представлен расчёт основных технико-экономических показателей производства при годовом выпуске 10000 тонн готовой продукции. Расчёт выполнен с учётом определённых в ходе экспериментальной работы технологических параметров, которые отображены в таблице 20, а также с использованием справочных и литературных данных для оценки стоимости сырья, энергозатрат, капитальных вложений и эксплуатационных расходов.

Последовательность расчёта включает определение потребности в основном оборудовании, затрат на сырьё и материалы, энергоресурсы, трудовых ресурсов, а также итоговую калькуляцию себестоимости продукта.

Установлено, что в условиях лимита по кислороду для метанотрофных культур, рассматриваемых в качестве продуцента высокобелковой биомассы экономический коэффициент  $Y_S^X$  находится в диапазоне от 0,80 до 1,36 в зависимости от технологии культивирования и состава среды, что в дальнейшем было использовано для проведения расчётов [146, 152, 343].

Таблица 20 – Параметры для расчёта культивирования сообщества МС5

Параметр	Значение
Концентрация биомассы по АСВ ( $X_{АСВ}$ ), г/л	9,67
Скорость протока (D), ч <sup>-1</sup>	0,27
Удельный расход газовой смеси ( $k_r$ ), м <sup>3</sup> /(м <sup>3</sup> ·мин);	1,25
Доля метана в газовой смеси, %	25
Длительность одного цикла культивирования, сутки	21
Время выхода на стабильный режим ( $\tau_{ст}$ ), час	26
Доля стабильной работы после выхода на режим ( $K_{ст}$ ), %	82
Продуктивность по биомассе ( $P_x$ ), кг/(м <sup>3</sup> ·ч)	2,61
Доля сырого протеина от АСВ биомассы, масс. %	72,09

#### 4.3.1. Эффективный фонд рабочего времени оборудования

Длительность одного рабочего цикла ферментёра составляет 21 сутки (504 ч), после чего аппарат останавливают для санитарной подготовки и регламентных работ продолжительностью 24 часа. Таким образом, полная длительность цикла с учётом простоя составляет 528 ч.

При расчёте первого производственного цикла необходимо также учитывать время на подготовку посевного материала, которое составляет 25 суток (600 ч) с учётом создания синтетического сообщества и оценки его ростовых характеристик, что необходимо учитывать при определении количества циклов культивирования, которые могут быть выполнены в течение года. Следовательно, время от начала подготовки инокулята до завершения первого культивирования составляет 1128 часов. Таким образом, с учётом годового фонда времени, равного 8760 часам, количество полных циклов культивирования за один год равняется 15.

Общее время работы ферментёров (от момента засева до остановки) за год составляет  $15 \cdot 504 = 7560$  ч. С учётом данных, приведённых в таблице 13, в начале каждого цикла требуется 26 ч для выхода процесса на стабильный хемотратный режим ( $\tau_{ст}$ ), суммарное время выхода на режим составит 390 часов, что снижает время стабильной работы до 7170 ч. Коэффициент стабильности процесса ( $K_{ст}$ ), характеризующий долю времени, в течение которого отслеживаемые параметры культивирования находятся в допустимых пределах, в соответствии с таблицей 13 равен 82%. Следовательно, эффективное время работы с расчётной производительностью ( $T_{эфф}$ ), учитывающее возможные отклонения, составляет  $7170 \cdot 0,82 = 5879,4$  ч.

#### 4.3.2. Подбор оборудования

Готовая продукция представляет собой высушенную биомассу с остаточной влажностью не более 10 %, следовательно, для выпуска 10000 т готового продукта в год требуется произвести 9000 т абсолютно сухой биомассы по АСВ. На стадиях культивирования, сепарирования и сушки неизбежны потери, оцениваемые в 10 % от теоретического выхода. Таким образом, масса АСВ ( $M_{АСВ}$ ), которая должна быть произведена в ферментёрах, составляет 10000 т/год.

Тогда, часовая производительность по АСВ биомассы ( $G_{общ}^{АСВ}$ ), необходимая для достижения данного показателя составит:

$$G_{общ}^{АСВ} = \frac{M_{АСВ}}{T_{эфф}} = \frac{10000000 \text{ кг}}{5879,4 \text{ ч}} = 1700,9 \text{ кг/ч.}$$

Необходимый суммарный рабочий объём биореакторов ( $V_{\Phi}^{раб}$ ) рассчитывается в соответствии с уравнением:

$$V_{\Phi}^{раб} = \frac{M_{АСВ}}{P_X \cdot T_{эфф}} = \frac{10000000 \text{ кг АСВ}}{2,61 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3 \cdot \text{ч}} \cdot 5879,4 \text{ ч}} = 651,7 \text{ м}^3.$$

С учётом необходимости создания технологического запаса, обеспечивающего устойчивую работу при возможных колебаниях параметров культивирования, принимаем суммарный рабочий объём равным  $660 \text{ м}^3$ . Данный объём целесообразно реализовать в виде четырёх ферментёров одинакового

рабочего объёма, один из которых находится в резерве или на санитарной обработке, а три одновременно задействованы в производственном цикле. Тогда, рабочий объём одного аппарата составит  $220 \text{ м}^3$ , что соответствует номинальному объёму биореактора  $275 \text{ м}^3$  при коэффициенте заполнения  $0,80$ . Таким образом, фактическая годовая производительность по АСВ биомассы при трёх работающих ферментёрах с учётом потерь на стадиях выделения и сушки составит  $10127 \text{ т/год}$ , что превышает целевой показатель на  $1,3 \%$ , тем самым создавая необходимый резерв производственной мощности.

Расчёт системы подачи питательной среды требует оценки часового расхода, из чего был сделан вывод о её годовой потребности, а также необходимом количестве всех реактивов.

Часовой расход среды на один ферментёр ( $W_{\phi,1}^{\text{cp}}$ ) составляет:

$$W_{\phi,1}^{\text{cp}} = V_{\phi,1}^{\text{раб}} \cdot D = 220 \text{ м}^3 \cdot 0,27 \text{ ч}^{-1} = 59,4 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Тогда суммарный часовой расход ( $W_{\text{общ}}^{\text{cp}}$ ) на три рабочих ферментёра ( $n_{\phi} = 3$ ):

$$W_{\text{общ}}^{\text{cp}} = V_{\phi,1}^{\text{раб}} \cdot n_{\phi} = 59,4 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 3 = 178,2 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Таким образом, годовая потребность в питательной среде  $W_{\text{общ,год}}^{\text{cp}}$ :

$$W_{\text{общ,год}}^{\text{cp}} = W_{\text{общ}}^{\text{cp}} \cdot T_{\text{эфф}} = 178,2 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 5879,4 \text{ ч} = 1047709 \approx \\ \approx 1050000 \text{ м}^3/\text{год}.$$

Для приготовления среды выбрана станция производительностью  $210 \text{ м}^3/\text{ч}$ , что создаёт запас около  $18 \%$  относительно максимального часового потребления и позволяет оперативно корректировать состав. Запас готовой среды хранится в трёх ёмкостях по  $5000 \text{ м}^3$  каждая; такого объёма достаточно для обеспечения непрерывной работы в течение  $84$  часов при полной загрузке, что покрывает возможные перерывы в работе станции или задержки поставок. Подача среды в ферментёры осуществляется  $12$  дозировочными насосами (по числу точек ввода) производительностью  $15 \text{ м}^3/\text{ч}$  каждый. Насосы оснащены частотным регулированием, что позволяет точно поддерживать заданную скорость протока.

Таким образом, с учётом корректировки рабочего объёма биореактора часовая производительность по АСВ составит:

$$G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}} = W_{\text{общ}}^{\text{ср}} \cdot X = 178,2 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 9,67 \text{ кг}/\text{м}^3 = 1723,2 \text{ кг}/\text{ч}.$$

Для культивирования метанотрофного сообщества МС5 используется метановоздушная смесь с объёмной долей метана 25 %. Удельный расход газовой смеси составляет 1,25 объёма газа ( $\text{м}^3$ ) на  $1 \text{ м}^3$  рабочего объёма биореактора в минуту (в соответствии с разделом 3.10). Тогда часовой расход газовой смеси на один ферментёр ( $W_{\text{ф},1}^{\text{Г}}$ ):

$$W_{\text{ф},1}^{\text{Г}} = \frac{1,25 V_{\text{ф}}^{\text{раб}}}{\text{мин}} = 275 \text{ м}^3/\text{мин} = 16500 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Суммарный часовой расход на три ферментёра ( $W_{\text{общ}}^{\text{Г}}$ ) составит  $49500 \text{ м}^3/\text{ч}$ .

Расход метана при 25 % содержании в газовой смеси с учётом чистоты 96,75%:

$$W_{\text{общ}}^{\text{CH}_4} = W_{\text{общ}}^{\text{Г}} \cdot \varphi_{\text{CH}_4} = 49500 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 0,25 \cdot 0,9675 = 11973 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Что соответствует массовому расходу метана ( $G_{\text{общ}}^{\text{CH}_4}$ ) при плотности ( $\rho_{\text{CH}_4}$ )  $0,717 \text{ кг}/\text{м}^3$ :

$$G_{\text{общ}}^{\text{CH}_4} = W_{\text{общ}}^{\text{CH}_4} \cdot \rho_{\text{CH}_4} = 11973 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 0,717 \text{ кг}/\text{м}^3 = 8584,5 \text{ кг}/\text{ч}.$$

Исходя из расходного коэффициента  $\alpha_X^{\text{CH}_4}=0,9$ ; расход потребляемого метана равняется:

$$G_{\text{потр}}^{\text{CH}_4} = G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}} \cdot \alpha_X^{\text{CH}_4} = 1723,2 \text{ кг}/\text{ч} \cdot 0,9 \frac{\text{кг CH}_4}{\text{кг АСВ}} = 1550,88 \frac{\text{кг CH}_4}{\text{ч}}.$$

Соответственно, степень потребления метана ( $\eta_{\text{CH}_4}$ ) составляет  $1530,81/8584,5 = 0,181$ , что согласуется с литературными данными для оптимального роста *M. capsulatus* и сообществ на их основе.

Объёмный расход воздуха  $W_{\text{общ}}^{\text{возд}}$  рассчитывали как разность общего расхода метановоздушной смеси и метана:

$$W_{\text{общ}}^{\text{возд}} = W_{\text{общ}}^{\text{Г}} - W_{\text{общ}}^{\text{CH}_4} = 49500 \text{ м}^3/\text{ч} - 11973 \text{ м}^3/\text{ч} = 37527 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Тогда массовый расход подаваемого кислорода  $G_{\text{общ}}^{\text{O}_2}$  составит:

$$G_{\text{общ}}^{O_2} = W_{\text{общ}}^{\text{возд}} \cdot \varphi_{O_2} \cdot \rho_{O_2} = 37527 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 0,21 \cdot 1,29 \text{ кг}/\text{м}^3 = 10166 \text{ кг}/\text{ч}.$$

Для подачи метана установлены четыре винтовых компрессора (три рабочих, один резервный) производительностью по 5000 м<sup>3</sup>/ч. Для подачи воздуха используются четыре винтовых компрессора производительностью по 14 000 м<sup>3</sup>/ч каждый (три рабочих, один резервный). Смешение газов осуществляется тремя статическими смесителями производительностью 20000 м<sup>3</sup>/ч каждый.

С учётом стехиометрии теплота жизнедеятельности ( $q_{\text{ж}}$ ) составляет  $6,7025 \cdot 10^3$  ккал/кг АСВ, следовательно, общая тепловая нагрузка, обусловленная процессами жизнедеятельности ( $Q_{\text{ж}}$ ) составит:

$$Q_{\text{ж}} = G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}} \cdot q_{\text{ж}} = 1723,2 \frac{\text{кг}}{\text{ч}} \cdot 6,7025 \cdot 10^3 \text{ ккал}/\text{кг} = 11550 \cdot 10^3 \text{ ккал}/\text{ч} \approx \approx 13433 \text{ кВт}.$$

Расход оборотной воды при перепаде температур  $\Delta t = 10$  °С и теплоёмкости воды  $c_{\text{в}} = 4,19$  кДж/(кг·К) равняется:

$$G^{\text{об.воды}} = \frac{Q_{\text{ж}}}{c_{\text{в}} \cdot \rho_{H_2O} \cdot \Delta t} = 3600 \cdot \frac{13433 \text{ кВт}}{4,19 \left( \frac{\text{кДж}}{\text{кг} \cdot \text{К}} \right) \cdot 10 \cdot 1000 \text{ кг}/\text{м}^3} = 1154,2 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

В каждом ферментёре установлены три последовательно соединённых кожухотрубных теплообменника с поверхностью теплопередачи 200–250 м<sup>2</sup> каждый, что в сумме даёт 12 теплообменников. Для охлаждения оборотной воды выбраны три вентиляторные градирни производительностью по 400 м<sup>3</sup>/ч. Для обеспечения непрерывности подачи оборотной воды приняты три центробежных насоса производительностью по 400 м<sup>3</sup>/ч.

Со стадии культивирования поступает суспензия со средней концентрацией биомассы по АСВ 9,67 кг/м<sup>3</sup>, что при объёмном потоке  $W_{\text{общ}}^{\text{ср}}$ , равном 178,2 м<sup>3</sup>/ч, обеспечивает массовый поток  $G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}}$ , равный 1723,2 кг/ч:

Объёмный поток сгущённой биомассы после сепарирования до пасты с долей АСВ 20% составит:

$$W_{\text{сеп}}^{\text{сгущ.б}} = \frac{G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}}}{c_{\text{сеп}}^{\text{сгущ.б}}} = \frac{1723,2 \text{ кг}/\text{ч}}{200 \text{ кг}/\text{м}^3} = 8,616 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Сгущённая паста биомассы после первой ступени направляется в ёмкость для промывки, куда подаётся промывная вода для удаления остаточных солей и метаболитов. Соотношение пасты и воды при промывке принимается 1:2 по объёму. Тогда объём суспензии, поступающей на повторное сепарирование, составит:

$$W_{\text{сеп}}^{\text{пром.б}} = W_{\text{сеп}}^{\text{сгущ.б}} + 2W_{\text{сеп}}^{\text{сгущ.б}} = 3W_{\text{сеп}}^{\text{сгущ.б}} = 25,848 \text{ м}^3/\text{ч}$$

Расход промывной воды ( $G_{\text{промывка}}^{\text{H}_2\text{O}}$ ) составляет 17,232 м<sup>3</sup>/ч.

Объёмный поток сгущённой промытой биомассы после сепарирования  $W_{\text{сеп}}^{\text{пром.б}}$  с условием, что возможные потери на промывке и центрифугировании были заложены при предварительных расчётах, равен  $W_{\text{сеп}}^{\text{сгущ.б}}$ , а массовый поток промытой биомассы  $G_{\text{сеп}}^{\text{пром.б}}$  для оценочного расчёта приравнен  $W_{\text{сеп}}^{\text{сгущ.б}}$  и составляет 8616 кг/ч. На стадии сепарирования планируется использование двух сепараторов производительностью по суспензии 100 м<sup>3</sup>/ч и одного производительностью 30 м<sup>3</sup>/ч. Предусмотрена ёмкость для промывной воды объёмом 50 м<sup>3</sup>.

Инактивация осуществляется острым паром при температуре 121 °С с временем выдержки 15 минут (0,25 ч<sup>-1</sup>). Для обеспечения непрерывности процесса был выбран трубчатый нагреватель-выдерживатель (инактиватор) с паровой рубашкой или системой прямого впрыска пара. Необходимый рабочий объём аппарата ( $V_{\text{общ}}^{\text{инакт}}$ ) для обеспечения целевого времени прохождения биомассы через инактиватор ( $\tau_{\text{выд}}$ ) составляет:

$$V_{\text{общ}}^{\text{инакт}} = W_{\text{сеп}}^{\text{пром.б}} \cdot \tau_{\text{выд}} = 8,616 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 0,25 \text{ ч} = 2,154 \text{ м}^3$$

Был выбран инактиватор объёмом 2,2 м<sup>3</sup>, выполненный из нержавеющей стали, с системой автоматического поддержания температуры и давления. При теплоёмкости промытой пасты биомассы, равной 3,624 кДж/(кг·К), рассчитанной как средневзвешенное значение с учётом теплоёмкости сухой биомассы и её массовой доли.

Тогда тепло, необходимое для нагрева промытой сгущённой суспензии после сепаратора ( $Q_{\text{инакт}}$ ), составляет:

$$Q_{\text{инакт}} = G_{\text{сеп}}^{\text{пром.б}} \cdot c_{\text{пром.б}} \cdot \Delta t = 8616 \text{ кг/ч} \cdot 3,624 \left( \frac{\text{кДж}}{\text{кг} \cdot \text{К}} \right) \cdot (121 - 25) = \\ = 2997,6 \cdot 10^3 \text{ кДж/ч}$$

С учётом потерь тепла в окружающую среду (10 %) общая тепловая нагрузка ( $Q_{\text{общ}}^{\text{инакт}}$ ) составляет  $3330,6 \cdot 10^3$  кДж/ч. Следовательно, расход пара с учётом удельной теплоты парообразования воды ( $r$ ) 2260 кДж/кг составляет:

$$G_{\text{инакт}}^{\text{пар}} = \frac{Q_{\text{общ}}}{r} = \frac{3330600 \text{ кДж/ч}}{2260 \text{ кДж/кг}} = 1473,7 \text{ кг/ч} \approx 1,47 \text{ т/ч}$$

Годовой расход пара в данном случае составляет 8664,6 т/год

Промытая и инактивированная сгущённая суспензия с концентрацией 200 кг/м<sup>3</sup> поступает на сушку при часовом потоке  $G_{\text{инакт}}^{\text{биом}} = 8616$  кг/ч. Количество влаги, подлежащей удалению, определяется из условия получения готового продукта с влажностью не более 10 %. При начальной влажности суспензии 80 % (массовая доля сухих веществ 20 %) масса влаги в промытой сгущённой суспензии:

$$G_{\text{инакт}}^{\text{H}_2\text{O}} = G_{\text{инакт}}^{\text{биом}} \cdot (1 - 0,20) = 8664,6 \text{ кг/ч} \cdot 0,80 = 6931,68 \text{ кг/ч}$$

В готовом продукте при влажности не более 10% масса влаги ( $G_{\text{продукт}}^{\text{H}_2\text{O}}$ ) составит:

$$G_{\text{продукт}}^{\text{H}_2\text{O}} = \frac{G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}}}{0,9} - G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}} = \frac{1723,2 \text{ кг/ч}}{0,9} - 1723,2 \text{ кг/ч} = 191,47 \text{ кг/ч}$$

Соответственно, количество испаряемой влаги на стадии сушки равняется:

$$G_{\text{исп}}^{\text{H}_2\text{O}} = G_{\text{инакт}}^{\text{H}_2\text{O}} - G_{\text{продукт}}^{\text{H}_2\text{O}} = 6931,68 \text{ кг/ч} - 191,47 \text{ кг/ч} = 6740,21 \text{ кг/ч} \approx \\ \approx 6,74 \text{ т/ч}$$

Для сушки выбрана распылительная сушилка, которая обеспечивает мягкий режим сушки (кратковременное воздействие температуры) и позволяет сохранить нативные свойства белка, а также получить однородный порошок с заданными физико-химическими характеристиками. Производительность сушилки по испарённой влаге должна быть не менее 7 т/ч. Сушилка комплектуется системой подачи суспензии (насос высокого давления), форсунками, циклоном и рукавным фильтром для улавливания готового продукта. Высушенный продукт через систему пневмотранспорта направляется на упаковку.

Таким образом, был проведён предварительный расчёт оборудования (таблица 21), необходимого для организации производства мощностью 10000 т/год готового продукта на основе синтетического сообщества МС5.

Таблица 21 – Основное оборудование

Наименование	Характеристика	Количество
Биореактор	Рабочий объём 220 м <sup>3</sup> , полный объём 275 м <sup>3</sup> , нержавеющая сталь, с рубашкой охлаждения, датчиками рН, рО <sub>2</sub> , температуры	4
Инокулятор	Объём 50 м <sup>3</sup> ; нержавеющая сталь, с рубашкой и мешалкой	1
Станция приготовления питательной среды	Производительность до 200 м <sup>3</sup> /ч	1
Ёмкость запаса среды	5000 м <sup>3</sup> , нержавеющая сталь, с перемешиванием	3
Дозировочный насос	15 м <sup>3</sup> /ч; с частотным регулированием	12
Компрессор винтовой для метана	5000 м <sup>3</sup> /ч, давление 0,3–0,5 МПа, взрывозащищённое исполнение	4
Компрессор воздушный винтовой	14000 м <sup>3</sup> /ч, давление 0,3–0,5 МПа	4
Смеситель газовый статический	20000 м <sup>3</sup> /ч, нержавеющая сталь	3
Теплообменник кожухотрубный	Площадь 200–250 м <sup>2</sup> , нержавеющая сталь	12
Градирия вентиляторная	400 м <sup>3</sup> /ч по охлаждаемой воде	3
Насос циркуляционный	400 м <sup>3</sup> /ч, напор 0,3–0,4 МПа	3
Сепаратор-сгуститель тарельчатый	100 м <sup>3</sup> /ч по суспензии	2
Сепаратор-сгуститель тарельчатый	30 м <sup>3</sup> /ч по суспензии	1
Ёмкость для промывной воды	50 м <sup>3</sup> , нержавеющая сталь	1
Насос центробежный	100 м <sup>3</sup> /ч, нержавеющая сталь	2
Насос центробежный	30 м <sup>3</sup> /ч, нержавеющая сталь	1
Инактиватор трубчатый	Рабочий объём 2,2 м <sup>3</sup> , нержавеющая сталь	1
Сушилка распылительная	7000 кг/ч по испарённой влаге	1
Система пневмотранспорта и упаковки	Комплекс фасовки в мешки по 25 кг	1

#### 4.3.3. Расчёт капитальных затрат и амортизации

На основании выбранного в разделе 4.3.2 оборудования выполнена оценка его стоимости (таблица 22), а также произведён расчёт капитальных вложений,

необходимых для создания производства мощностью 10000 т/год высушенной биомассы синтетического сообщества MC5. Расчёт произведён с использованием укрупнённых нормативов, принятых в практике проектирования биотехнологических производств.

Таблица 22 – Стоимость основного технологического оборудования при культивировании синтетического сообщества MC5

Наименование	Количество	Цена за ед., млн руб.	Общая стоимость, млн руб.
Ферментёр	4	320	1 280
Инокулятор	1	28	28
Станция приготовления концентрата	1	170	170
Ёмкость запаса среды	3	48	144
Насос-дозатор	12	1,0	12,0
Компрессор винтовой для метана	4	38	152
Компрессор воздушный винтовой	4	32	128
Смеситель газовый статический	3	9,5	28,5
Теплообменник кожухотрубный	12	4,5	54,0
Градирня вентиляторная	3	27	81
Насос циркуляционный	3	1,6	4,8
Сепаратор-сгуститель тарельчатый	2	44	88
Сепаратор-сгуститель тарельчатый	1	28	28
Ёмкость для промывной воды	1	5,2	5,2
Насос центробежный	2	0,6	1,2
Насос центробежный	1	0,45	0,45
Инактиватор трубчатый	1	22	22
Сушилка распылительная	1	210	210
Система пневмотранспорта и упаковки	1	28	28
Внутрицеховые коммуникации, КИП, арматура			265
<b>ИТОГО стоимость оборудования</b>			<b>2 773,15</b>

К прямым капитальным затратам (таблица 23) относили: стоимость оборудования, затраты на его доставку и монтаж, а также стоимость строительно-монтажных работ (СМР) по возведению зданий и сооружений, фундаментов, эстакад и внутриплощадочных сетей.

Таблица 23 – Расчёт прямых капитальных затрат

Показатель	Расчёт	Сумма, млн руб.
Стоимость оборудования	Таблица 22	2773,15
Транспортные расходы и монтаж	15% от стоимости оборудования	415,97
Строительно-монтажные работы	40% от стоимости оборудования	1109,26
<b>Итого прямые затраты</b>		<b>4298,38</b>

Далее были вычислены прочие затраты, к которым относят проектные работы, пусконаладочные работы (ПНР) и непредвиденные расходы, по результатам чего были установлены капитальные вложения (таблица 24).

Таблица 24 – Расчёт капитальных вложений

Показатель	Расчёт	Сумма, млн руб.
Прямые затраты	Таблица 21	4298,38
Проектные работы	5% от прямых затрат	214,92
Пусконаладочные работы	3% от прямых затрат	128,95
Непредвиденные расходы	7% от прямых затрат	300,89
<b>Итого капитальные вложения</b>		<b>4943,14</b>

Для последующего расчёта амортизации было выделено две группы: здания и сооружения, принимаемая равной СМР, а также оборудование (включая инженерные системы и прочие капитализируемые затраты). В соответствии с разделением и на основании норм амортизации была определена годовая амортизация (таблица 25).

Таблица 25 – Расчёт годовой амортизации

Показатель	Стоимость, млн. руб.	Норма амортизации, %	Годовая амортизация, млн руб.
Здания и сооружения	1109,26	3,0	33,28
Оборудование и прочее	2773,15	10,0	277,32
<b>Итого</b>	<b>3882,41</b>	—	<b>310,60</b>

#### 4.3.4. Расчёт стоимости сырья и основных материалов

На основании определённой годовой потребности в компонентах питательной среды, метане и воде выполнен расчёт затрат на сырьё и основные материалы для производства 10000 т/год биомассы сообщества MC5 по АСВ. Цены приняты по данным открытых источников на 2026 год с учётом прогнозируемой индексации.

Стоимость метана была принята за 8,5 руб/м<sup>3</sup> (среднеоптовая цена для крупных промышленных потребителей). Тогда с учётом подачи метана в количестве 11973 м<sup>3</sup>/ч, годовая стоимость составит 598,47 млн руб.

Потребление воды складывается из двух основных потоков: вода для приготовления питательной среды (соответствует по значению  $W_{\text{общ,год}}^{\text{ср}}$ ), а также воды на промывке биомассы, годовая потребность которой составляет:

$$G_{\text{промывка,год}}^{H_2O} = G_{\text{промывка}}^{H_2O} \cdot T_{\text{эфф}} = 17,232 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 5879,4 \text{ ч} = 101313 \text{ м}^3/\text{год}.$$

При расчёте годовой стоимости воды исходили из цены 15 руб./м<sup>3</sup>.

Тогда, годовые затраты на воду составляют 17,27 млн руб.

Годовая потребность в массе каждого компонента питательной среды рассчитывается по уравнению 27:

$$G_i = W_{\text{общ,год}}^{\text{ср}} \cdot C_i \quad (27)$$

где  $G_i$  – годовая потребность компонента питательной среды, т/г;

$W_{\text{общ,год}}^{\text{ср}}$  – годовая потребность в питательной среде, м<sup>3</sup>/год;

$C_i$  – концентрация компонента, кг/м<sup>3</sup>.

На основании полученных значений определяли стоимость каждого компонента, а также общую стоимость питательной среды (таблица 26).

Таблица 26 – Стоимость компонентов питательной среды, оптимизированной для наработки биомассы метанотрофных сообществом МС5

Компонент	Расход компонента, кг/м <sup>3</sup>	Стоимость 1 кг компонента, руб	Годовая потребность, т/г	Стоимость компонента, за год, млн руб
Калий азотнокислый	1,00	45	1050,0	47,25
Аммоний хлористый	3,50	55	3675,0	202,13
Магний сернокислый 7-водн.	0,60	22	630	13,86
Кальций хлористый 2-водн.	0,075	18	78,75	1,42
Калий фосфорнокислый 1-зам.	2,63	80	2761,5	220,92
Натрий фосфорнокислый 2-зам. 12-водн.	0,24	35	252	8,82
Трилон Б	$2,50 \cdot 10^{-3}$	165	2,625	0,43
Медь хлористая 5-водн.	$14,05 \cdot 10^{-3}$	420	14,75	6,2
Железо сернокислое 7-водн.	$10,45 \cdot 10^{-3}$	75	10,97	0,82
Борная кислота	$0,15 \cdot 10^{-3}$	110	0,158	0,017
Цинк сернокислый 7-водн.	$0,05 \cdot 10^{-3}$	140	0,053	0,007
Кобальт хлористый 6-водн.	$0,01 \cdot 10^{-3}$	750	0,105	0,079
Марганец хлористый 4-водн.	$15 \cdot 10^{-6}$	185	0,016	0,003
Никель хлористый 6-водн.	$10 \cdot 10^{-6}$	600	0,011	0,006
Натрий молибденовокислый	$15 \cdot 10^{-6}$	520	0,016	0,008
Метанол	0,158	35	165,9	5,81
<b>Итого</b>				<b>531,16</b>

Таким образом, были определены суммарные годовые затраты на сырьё и материалы, что отображено в таблице 27.

Таблица 27 – Структура затрат на сырьё и материалы

Статья затрат	Годовая стоимость, млн. руб	Доля, %
Питательная среда	599,41	46,3
Метан	598,47	52,2
Вода	17,27	1,5
<b>Итого</b>	<b>1146,90</b>	<b>100</b>

### 4.3.5. Расчёт количества и стоимости энергоресурсов

В данном блоке расчётов учтены такие виды энергоресурсов как электроэнергия, потребляемая основным и вспомогательным оборудованием; тепловая энергия (пар) для инактивации биомассы, а также для отопления и вентиляции производственных помещений; вода на подпитку системы оборотного охлаждения.

Для проведения расчётов принимали тариф для электроэнергии, равный 6,80 руб./кВт·ч, а для тепловой энергии – 2 904 руб./Гкал. Годовое потребление электроэнергии определено на основе установленной мощности оборудования, коэффициентов использования и времени работы в соответствии с уравнением 28.

$$W_i = N_i \cdot k_{\text{исп},i} \cdot T_{\text{раб},i} \quad (28)$$

где  $W_i$  – годовое потребление электроэнергии  $i$ -й группой оборудования, тыс. кВт·ч;

$N_i$  – суммарная установленная мощность  $i$ -й группы, кВт;

$k_{\text{исп},i}$  – коэффициент использования мощности;

$T_{\text{раб},i}$  – годовое время работы оборудования.

Также учитывали затраты на вспомогательное оборудование (освещение, КИП, вентиляция, прочее), принятые в размере 10 % от суммы прямых затрат основного оборудования.

Тепловую энергию учитывали для процесса инактивации биомассы перед сушкой, а также на отопление производственных помещений. В соответствии с установленным ранее расходом пара: 8664,6 т/год. Годовой объём воды на подпитку системы охлаждения рассчитывали на основании потерь в оборотном цикле, равным 4% от расхода.

На данных основания был проведён расчёт годовой стоимости энергоресурсов, результат которого приведён в таблице 28.

Таблица 28 – Структура затрат на энергоресурсы

Статья затрат	Годовая стоимость, млн. руб	Доля, %
Электроэнергия	159,4	82,8
Тепловая энергия	29,1	15,1
Вода на подпитку системы охлаждения	4,07	2,1
<b>Итого</b>	<b>192,57</b>	<b>100</b>

#### 4.3.6. Расчет затрат на оплату труда персонала

Для основных производственных рабочих, занятых на непрерывном процессе, принят 4-бригадный график с 12-часовыми сменами. Эффективный фонд рабочего времени рассчитан в таблице 29.

Таблица 29 – Баланс рабочего времени одного среднесписочного рабочего

Показатель	Значение
Календарный фонд, дни	365
Количество рабочих смен в году	183
Номинальный фонд рабочего времени, ч	2190
Планируемые невыходы, всего, ч	256
в том числе:	
- очередные и дополнительные отпуска, ч	168
- болезни и прочее, ч	88
Эффективный (полезный) фонд рабочего времени, ч	1934

Для вспомогательного персонала и административно-управленческих работников принят 5-дневный график с 8-часовым рабочим днём. Эффективный фонд рабочего времени для этих категорий составляет 1725 ч в год.

В соответствии с технологической схемой производства и нормами обслуживания оборудования была определена штатная численность персонала и рассчитан соответствующий фонд оплаты труда, что отображено в таблице 30.

Таблица 30 – Годовой фонд оплаты труда

Категория персонала	Штатная численность, чел.	Среднемесячная зарплата, тыс. руб.	Годовой ФОТ, млн руб.
Основные производственные рабочие	16	120	23,04
Вспомогательный персонал	12	95	13,68
Административно-управленческие работники и специалисты	8	150	14,40
Страховые взносы			15,34
<b>ИТОГО</b>			<b>66,46</b>

#### 4.3.7. Расчёт себестоимости готовой продукции

Расчёт полной себестоимости производства 10000 тонн готового продукта (высушенной промытой и инактивированной биомассы синтетического сообщества MC5) выполнен на основе данных, полученных в предыдущих разделах. Фактическая годовая производительность в соответствии с расчётами составляет 10131 т готового продукта, что превышает плановый показатель 10000 т на 1,3 %. Для удобства дальнейшего анализа расчёт в таблице 31 выполнен на фактический выпуск биомассы.

Таблица 31 – Себестоимость производства биомассы сообщества MC5

Статья затрат	Сумма, млн руб.
Сырьё и основные материалы	1146,90
Энергоресурсы	192,57
Оплата труда с отчислениями	66,46
Амортизация	310,60
<b>Итого прямые затраты</b>	<b>1716,53</b>
Общепроизводственные расходы (12% от прямых затрат)	20,98
<b>Итого цеховая себестоимость</b>	<b>1922,51</b>
Общехозяйственные расходы (8% от цеховой себестоимости)	153,80
<b>Итого производственная себестоимость</b>	<b>2076,31</b>
Коммерческие расходы (3% от производственной себестоимости)	62,29
<b>Итого полная себестоимость фактического выпуска</b>	<b>2138,60</b>

Фактическую себестоимость продукта с учётом влажности рассчитывали в соответствии с уравнением 29:

$$C_{\text{факт}} = \frac{C_{\text{полн}}}{M_{\text{АСВ}} / (1 - \omega_{\text{вл}})}, \quad (29)$$

где  $C_{\text{факт}}$  – себестоимость готовой продукции, руб./т;

$C_{\text{полн}}$  – полная себестоимость фактического выпуска, руб.;

$M_{\text{АСВ}}$  – фактическая масса абсолютно сухой биомассы, т;

$\omega_{\text{вл}}$  – массовая доля влаги в готовом продукте, доли.

Таким образом, себестоимость производства 10000 тонн готового продукта с учётом влажности, равной 10%, при фактическом выпуске составляет:

$$C_{\text{факт}} = \frac{2138,60 \text{ млн руб}}{10127 \text{ т} / 0,9} = 190,1 \text{ тыс. руб./т.}$$

При пересчёте на плановый объём 10000 т переменные затраты (сырьё, энергия, оплата труда) корректируются пропорционально изменению объёма производства. Постоянные затраты (амортизация, общепроизводственные, общехозяйственные и коммерческие расходы) остаются неизменными, так как они не зависят от объёма выпуска в пределах небольшого изменения.

С учётом корректировки до планового количества было установлено, что себестоимость 1 тонны готового продукта при плановом выпуске составит **194,4** тыс. руб./т, что соответствует **194,4 руб/кг** продукта сухой биомассы синтетического сообщества МС5, а также **299,6 руб./кг** по белку. Проведение расчётов, аналогичных изложенным в разделах 4.3.2-4.3.7, для результатов культивирования сравниваемого аналога (сообщества *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874) себестоимость составила 217,1 руб/кг и 338,8 руб/кг белка. Таким образом, культивирование разработанного синтетического метанотрофного сообщества позволила снизить себестоимость производства 1 кг биомассы на 10,5 %, а белка – на 11,8 % по сравнению с культивированием смешанного метанотрофного сообщества при аналогичном технологическом подходе к ведению процесса. Анализ литературных данных показал, что себестоимость

производства 1 кг высокобелковой биомассы из метанотрофных микроорганизмов находится в диапазоне от 100 до 250 руб/кг, что также указывает на конкурентоспособность применения разработанного синтетического сообщества даже без применения дополнительной оптимизации процесса и внедрения инженерных решений, способствующих увеличению продуктивности [145, 344]. Потенциальное повышение эффективности культивирования, и как следствие, дальнейшее снижение себестоимости выпускаемого продукта возможно за счёт таких подходов, как применение избыточного давления в биореакторе, что позволяет интенсифицировать процессы массообмена и значительно увеличить продуктивность процесса, а также разработки систем подачи газовой смеси с увеличением площади соприкосновения фаз газ-жидкость, обогащение газовой фазы кислородом за счёт подачи метан-кислородных смесей, а также оптимизации процесса перемешивания, в том числе благодаря конструкционным решениям строения реакторов. [39, 146, 345-347].

#### **4.4. Блок-схема культивирования синтетического сообщества MS7**

Блок-схема, отображённая на рисунке 23, характеризует основные технологические стадии и потоки для получения бактериальной биомассы синтетического метанотрофного сообщества. Схема включает стадии подготовки, поддержания, а также получения инокулята и посевного материала с дальнейшим последовательным культивированием ассоциации в двух оптимальных для наработки биомассы и накопления в ней ПГБ условиях, сепарированием и сушкой полученной биомассы. Разработанная блок-схема предусматривает получение высушенной биомассы метанотрофного сообщества с высоким содержанием полигидроксипутирата в качестве продукта.

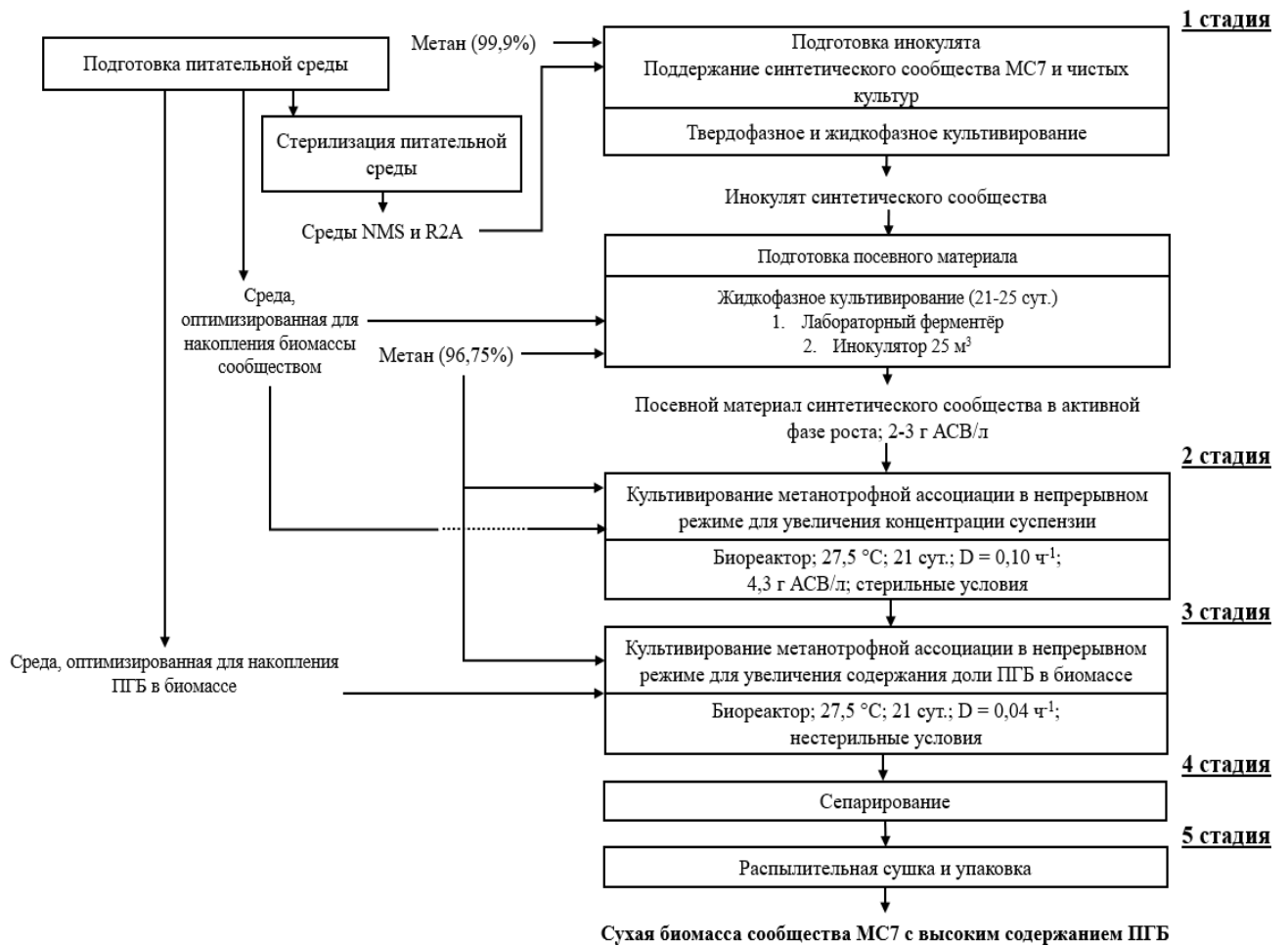


Рисунок 23 – Блок-схема культивирования сообщества MS7

Проводят процесс масштабирования процесса культивирования с переходом на непрерывные условия процесса. Инокулят выращивают на лабораторном ферментёре и далее на инокуляторе объёмом 25 м<sup>3</sup> мл со средой, оптимизированной для наработки биомассы при сходных условиях. Суммарное время данной стадии составляет 21-25 суток. Посевной материал сообщества в активной фазе роста направляют на стадию культивирования.

На второй стадии процесса проводят культивирования синтетического сообщества на биореакторе в непрерывном режиме с обеспечением стерильности при использовании метана технической чистоты на среде, оптимизированной для увеличения наработки бактериальной биомассы в концентрации, необходимой для отсутствия лимитирования по компонентам. В стабильном хемостате удельная скорость разбавления составляет 0,10 ч<sup>-1</sup>, а концентрация биомассы в среднем

составляет 4,3 г АСВ/л. Длительность одного цикла непрерывного культивирования равняется 21 суткам.

Получаемая суспензия направляется на третью стадию, где осуществляют процесс непрерывного культивирования в условиях, аналогичным предыдущему процессу культивирования, но с применением среды, оптимизированной для накопления ПГБ в биомассе, а также без обеспечения асептики и скоростью разбавления  $0,04 \text{ ч}^{-1}$ . Учитывая меньшую продуктивность второй стадии по биомассе для предварительной оценки было принято, что в условиях накопления ПГБ в клетках, их концентрация в среде остаётся неизменной, а продуктивность процесса определяется первым этапом культивирования. Длительность одного цикла непрерывного культивирования равняется 21 суткам.

На четвёртой стадии биомассу отделяют от культуральной жидкости методом сепарирования.

На пятой стадии сгущённую биомассу сушат методом лиофилизации и упаковывают. Применение лиофилизации обусловлено необходимостью сохранения полимерной структуры целевого полимера, которая под воздействием высоких температур может быть значительно нарушена [348].

#### **4.5. Расчёт технико-экономических показателей для сообщества МС7 при годовом объёме производства 1000 тонн по сухой биомассе**

На базе разработанной блок-схемы культивирования синтетического сообщества МС7 и определённых ранее ключевых технологических параметров был проведён расчёт основных технико-экономических показателей производства при годовом выпуске 1000 т абсолютно сухой биомассы. Расчёт выполнен с учётом определённых в ходе экспериментальной работы технологических параметров, которые отображены в таблице 32.

Для метанотрофов II типа характерен низкий экономически коэффициент по субстрату, составляющий в среднем 0,70 и 0,30 кг АСВ/кг  $\text{CH}_4$  на стадии роста биомассы и накопления ПГБ соответственно [165, 291].

Таблица 32 – Параметры для расчёта культивирования сообщества МС7

Параметр	Значение
Концентрация биомассы по АСВ на первой стадии ( $X_1$ ), г/л	4,29
Концентрация биомассы по АСВ на второй стадии ( $X_2$ ), г/л	4,29
Скорость протока на первой стадии ( $D_1$ ), ч <sup>-1</sup>	0,10
Скорость протока на второй стадии ( $D_2$ ), ч <sup>-1</sup>	0,04
Удельный расход газовой смеси ( $k_r$ ), м <sup>3</sup> /(м <sup>3</sup> ·мин);	0,75
Доля метана в газовой смеси, %	25
Длительность одного цикла культивирования, сутки	21
Время выхода на стабильный режим для первой стадии ( $\tau_{ст1}$ ), час	24,5
Время выхода на стабильный режим для второй стадии ( $\tau_{ст2}$ ), час	36,5
Доля стабильной работы после выхода на режим на первой стадии ( $K_{ст1}$ ), %	75
Доля стабильной работы после выхода на режим на второй стадии ( $K_{ст2}$ ), %	78
Продуктивность по биомассе первой стадии ( $P_{x1}$ ), кг/(м <sup>3</sup> ·ч)	0,429
Продуктивность по биомассе на второй стадии ( $P_{x2}$ ), кг/(м <sup>3</sup> ·ч)	0,429
Доля ПГБ от АСВ биомассы (второй этап), масс. %	38,1

#### 4.5.1. Эффективный фонд рабочего времени оборудования

При длительности культивирования, равного 21 суткам (504 часа) и учётом времени простоя (24 часа) полная длительность цикла составляет 528 часов. Первый производственный цикл требует дополнительного времени на подготовку посевного материала, которое составляет 25 суток (600 ч) что увеличивает первый цикл до 1128 часов.

Остаток времени после первого цикла (при годовом фонде времени 8760 часов) составляет 7632 ч. Следовательно, полное число последующих циклов равно 14, а общее количество с учётом первого составляет 15. Таким образом, суммарное время культивирования составляет  $15 \cdot 504 = 7560$  часов. С учётом времени выхода на стабильный режим культивирования, определённого для каждой из стадий, а также время стабильной работы по итогам выхода на режим было установлено, что эффективное время с расчётной продуктивностью для первой стадии составляет

5394 ч, а для второй – 5470 ч. Лимитирующей стадией является первая (накопление биомассы), поскольку именно её эффективное время определяет возможности всего двухстадийного процесса. Для дальнейших расчётов  $T_{эфф}$  было принято равным 5394 часам.

#### 4.5.2. Подбор оборудования

Готовая продукция представляет собой высушенную биомассу с остаточной влажностью не более 5 %, следовательно, для выпуска 1000 т готового продукта в год требуется произвести 950 т абсолютно сухой биомассы по АСВ. На стадиях культивирования, сепарирования и сушки неизбежны потери, оцениваемые в 5 % от выхода. Таким образом, масса АСВ ( $M_{АСВ}$ ), которая должна быть произведена, составляет 1000 т/год.

Часовая производительность по АСВ биомассы ( $G_{общ}^{АСВ}$ ), необходимая для достижения данного показателя составит:

$$G_{общ}^{АСВ} = \frac{M_{АСВ}}{T_{эфф}} = \frac{1000000 \text{ кг}}{5394 \text{ ч}} = 185,4 \text{ кг/ч.}$$

Необходимый суммарный рабочий объём биореакторов на стадии наработки биомассы ( $V_{ф.ст1}^{раб}$ ) рассчитывается в соответствии с уравнением:

$$V_{ф.ст1}^{раб} = \frac{M_{АСВ}}{P_X \cdot T_{эфф}} = \frac{1000000 \text{ кг АСВ}}{0,429 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3 \cdot \text{ч}} \cdot 5394 \text{ ч}} = 432,2 \text{ м}^3.$$

С учётом возможных колебаний технологических параметров принимается суммарный рабочий объём 450 м<sup>3</sup>. Данный подход позволяет реализовать первую стадию двумя одновременно работающими ферментёрами рабочим объёмом по 225 м<sup>3</sup> (полный объём 280 м<sup>3</sup>). Таким образом, фактическая годовая производительность по АСВ биомассы при двух работающих ферментёрах с учётом потерь на стадиях выделения и сушки составит 1041 т/год, что превышает целевой показатель на 4,1 %, тем самым создавая необходимый резерв производственной мощности.

При расчётах учитывали, что культуральная жидкость из первой стадии непрерывно подаётся во вторую с сохранением заданной производительности.

Суммарный объёмный поток суспензии после первой и второй стадии ( $W^{\text{сусп}}$ ) одинаков и определяется первой стадией в соответствии с уравнением 30:

$$W_{\text{ст1}}^{\text{сусп}} = W_{\text{ст2}}^{\text{сусп}} = V_{\text{ф.ст1}}^{\text{раб}} \cdot D_1, \quad (30)$$

где  $V_{\text{ф.ст1}}^{\text{раб}}$  – суммарный рабочий объём первой стадии,  $\text{м}^3$ ;

$D_1$  – скорость разбавления на первой стадии,  $\text{ч}^{-1}$ .

Таким образом:

$$W_{\text{ст1}}^{\text{сусп}} = 450 \text{ м}^3 \cdot 0,10 \text{ ч}^{-1} = 45 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Тогда, суммарный рабочий объём второй стадии, компенсирующий более низкую скорость разбавления, должен составлять:

$$V_{\text{ф.ст2}}^{\text{раб}} = \frac{W_{\text{ст1}}^{\text{сусп}}}{D_2} = \frac{45 \text{ м}^3/\text{ч}}{0,04 \text{ ч}^{-1}} = 1125 \text{ м}^3.$$

Для унификации с первой стадией и упрощения обслуживания на второй стадии было принято решения использовать пять ферментёров рабочим объёмом  $225 \text{ м}^3$  каждый. Для обеспечения бесперебойной работы производства и возможности проведения ремонтов без остановки процесса предусматривается один резервный ферментёр того же типоразмера. Таким образом, общее количество биореакторов составляет 8 аппаратов: 7 рабочих (2 на первой стадии, 5 на второй) и 1 резервный.

Часовой расход среды ( $W^{\text{ср}}$ ) равен объёмному потоку суспензии и одинаков для обеих стадий:

$$W_{\text{ст1}}^{\text{ср}} = W_{\text{ст2}}^{\text{ср}} = W^{\text{сусп}} = 45 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Важно отметить, что расходы сред на различных стадиях необходимо учитывать отдельно ввиду их различного состава. Поэтому планируется установка двух станций приготовления среды с производительностью  $50 \text{ м}^3/\text{ч}$  каждая, а также двух емкостей по  $3250 \text{ м}^3$  с запасом среды. Подача среды в ферментёры суммарно осуществляется 4 дозировочными насосами производительностью  $12,5 \text{ м}^3/\text{ч}$

каждый для первой стадии, а также 5 насосами производительностью 10 м<sup>3</sup>/ч для стадии накопления ПГБ.

Таким образом, годовая потребность в питательной среде ( $W_{\text{год}}^{\text{cp}}$ ) одинакова для стадий и составляет:

$$W_{\text{ст1,год}}^{\text{cp}} = W_{\text{ст2,год}}^{\text{cp}} = 45 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 5394 \text{ ч} = 240730 \text{ м}^3/\text{год}.$$

Таким образом, с учётом корректировки рабочего объёма биореактора часовая производительность по АСВ составит:

$$G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}} = W_{\text{общ}}^{\text{cp}} \cdot X_{\text{АСВ}} = 45 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 4,29 \text{ кг}/\text{м}^3 = 193,05 \text{ кг}/\text{ч}.$$

Для культивирования метанотрофного сообщества МС7 используется метановоздушная смесь с объёмной долей метана 25 %. Удельный расход газовой смеси составляет 0,75 объёма газа (м<sup>3</sup>) на 1 м<sup>3</sup> рабочего объёма биореактора в минуту (в соответствии с разделом 3.10). Тогда часовой расход газовой смеси на первой стадии ( $W_{\text{ст1}}^{\text{г}}$ ):

$$W_{\text{ст1}}^{\text{г}} = \frac{0,75 V_{\text{ф.ст1}}^{\text{раб}}}{\text{мин}} = 337,5 \text{ м}^3/\text{мин} = 20250 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Расход метана при 25 % содержании в газовой смеси с учётом чистоты 96,75%:

$$W_{\text{ст1}}^{\text{CH}_4} = W_{\text{ст1}}^{\text{г}} \cdot \varphi_{\text{CH}_4} = 20250 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 0,25 \cdot 0,9675 = 4898 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Что соответствует массовому расходу метана ( $G_{\text{ст}}^{\text{CH}_4}$ ) при плотности ( $\rho_{\text{CH}_4}$ ) 0,717 кг/м<sup>3</sup>:

$$G_{\text{ст1}}^{\text{CH}_4} = W_{\text{ст1}}^{\text{CH}_4} \cdot \rho_{\text{CH}_4} = 4898 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 0,717 \text{ кг}/\text{м}^3 = 3511,8 \text{ кг}/\text{ч}.$$

Исходя из расходного коэффициента  $\alpha_{\text{хст1}}^{\text{CH}_4} = 1,43$  расход потребляемого метана равняется:

$$G_{\text{потр.ст1}}^{\text{CH}_4} = G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}} \cdot \alpha_{\text{хст1}}^{\text{CH}_4} = 193,05 \text{ кг}/\text{ч} \cdot 1,43 \frac{\text{кг CH}_4}{\text{кг АСВ}} = 276,1 \frac{\text{кг CH}_4}{\text{ч}}.$$

Соответственно, степень потребления метана ( $\eta_{\text{CH}_4}$ ) составляет 276,1/3511,8 = 0,08, что несколько ниже максимально возможных значений данного показателя для *M. trichosporium* (16,6%) и указывает на избыток подаваемого субстрата и

возможность дальнейшей оптимизации процесса за счёт снижения расхода газовой фазы и метана [349-350].

Расход воздуха  $W_{\text{ст1}}^{\text{возд}}$  рассчитывали как разность общего расхода метановоздушной смеси и метана:

$$W_{\text{общ}}^{\text{возд}} = W_{\text{ст1}}^{\text{г}} - W_{\text{ст1}}^{\text{CH}_4} = 20250 \text{ м}^3/\text{ч} - 4898 \text{ м}^3/\text{ч} = 15352 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Тогда массовый расход подаваемого кислорода  $G_{\text{ст1}}^{\text{O}_2}$  при его доле ( $\varphi_{\text{O}_2}$ ) 21% и плотности ( $\rho_{\text{O}_2}$ ) 1,29 кг/м<sup>3</sup> составит:

$$G_{\text{ст1}}^{\text{O}_2} = W_{\text{общ}}^{\text{возд}} \cdot \varphi_{\text{O}_2} \cdot \rho_{\text{O}_2} = 15352 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 0,21 \cdot 1,29 \text{ кг}/\text{м}^3 = 4158,9 \text{ кг}/\text{ч}.$$

Исходя из потребностей сообщества по поглощённому кислороду при  $\alpha_{\text{X}}^{\text{O}_2} \approx 3,759 \text{ кг}/\text{кг}$ , расход потребляемого кислорода  $G_{\text{потр}}^{\text{O}_2}$  составляет 733,2 кг/ч.

Полученное соотношение потреблённого кислорода к метану, в мольном соотношении равное 1,33/1, в соответствии с литературными данными указывает на оптимальные условия роста метанотрофной культуры на стадии накопления биомассы [291, 294].

Часовой расход газовой смеси на второй стадии ( $W_{\text{ст2}}^{\text{г}}$ ):

$$W_{\text{ст2}}^{\text{г}} = \frac{0,75V_{\text{ф.ст2}}^{\text{раб}}}{\text{мин}} = 843,8 \text{ м}^3/\text{мин} = 50625 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Расход метана при 25 % содержании в газовой смеси с учётом чистоты 96,75%:

$$W_{\text{ст2}}^{\text{CH}_4} = W_{\text{ст2}}^{\text{г}} \cdot \varphi_{\text{CH}_4} = 50625 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 0,25 \cdot 0,9675 = 12245 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Что соответствует массовому расходу метана ( $G_{\text{ст2}}^{\text{CH}_4}$ ) при плотности ( $\rho_{\text{CH}_4}$ ) 0,717 кг/м<sup>3</sup>:

$$G_{\text{ст2}}^{\text{CH}_4} = W_{\text{ст2}}^{\text{CH}_4} \cdot \rho_{\text{CH}_4} = 12245 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot 0,717 \text{ кг}/\text{м}^3 = 8780 \text{ кг}/\text{ч}.$$

Исходя из расходного коэффициента  $\alpha_{\text{Xст2}}^{\text{CH}_4} = 3,33 \frac{\text{кг CH}_4}{\text{кг АСВ}}$  расход потребляемого метана равняется:

$$G_{\text{потр.ст2}}^{\text{CH}_4} = G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}} \cdot \alpha_{\text{Xст2}}^{\text{CH}_4} = 193,05 \text{ кг}/\text{ч} \cdot 3,33 \frac{\text{кг CH}_4}{\text{кг АСВ}} = 642,9 \frac{\text{кг CH}_4}{\text{ч}}.$$

Соответственно, степень потребления метана ( $\eta_{CH_4}$ ) составляет  $642,9/8780 = 0,07$ , что также указывает на перерасход газовой фазы на этапе накопления ПГБ и обозначает возможность снижения затрат на производство биомассы метанотрофных микроорганизмов при оптимизации процесса.

Суммарный расход метана на проведение двухстадийного процесса ( $G_{общ}^{CH_4}$ ) равен сумме расходов на первую и вторую стадии процесса:

$$G_{общ}^{CH_4} = G_{ст1}^{CH_4} + G_{ст2}^{CH_4} = 3511,8 \text{ кг/ч} + 8780 \text{ кг/ч} = 12291,8 \text{ кг/ч}.$$

Расход воздуха  $W_{ст2}^{возд}$  рассчитывали аналогично первой стадии процесса:

$$W_{ст2}^{возд} = W_{ст2}^r - W_{ст2}^{CH_4} = 50625 \text{ м}^3/\text{ч} - 12245 \text{ м}^3/\text{ч} = 38380 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Подача компонентов газовой смеси на этапе наработки биомассы осуществляется винтовыми компрессорами производительностью  $1800 \text{ м}^3/\text{ч}$  для подачи метана (два компрессора) и  $8000 \text{ м}^3/\text{ч}$  для подачи воздуха (два компрессора). Смешение газов осуществляется двумя статическими смесителями производительностью  $10000 \text{ м}^3/\text{ч}$  каждый. Для этапа синтеза ПГБ требуется пять компрессоров для метана и воздуха, а также смесителей с аналогичными параметрами. Также предусмотрено наличие резервного компрессора для каждого из газовых потоков.

С учётом стехиометрических коэффициентов теплота жизнедеятельности ( $q_{ж}$ ) для первой и второй стадии процесса составит  $13,606 \cdot 10^3$  и  $38,353 \cdot 10^3$  ккал/кг АСВ, что соответствует тепловой нагрузке  $Q_{ж.ст1} = 3055$  кВт ( $1527,5$  кВт на один ферментёр) и  $Q_{ж.ст2} = 8611$  кВт ( $1722,2$  кВт) на один ферментёр.

Расход оборотной воды при перепаде температур  $\Delta t = 10$  °С для стадии наработки биомассы равняется:

$$G_{ст1}^{об.воды} = \frac{Q_{ж.ст1}}{c_b \cdot \rho_{H_2O} \cdot \Delta t} = 3600 \cdot \frac{3055 \text{ кВт}}{4,19 \left( \frac{\text{кДж}}{\text{кг} \cdot \text{К}} \right) \cdot 10 \cdot 1000 \text{ кг/м}^3} = 262,5 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Расход оборотной воды на каждый ферментёр составит на данном этапе составит  $131,25 \text{ м}^3/\text{ч}$ .

Аналогично для стадии накопления ПГБ:

$$G_{ст2}^{об.воды} = \frac{Q_{ж.ст2}}{c_b \cdot \rho_{H_2O} \cdot \Delta t} = 3600 \cdot \frac{8611 \text{ кВт}}{4,19 \left( \frac{\text{кДж}}{\text{кг} \cdot \text{К}} \right) \cdot 10 \cdot 1000 \text{ кг/м}^3} = 739,9 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Расход оборотной воды на каждый ферментёр составит на данном этапе составит 147,98 м<sup>3</sup>/ч.

С учётом идентичности строения реакторов, а также сходной удельной тепловой нагрузкой на каждый реактор планируется установка кожухотрубного теплообменника с поверхностью теплопередачи 200–250 м<sup>2</sup> каждый, что в сумме даёт 8 теплообменников (с учётом резервного реактора). Для охлаждения оборотной воды выбрано восемь вентиляторных градирен производительностью по 150 м<sup>3</sup>/ч каждая. Для обеспечения непрерывности подачи оборотной воды взято восемь центробежных насосов производительностью по 150 м<sup>3</sup>/ч.

Со стадии культивирования поступает суспензия со средней концентрацией биомассы по АСВ 4,29 кг/м<sup>3</sup>, что при объёмном потоке  $W^{\text{сусп}}$ , равном 45,0 м<sup>3</sup>/ч, обеспечивает массовый поток  $G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}}$ , равный 193,05 кг/ч:

Объёмный поток сгущённой биомассы после сепарирования до пасты с долей АСВ 20% составит:

$$W_{\text{сеп}}^{\text{сгуш.б}} = \frac{G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}}}{C_{\text{сеп}}^{\text{сгуш.б}}} = \frac{193,05 \text{ кг/ч}}{200 \text{ кг/м}^3} = 0,965 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Сгущение до концентрации 200 кг/м<sup>3</sup> осуществляется тарельчатым сепаратором-сгустителем. Требуемая производительность по суспензии составляет не менее 50,0 м<sup>3</sup>/ч.

При равенстве  $W_{\text{сеп}}^{\text{сгуш.б}}$  и  $G_{\text{сеп}}^{\text{пром.б}}$  для проведения оценочного расчёта сгущённая паста поступает на сушку при часовом потоке  $G_{\text{сеп}}^{\text{пром.б}} = 965$  кг/ч. Количество влаги, подлежащей удалению, определяется из условия получения готового продукта с влажностью не более 5 %. При начальной влажности суспензии 80 % (массовая доля сухих веществ 20 %) масса влаги в промытой сгущённой суспензии:

$$G_{\text{сеп}}^{\text{H}_2\text{O}} = G_{\text{сеп}}^{\text{пром.б}} \cdot (1 - 0,20) = 965 \text{ кг/ч} \cdot 0,80 = 772 \text{ кг/ч}.$$

В готовом продукте при влажности не более 5% масса влаги ( $G_{\text{продукт}}^{\text{H}_2\text{O}}$ ) составит:

$$G_{\text{продукт}}^{\text{H}_2\text{O}} = \frac{G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}}}{0,95} - G_{\text{общ}}^{\text{АСВ}} = \frac{193,05 \text{ кг/ч}}{0,95} - 193,05 \text{ кг/ч} = 10,16 \text{ кг/ч}.$$

Соответственно, количество испаряемой влаги на стадии сушки равняется:

$$G_{\text{исп}}^{H_2O} = G_{\text{сеп}}^{H_2O} - G_{\text{продукт}}^{H_2O} = 772 \text{ кг/ч} - 10,16 \text{ кг/ч} = 761,84 \text{ кг/ч}.$$

Выбор лиофильной сушки производительностью 800 кг/ч по испарённой влаге обусловлен необходимостью сохранения нативной структуры полигидроксibuтирата, который может разрушаться при высоких температурах, характерных для распылительной сушки, а также необходимостью получения биомассы с наименьшей влажностью.

Таким образом, был проведён оценочный подбор основного оборудования, позволяющего вести процесс получения наработки биомассы синтетического сообщества МС7 (таблица 33).

Таблица 33 – Основное оборудование

Наименование	Характеристика	Количество
Ферментёр	Рабочий объём 225 м <sup>3</sup> , полный объём 280 м <sup>3</sup> , нержавеющая сталь, с рубашкой охлаждения, датчиками рН, рО <sub>2</sub> , температуры, системой стерилизации (для первой стадии)	8
Инокулятор	Объём 25 м <sup>3</sup> ; нержавеющая сталь, с рубашкой, мешалкой и системой стерилизации	1
Станция приготовления питательной среды	Производительность до 50 м <sup>3</sup> /ч	2
Ёмкость запаса среды	3250 м <sup>3</sup> , нержавеющая сталь	2
Дозировочный насос	12,5 м <sup>3</sup> /ч, напор 0,4–0,6 МПа, с частотным регулированием	4
Дозировочный насос	10 м <sup>3</sup> /ч, напор 0,4–0,6 МПа, с частотным регулированием	10
Компрессор винтовой для метана	1800 м <sup>3</sup> /ч, давление 0,3–0,5 МПа, взрывозащищённое исполнение	8
Компрессор воздушный винтовой	8000 м <sup>3</sup> /ч, давление 0,3–0,5 МПа	8
Смеситель газовый статический	5000 м <sup>3</sup> /ч, нержавеющая сталь	2
Теплообменник кожухотрубный	Площадь 200–250 м <sup>2</sup> , нержавеющая сталь	8
Градирия вентиляторная	150 м <sup>3</sup> /ч по охлаждаемой воде	8
Насос циркуляционный	150 м <sup>3</sup> /ч, напор 0,3–0,4 МПа	8
Сепаратор-сгуститель тарельчатый	50 м <sup>3</sup> /ч по суспензии	1
Лиофильная сушилка	800 кг/ч по испарённой влаге	1
Система пневмотранспорта и упаковки	Комплекс фасовки в мешки по 25 кг	1

### 4.5.3. Расчёт капитальных затрат и амортизации

Аналогично разделу 4.3.3 проводили расчёт капитальных вложений, необходимых для создания производства мощностью 1000 т/год высушенной биомассы синтетического сообщества МС7 по АСВ с оценкой соответствующих капитальных затрат и амортизации. В таблице 34 приведена оценка стоимости оборудования.

Таблица 34 – Стоимость основного технологического оборудования при культивировании синтетического сообщества МС5

Наименование	Количество	Цена за ед., млн руб.	Общая стоимость, млн руб.
Ферментёр	8	270	2160
Инокулятор	1	18	18
Станция приготовления концентрата	2	45	90
Ёмкость запаса среды	2	32	64
Насос-дозатор	4	0,9	3,6
Насос-дозатор	10	0,8	8,0
Компрессор винтовой для метана	8	14	112
Компрессор воздушный винтовой	8	18,5	148
Смеситель газовый статический	2	2,5	5,0
Теплообменник кожухотрубный	8	4,5	36
Градирня вентиляторная	8	10	80
Насос циркуляционный	8	0,6	4,8
Сепаратор-сгуститель тарельчатый	1	36	36
Сушилка лиофильная	1	58	58
Система пневмотранспорта и упаковки	1	28	28
Внутрицеховые коммуникации, КИП, арматура			285,14
<b>ИТОГО стоимость оборудования</b>			<b>3136,54</b>

В таблицах 35-36 представлены расчёты прямых капитальных затрат, капитальных вложений, а также расчёт годовой амортизации (таблица 37), что использовали в дальнейшем для расчёта себестоимости нарабатываемой биомассы и полигидроксibuтирата в её составе.

Таблица 35 – Расчёт прямых капитальных затрат

Показатель	Расчёт	Сумма, млн руб.
Стоимость оборудования	Таблица 34	3136,54
Транспортные расходы и монтаж	15% от стоимости оборудования	470,48
Строительно-монтажные работы	40% от стоимости оборудования	1254,62
<b>Итого прямые затраты</b>		<b>4861,64</b>

Таблица 36 – Расчёт капитальных вложений

Показатель	Расчёт	Сумма, млн руб.
Прямые затраты	Таблица 35	4861,64
Проектные работы	5% от прямых затрат	243,08
Пусконаладочные работы	3% от прямых затрат	145,85
Непредвиденные расходы	7% от прямых затрат	340,31
<b>Итого капитальные вложения</b>		<b>5590,88</b>

Таблица 37 – Расчёт годовой амортизации

Показатель	Стоимость, млн. руб.	Норма амортизации, %	Годовая амортизация, млн руб.
Здания и сооружения	1254,62	3,0	37,64
Оборудование и прочее	3136,54	10,0	313,65
<b>Итого</b>	<b>4391,16</b>	–	<b>321,29</b>

#### 4.5.4. Расчёт стоимости сырья и основных материалов

Определение годовой потребности в компонентах питательной среды, метане и воде проводили аналогично разделу 4.3.4. с учётом различного расхода компонентов на первой и второй стадии культивирования (таблица 38).

Таблица 38 – Стоимость компонентов питательной среды процесса получения биомассы с высоким содержанием ПГБ метанотрофным сообществом МС7

Компонент	Расход компонента (1 стадия), кг/м <sup>3</sup>	Расход компонента (2 стадия), кг/м <sup>3</sup>	Стоимость 1 кг компонента, руб	Годовая потребность, т/г	Стоимость компонента, за год, млн руб
Калий азотнокислый	1,59	0,045	45	397,0	17,87

Продолжение таблицы 38

Компонент	Расход компонента (1 стадия), кг/м <sup>3</sup>	Расход компонента (2 стадия), кг/м <sup>3</sup>	Стоимость 1 кг компонента, руб	Годовая потребность, т/Г	Стоимость компонента, за год, млн руб
Аммоний хлористый	0,21	0	55	50,97	2,8
Магний сернокислый 7-водн.	0,18	0,099	22	67,73	1,49
Кальций хлористый 2-водн.	0,03	0,012	18	10,19	0,183
Калий фосфорнокислый 1-зам.	1,365	0,455	80	441,8	35,34
Натрий фосфорнокислый 2-зам. 12-водн.	0,702	0,24	35	227,2	7,95
Трилон Б	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$0,5 \cdot 10^{-3}$	165	0,486	0,080
Медь хлористая 5-водн.	$1,68 \cdot 10^{-3}$	$2,45 \cdot 10^{-3}$	420	1,002	0,421
Железо сернокислое 7-водн.	$10,44 \cdot 10^{-3}$	$3,48 \cdot 10^{-3}$	75	3,38	0,254
Борная кислота	$0,09 \cdot 10^{-3}$	$0,03 \cdot 10^{-3}$	110	0,029	0,003
Цинк сернокислый 7-водн.	$0,03 \cdot 10^{-3}$	$0,01 \cdot 10^{-3}$	140	0,010	0,002
Кобальт хлористый 6-водн.	$0,06 \cdot 10^{-3}$	$0,02 \cdot 10^{-3}$	750	0,019	0,015
Марганец хлористый 4-водн.	$9 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	185	0,003	0,001
Никель хлористый 6-водн.	$6 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	600	0,002	0,001
Натрий молибденовокислый	$9 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	520	0,003	0,002
Метанол	0,395	0,395	35	289,6	10,14
<b>Итого</b>					<b>76,36</b>

Как следует из данных таблицы 39, основную долю в структуре затрат на сырьё и материалы для двухстадийного процесса культивирования сообщества МС7 составляет метан (более 90 %). При этом, как показано в разделе 3.10, степень потребления метана на второй стадии (накопление полигидроксипутирата) не превышает 7 %, что указывает на значительный резерв для оптимизации. Снижение удельного расхода газа на данном этапе за счёт интенсификации массообмена или

корректировки режимов подачи позволит существенно уменьшить общие затраты на сырьё.

Таблица 39 – Структура затрат на сырьё и материалы

Статья затрат	Годовая стоимость, млн. руб	Доля, %
Питательная среда	76,36	8,8
Метан	785,94	90,4
Вода	7,28	0,8
<b>Итого</b>	<b>869,58</b>	<b>100</b>

#### 4.5.5. Расчёт количества и стоимости энергоресурсов

Определение годовых затрат на энергоресурсы проводили в соответствии с разделом 4.3.5 работы с учётом отсутствия стадии биомассы при наработке биомассы сообщества МС7. Таким образом, Тепловая энергия учтена только для отопления производственных помещений. Также учитывали затраты электроэнергии на вспомогательное оборудование, принятые в размере 10 % от суммы прямых затрат основного оборудования. Итоговый расчёт приведён в таблице 40.

Таблица 40 – Структура затрат на энергоресурсы

Статья затрат	Годовая стоимость, млн. руб	Доля, %
Электроэнергия	168,0	92,5
Тепловая энергия	10,4	5,7
Вода на подпитку системы охлаждения	3,2	1,8
<b>Итого</b>	<b>181,6</b>	<b>100</b>

#### 4.5.6. Расчет затрат на оплату труда персонала

Для основных производственных рабочих, занятых на непрерывном процессе, принят 4-бригадный график с 12-часовыми сменами (таблица 41).

Таблица 41 – Баланс рабочего времени одного среднесписочного рабочего

Показатель	Значение
Календарный фонд, дни	365
Количество рабочих смен в году	183
Номинальный фонд рабочего времени, ч	2190
Планируемые невыходы, всего, ч	256
в том числе:	
- очередные и дополнительные отпуска, ч	168
- болезни и прочее, ч	88
Эффективный (полезный) фонд рабочего времени, ч	1934

Для вспомогательного персонала и административно-управленческих работников принят 5-дневный график с 8-часовым рабочим днём с эффективным фондом рабочего времени 1725 ч/г.

Годовой фонд оплаты труда представлен в таблице 42.

Таблица 42 – Годовой фонд оплаты труда

Категория персонала	Штатная численность, чел.	Среднемесячная зарплата, тыс. руб.	Годовой ФОТ, млн руб.
Основные производственные рабочие	12	120	17,28
Вспомогательный персонал	8	95	9,12
Административно-управленческие работники и специалисты	6	150	10,80
Страховые взносы			11,16
<b>ИТОГО</b>			<b>48,36</b>

#### 4.5.7. Расчёт себестоимости готовой продукции

В результате проведённых расчётов были получены значения прямых затрат на фактический выпуск продукта (1065 тонн по АСВ), что позволило оценить полную себестоимость фактического выпуска продукта (таблица 43). Расчёт выполнен на основании данных о затратах на сырьё, энергоресурсы, оплату труда и амортизацию, определённых в разделах 4.5.3-4.5.6.

Таблица 43. Себестоимость производства биомассы сообщества МС7

Статья затрат	Сумма, млн руб.
Сырьё и основные материалы	869,58
Энергоресурсы	181,6
Оплата труда с отчислениями	48,36
Амортизация	321,29
<b>Итого прямые затраты</b>	<b>1420,83</b>
Общепроизводственные расходы (12% от прямых затрат)	170,50
<b>Итого цеховая себестоимость</b>	<b>1591,33</b>
Общехозяйственные расходы (8% от цеховой себестоимости)	127,31
<b>Итого производственная себестоимость</b>	<b>1718,64</b>
Коммерческие расходы (3% от производственной себестоимости)	51,56
<b>Итого полная себестоимость фактического выпуска</b>	<b>1770,20</b>

Таким образом, себестоимость производства 1 тонны сухой биомассы при фактическом выпуске (по уравнению 29) составляет:

$$C_{\text{факт}} = \frac{1770,2 \text{ млн руб}}{1041 \text{ т} / 0,95} = 1615 \text{ тыс. руб/т}$$

С учётом корректировки до планового количества было установлено, что себестоимость 1 тонны готового продукта при плановом выпуске составит тыс. руб./т, что соответствует 1630 руб/кг продукта сухой биомассы синтетического сообщества МС7, что с учётом установленной доли ПГБ в продукте соответствует 4503 руб/кг ПГБ.

Анализ литературных данных не обнаружил расчётов по себестоимости производства биомассы *M. trichosporium* или ПГБ, содержащегося в нём, в условиях атмосферного давления. Установлено, что в ряде работ с данным метанотрофом применяли двухстадийный подход, аналогичный приведённому в работе, но при этом использовали значительное избыточное давление в биореакторе, что позволило достигать концентрации биомассы на первой стадии (25 – 65 г/л при  $D=0,17 \text{ ч}^{-1}$ , 30 г/л при  $D=0,085 \text{ ч}^{-1}$ ), недостижимой при нормальных условия ввиду ограничений массообмена [351-353]. Сообщается, что при

использовании метанотрофных микроорганизмов себестоимость килограмма ПГБ в подобных процессах с учётом двухстадийной схемы организации имеет широкий ценовой разброс в диапазоне от 150 до 800 руб, что значительно ниже рассчитанных значений для синтетического сообщества МС7 и не может быть в достаточной мере снижено масштабированием производства. Важно отметить, что представленная себестоимость рассчитана исключительно на основе реальных экспериментальных данных, полученных в ходе лабораторных исследований. Эти значения являются объективным отражением текущего уровня развития технологии и служат основой для проектирования пилотных установок. В данных, далёких от оптимума промышленных условий, разработанное сообщество МС7 продемонстрировало более высокую продуктивность по сравнению с известными литературными аналогами для смешанных культур на основе *Methylosinus trichosporium* (сравнительный анализ в разделе 3.12). Следовательно, представленная себестоимость является не окончательной характеристикой технологии, а эталонным значением для пилотного масштаба, поскольку её дальнейшее снижение до конкурентоспособного уровня лежит в области инженерной реализации потенциала, заложенного в разработанном синтетическом сообществе, и требует перехода к культивированию при повышенном давлении.

Таким образом, в диссертационной работе разработаны научно-методические основы конструирования стабильных синтетических метанотрофных сообществ с заданными свойствами и доказана эффективность их применения для получения высокобелковой биомассы и полигидроксибутирата, что основано на первичных технико-экономических показателях в сравнении с аналогами в сходных условиях культивирования. Обозначен потенциал повышения продуктивности при использовании синтетических метанотрофных сообществ, что напрямую влияет на себестоимость производимой биомассы и, как следствие, продуктов, получаемых в ходе её глубокой переработки. Изложенные в данной работе подходы к созданию синтетических сообществ, оптимизации сред и условиям культивирования могут служить базой для разработки промышленных процессов переработки метана в продукты с добавленной стоимостью.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе реализован комплексный подход к управляемому культивированию метаноокисляющих сообществ, включающий этапы от выделения природных консорциумов до технико-экономического обоснования промышленного масштабирования. Актуальность работы обусловлена необходимостью повышения эффективности биоконверсии метана в такие продукты с высокой добавленной стоимостью, как белок и полигидроксibuтират.

На первом этапе из природных источников было получено пять накопительных культур, обладающих стабильной и высокой для метанотрофных сообществ удельной скоростью роста (до  $0,20 \text{ ч}^{-1}$ ). Из этих сообществ было выделено чистых культур, включающих 5 изолятов метаноокисляющих бактерий (родов *Methylomonas*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylococcus*) и 24 изолята неметанотрофных микроорганизмов, среди которых идентифицированы ключевые спутники, типичные для природных метанотрофных консорциумов (родов *Brevibacillus*, *Ralstonia*, *Cupriavidus* и *Methylobacterium*). Результаты определения базовых ростовых характеристик выделенных метанотрофов (оптимумы pH, температуры, предпочтительный источник азота) использовали для последующего конструирования сообществ и подбора условий культивирования. Ключевым результатом этапа стало выделение и идентификация нового перспективного штамма *Methylococcus capsulatus* KS-24, который депонирован в Коллекции UNIQEM под регистрационным номером UQM 42109.

Следующим этапом работы стала оценка влияния неметанотрофных спутников на продуктивность метанотрофов. В ходе скрининга бинарных ассоциаций было установлено, что бактерии родов *Brevibacillus*, *Ralstonia*, *Cupriavidus* и *Azospirillum* способны значительно стимулировать рост метаноокисляющих микроорганизмов. На основе этих данных было сконструировано семь стабильных трёхкомпонентных сообществ, продемонстрировавших положительный синергический эффект. Итогом данного раздела стал отбор двух наиболее продуктивных ассоциаций: MC5 (*Methylococcus*

sp. с *Brevibacillus* sp. и *Ralstonia* sp.) и МС7 (*Methylosinus trichosporium* с *Ralstonia* sp. и *Cupriavidus* sp.), превосходящие на 17% по максимальной удельной скорости роста, а также на 13% по концентрации биомассы исходные сообщества (в случае МС5). Также наблюдали превосходство сконструированных сообществ по удельной скорости роста на 22-25 % и по накоплению биомассы на 13-20 % относительно чистых культур.

Дальнейшая оптимизация состава питательных сред и газовой фазы с использованием методов однофакторного и двухфакторного плана эксперимента позволила значительно повысить эффективность культивирования. Для сообщества МС5, ориентированного на получение высокобелковой биомассы, оптимизация состава среды (концентрации  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , соотношение минеральных источников азота, соотношения азота к углероду, а также доля  $\text{CH}_4$  в метановоздушной смеси) позволила увеличить максимальную удельную скорость роста до  $0,32 \text{ ч}^{-1}$ , а также достичь содержания сырого протеина 76,5 % от АСВ. Для сообщества МС7, ориентированного на синтез ПГБ, схожая оптимизация привела к накоплению целевого биополимера до 39,7 % от АСВ и удельной скорости роста сообщества  $0,20 \text{ ч}^{-1}$  (на среде для наработки биомассы) и  $0,07 \text{ ч}^{-1}$  (на среде для накопления ПГБ).

Испытания в непрерывном хеостатном режиме в течение длительного времени (до 21 суток) подтвердили высокую стабильность и продуктивность разработанных сообществ. Экспериментально доказана принципиальная возможность длительного стабильного функционирования созданных сообществ в нестерильных условиях и на техническом метане. Для МС5 в оптимальном режиме продуктивность по биомассе составила  $2,61 \pm 0,31 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{ч})$  при содержании белка 72,1 %, что лишь незначительно уступает стерильным условиям, но позволяет существенно снизить эксплуатационные затраты. Для сообщества МС7 подтверждена эффективность двухстадийного подхода. На среде, оптимизированной для накопления биомассы, в стерильных условиях на техническом метане достигнута продуктивность  $0,429 \pm 0,056 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{ч})$  при концентрации АСВ  $4,29 \pm 0,56 \text{ г/л}$ . При переходе на среду, индуцирующую синтез

ПГБ, в нестерильных условиях содержание полимера в биомассе достигало  $38,13 \pm 1,41$  % при продуктивности по ПГБ  $0,029 \pm 0,006$  кг/(м<sup>3</sup>·ч). Метагеномный анализ культивируемых сообществ показал, что доля микроорганизмов, образующих исходную синтетическую ассоциацию, в нестерильных процессах сохраняется на уровне не менее 70 %, что свидетельствует о высокой устойчивости системы.

Впервые выявлена способность метанотрофов (*M. capsulatus* и *M. trichosporium* и сообществ на их основе) к внеклеточному биосинтезу наночастиц серебра, особенно в условиях фотоиндукции. Полученные наночастицы размером 5-20 нм обладают антимикробной активностью в отношении грамотрицательных патогенов (МИК 25-75 мг/л). Интенсивность синтеза коррелирует с метаболической активностью клеток, что позволяет рассматривать этот процесс как дополнительный индикатор физиологического состояния культур.

Разработанные технологические схемы и результаты технико-экономического анализа подтверждают практическую значимость работы. Для сообщества МС5 себестоимость 1 кг сухой высокобелковой биомассы при годовом выпуске 10 000 т составляет 194,4 руб., что на 10,5 % ниже, чем у известного аналога. Для сообщества МС7 при пилотном масштабе (1000 т/год) себестоимость сухой биомассы оценивается в 1630 руб./кг, а ПГБ – в 4503 руб./кг. Показаны пути дальнейшего снижения себестоимости за счёт интенсификации массообмена, применения избыточного давления и оптимизации газовой фазы.

Таким образом, в диссертации разработаны научно-методические основы целенаправленного конструирования стабильных синтетических метанотрофных сообществ с заданными свойствами и доказана их эффективность для получения высокобелковой биомассы и полигидроксibuтирата. 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 метансодержащего сырья.

## ВЫВОДЫ

1. Из природных источников получено пять быстрорастущих накопительных метанотрофных сообществ с удельной скоростью роста 0,13-0,20 ч<sup>-1</sup>. 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  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , соотношение  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , C/N и доля  $\text{CH}_4$  в газовой смеси, обеспечивающие: для сообщества MC5 (продуцент белка): содержание сырого протеина 76,5 % от АСВ и удельную скорость роста 0,32 ч<sup>-1</sup>; для сообщества MC7 (продуцент ПГБ) в зависимости от состава ростовой среды содержание полигидроксибутирата до 39,7 % от АСВ, а также удельную скорость роста 0,20 ч<sup>-1</sup>.

4. При культивировании в непрерывном режиме для MC5 в стерильных условиях на чистом метане достигнута продуктивность по биомассе  $2,72 \pm 0,32$  кг/(м<sup>3</sup>·ч) при концентрации АСВ  $10,06 \pm 1,18$  г/л и содержании белка  $73,7 \pm 1,59$  %. В нестерильных условиях на техническом метане продуктивность сохраняется на уровне  $2,61 \pm 0,31$  кг/(м<sup>3</sup>·ч) при содержании белка  $72,09 \pm 1,55$  %, что подтверждает принципиальную возможность ведения процесса без строгой асептики. Для сообщества MC7 на среде, оптимизированной для роста, в стерильных условиях на техническом метане

продуктивность по биомассе составляет  $0,429 \pm 0,056$  кг/(м<sup>3</sup>·ч) при концентрации АСВ  $4,29 \pm 0,56$  г/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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АСВ – абсолютно сухой вес
- АТФ – аденозинтрифосфат
- ДРС – динамическое рассеяние света
- КИП – контрольно-измерительные приборы
- М1-М9 – обозначения выделенных и коллекционных штаммов метанотрофов
- МБК – минимальная бактерицидная концентрация
- МДГ – метанолдегидрогеназа
- Met1-Met4 – обозначения выделенных метилотрофных изолятов
- МИК – минимальная ингибирующая концентрация
- МИК<sub>50</sub> – концентрация, ингибирующая рост 50 % популяции
- ММО – метанмонооксигеназа
- МОБ – метанооксиляющие бактерии
- МС5, МС7 – синтетические метанотрофные сообщества
- Н1-Н20 – обозначения выделенных неметанотрофных гетеротрофных изолятов
- НАД (НАДН) – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)
- НЧ – наночастицы
- ОП<sub>600</sub> – оптическая плотность суспензии при длине волны 600 нм
- ОФС – общая фармакопейная статья
- ПГА – полигидроксиалканоаты
- ПГБ – поли-3-гидроксибутират
- ПНР – пусконаладочные работы
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота (16S – субъединица с коэффициентом седиментации единиц Сведберга)
- СМР – строительно-монтажные работы
- СОБ – серооксиляющие бактерии
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
- ФОТ – фонд оплаты труда

ЦКП – центральный композиционный план

ЭПС – экзополисахариды

AMS, NMS, M2, dAMS, dNMS – минеральные среды для культивирования метанотрофных микроорганизмов

LB – среда Лурия–Бертани (Luria–Bertani medium)

MxaFI – кальцийзависимая метанолдегидрогеназа

OTU – операционная таксономическая единица (operational taxonomic unit)

PacBio – платформа для высокопроизводительного секвенирования (Pacific Biosciences)

pMMO (particulate MMO) – нерастворимая (мембраносвязанная) метанмонооксигеназа

PQQ-МДГ – пирролохинолинхинон-зависимая метанолдегидрогеназа

$pO_2$  – парциальное давление растворённого кислорода

RuMP – рибулозомонофосфатный путь ассимиляции метана

R2A – среда для культивирования гетеротрофных микроорганизмов

SCP (Single Cell Protein) – белок одноклеточных организмов

sp. – родовая принадлежность организма (spp. - во множественном числе)

sMMO (soluble MMO) – растворимая метанмонооксигеназа

UNIQEM – Коллекция уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных физиологических групп биотехнологического назначения

XoxF – лантаноидзависимая метанолдегидрогеназа

$CH_4$  – метан

$CO_2$  – углекислый газ

$O_2$  – кислород

$N_2$  – молекулярный азот

$H_2S$  – сероводород

$NH_4^+$  – ион аммония

$NO_3^-$  – ион нитрата

$Cu^{2+}$  – ион меди (II)

$Fe^{2+}$  – ион железа (II)

$Mg^{2+}$  – ион магния

$Ca^{2+}$  – ион кальция

$Na_2$ ЭДТА – динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (трилон Б)

C/N (C:N) – соотношение углерода к азоту (моль/моль)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Ghashghavi M., Jetten M. S. M., Lüke C. Survey of methanotrophic diversity in various ecosystems by degenerate methane monooxygenase gene primers //Amb Express. – 2017. – Т. 7. – С. 1-11.
2. Eltayb W. A. et al. Exploring particulate methane monooxygenase (pMMO) proteins using experimentation and computational molecular docking //Journal of King Saud University-Science. – 2023. – Т. 35. – №. 4. – С. 102634.
3. Dedysh S. N., Knief C. Diversity and phylogeny of described aerobic methanotrophs //Methane biocatalysis: paving the way to sustainability. – Cham : Springer International Publishing, 2018. – С. 17-42.
4. Guerrero-Cruz S. et al. Methanotrophs: discoveries, environmental relevance, and a perspective on current and future applications //Frontiers in microbiology. – 2021. – Т. 12. – С. 678057.
5. Strong P. J., Xie S., Clarke W. P. Methane as a resource: can the methanotrophs add value? //Environmental science & technology. – 2015. – Т. 49. – №. 7. – С. 4001-4018.
6. Sahoo K. K., Goswami G., Das D. Biotransformation of methane and carbon dioxide into high-value products by methanotrophs: current state of art and future prospects //Frontiers in microbiology. – 2021. – Т. 12. – С. 636486.
7. Karthikeyan O. P. et al. Metal (loid) speciation and transformation by aerobic methanotrophs //Microbiome. – 2021. – Т. 9. – С. 1-18.
8. Dedysh S. N., Dunfield P. F. Facultative and obligate methanotrophs: how to identify and differentiate them //Methods in enzymology. – Academic Press, 2011. – Т. 495. – С. 31-44.
9. Kim I. T. et al. An experimental study on the biological fixation and effective use of carbon using biogas and bacterial community dominated by methanotrophs, methanol-oxidizing bacteria, and ammonia-oxidizing bacteria //Catalysts. – 2021. – Т. 11. – №. 11. – С. 1342.

10. Hoefman S. et al. Customized media based on miniaturized screening improve growth rate and cell yield of methane-oxidizing bacteria of the genus *Methylobacter* //Antonie Van Leeuwenhoek. – 2014. – T. 105. – C. 353-366.
11. Hamer G. Methanotrophy: from the environment to industry and back //Chemical Engineering Journal. – 2010. – T. 160. – №. 2. – C. 391-397.
12. Gęsicka A. et al. Enrichment of mixed methanotrophic cultures producing polyhydroxyalkanoates (PHAs) from various environmental sources //Science of The Total Environment. – 2024. – T. 912. – C. 168844.
13. Stock M. et al. Exploration and prediction of interactions between methanotrophs and heterotrophs //Research in microbiology. – 2013. – T. 164. – №. 10. – C. 1045-1054.
14. Esembaeva M. A. et al. A Study of the community relationships between methanotrophs and their satellites using constraint-based modeling approach //International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – T. 25. – №. 22. – C. 12469.
15. Schnyder E. et al. Positive diversity-functioning relationships in model communities of methanotrophic bacteria //Ecology. – 2018. – T. 99. – №. 3. – C. 714-723.
16. Ritala A. et al. Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016 //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 2009.
17. Nyssölä A. et al. The role of single cell protein in cellular agriculture //Current Opinion in Biotechnology. – 2022. – T. 75. – C. 102686.
18. Amaro T. et al. Prospects for the use of whey for polyhydroxyalkanoate (PHA) production //Frontiers in Microbiology. – 2019. – T. 10. – C. 992.
19. Webster K. D. et al. Diversity and composition of methanotroph communities in caves //Microbiology spectrum. – 2022. – T. 10. – №. 4. – C. e01566-21.
20. Roldán D. M. et al. Diversity and effect of increasing temperature on the activity of methanotrophs in sediments of fildes Peninsula freshwater lakes, King George Island, Antarctica //Frontiers in Microbiology. – 2022. – T. 13. – C. 822552.
21. Yu Z. et al. A synthetic ecology perspective: how well does behavior of model organisms in the laboratory predict microbial activities in natural habitats? //Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 7. – C. 946.

22. Yu Z. et al. Synthetic methane-consuming communities from a natural lake sediment //MBio. – 2019. – T. 10. – №. 4. – C. 10.1128/mbio.01072-19.
23. Chowdhury T. R., Dick R. P. Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands //Applied soil ecology. – 2013. – T. 65. – C. 8-22.
24. Knief C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker //Frontiers in microbiology. – 2015. – T. 6. – C. 1346.
25. Schmider T. et al. Physiological basis for atmospheric methane oxidation and methanotrophic growth on air //Nature Communications. – 2024. – T. 15. – №. 1. – C. 4151.
26. Tiwari S., Singh J. S., Singh D. P. Methanotrophs and CH<sub>4</sub> sink: effect of human activity and ecological perturbations //Climate Change and Environmental Sustainability. – 2015. – T. 3. – №. 1. – C. 35-50.
27. Kaupper T. et al. The methane-driven interaction network in terrestrial methane hotspots //Environmental Microbiome. – 2022. – T. 17. – №. 1. – C. 15.
28. van Grinsven S. et al. Redox zone and trophic state as drivers of methane-oxidizing bacterial abundance and community structure in lake sediments //Frontiers in Environmental Science. – 2022. – T. 10. – C. 857358.
29. Ho A. et al. Biotic interactions in microbial communities as modulators of biogeochemical processes: methanotrophy as a model system //Frontiers in Microbiology. – 2016. – T. 7. – C. 1285.
30. van Grinsven S. et al. Nitrate promotes the transfer of methane-derived carbon from the methanotroph *Methylobacter* sp. to the methylotroph *Methylotenera* sp. in eutrophic lake water //Limnology and Oceanography. – 2021. – T. 66. – №. 3. – C. 878-891.
31. Costa R. B., Lens P. N. L., Foresti E. Methanotrophic denitrification in wastewater treatment: microbial aspects and engineering strategies //Critical reviews in biotechnology. – 2022. – T. 42. – №. 1. – C. 145-161.
32. Kalyuzhnaya M. G. et al. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium //Nature communications. – 2013. – T. 4. – №. 1. – C. 2785.

33. Lee H. J. et al. High resolution depth distribution of Bacteria, Archaea, methanotrophs, and methanogens in the bulk and rhizosphere soils of a flooded rice paddy //Frontiers in microbiology. – 2015. – T. 6. – C. 639.
34. Vile M. A. et al. N<sub>2</sub>-fixation by methanotrophs sustains carbon and nitrogen accumulation in pristine peatlands //Biogeochemistry. – 2014. – T. 121. – C. 317-328.
35. Jeong S. Y., Cho K. S., Kim T. G. Density-dependent enhancement of methane oxidation activity and growth of *Methylocystis* sp. by a non-methanotrophic bacterium *Sphingopyxis* sp //Biotechnology Reports. – 2014. – T. 4. – C. 128-133.
36. Ruiz-Ruiz P. et al. Methanotroph-microalgae co-culture for greenhouse gas mitigation: effect of initial biomass ratio and methane concentration //Chemosphere. – 2020. – T. 259. – C. 127418.
37. Kirschke S. et al. Three decades of global methane s Kirschke S. et al. Three decades of global methane sources and sinks //Nature geoscience. – 2013. – T. 6. – №. 10. – C. 813-823.
38. Höglund-Isaksson L. Global anthropogenic methane emissions 2005–2030: technical mitigation potentials and costs //Atmospheric Chemistry and Physics. – 2012. – T. 12. – №. 19. – C. 9079-9096.
39. Gęsicka A., Oleskowicz-Popiel P., Łężyk M. Recent trends in methane to bioproduct conversion by methanotrophs //Biotechnology advances. – 2021. – T. 53. – C. 107861.
40. Kalyuzhnaya M. G. Methane biocatalysis: selecting the right microbe //Biotechnology for biofuel production and optimization. – Elsevier, 2016. – C. 353-383.
41. Stępniewska Z. et al. Enrichment culture and identification of endophytic methanotrophs isolated from peatland plants //Folia Microbiologica. – 2017. – T. 62. – C. 381-391.
42. Lv X. et al. C1-based biomanufacturing: Advances, challenges and perspectives //Bioresource Technology. – 2023. – T. 367. – C. 128259.
43. Klein V. J. et al. Unravelling formaldehyde metabolism in bacteria: road towards synthetic methylotrophy //Microorganisms. – 2022. – T. 10. – №. 2. – C. 220.

44. Le H. T. Q., Lee E. Y. Methanotrophs: Metabolic versatility from utilization of methane to multi-carbon sources and perspectives on current and future applications //Bioresource Technology. – 2023. – T. 384. – C. 129296.
45. He Z. et al. A novel denitrifying methanotroph of the NC10 phylum and its microcolony //Scientific reports. – 2016. – T. 6. – №. 1. – C. 32241.
46. Vaksmaa A. et al. Distribution and activity of the anaerobic methanotrophic community in a nitrogen-fertilized Italian paddy soil //FEMS Microbiology Ecology. – 2016. – T. 92. – №. 12. – C. fw181.
47. Ettwig K. F. et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria //Nature. – 2010. – T. 464. – №. 7288. – C. 543-548.
48. Zhao J., Cai Y., Jia Z. The pH-based ecological coherence of active canonical methanotrophs in paddy soils //Biogeosciences. – 2020. – T. 17. – №. 6. – C. 1451-1462.
49. Erikstad H. A. et al. Global biogeographic distribution patterns of thermoacidophilic *Verrucomicrobia* methanotrophs suggest allopatric evolution //Frontiers in Microbiology. – 2019. – T. 10. – C. 1129.
50. van Teeseling M. C. F. et al. Expanding the verrucomicrobial methanotrophic world: description of three novel species of *Methylacidimicrobium* gen. nov //Applied and environmental microbiology. – 2014. – T. 80. – №. 21. – C. 6782-6791.
51. Khanongnuch R. et al. Characterization and genome analysis of a psychrophilic methanotroph representing a ubiquitous *Methylobacter* spp. cluster in boreal lake ecosystems //ISME communications. – 2022. – T. 2. – №. 1. – C. 85.
52. Schmitz R. A. et al. *Verrucomicrobial* methanotrophs: ecophysiology of metabolically versatile acidophiles //FEMS Microbiology Reviews. – 2021. – T. 45. – №. 5. – C. fuab007.
53. Neira G., Vergara E., Holmes D. S. Genome-guided prediction of acid resistance mechanisms in acidophilic methanotrophs of phylogenetically deep-rooted *Verrucomicrobia* isolated from geothermal environments //Frontiers in Microbiology. – 2022. – T. 13. – C. 900531.
54. Kalyuzhnaya M. G., Puri A. W., Lidstrom M. E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria //Metabolic engineering. – 2015. – T. 29. – C. 142-152.

55. Lazic M. Production and detection of polyhydroxybutyrate (PHB) in the alphaproteobacterial methanotroph *Methylocystis* sp. Rockwell. – 2023.
56. Nguyen D. T. N. et al. Type II methanotrophs: A promising microbial cell-factory platform for bioconversion of methane to chemicals //Biotechnology Advances. – 2021. – T. 47. – C. 107700.
57. Rozova O. N. et al. Enzymes of an alternative pathway of glucose metabolism in obligate methanotrophs //Scientific Reports. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 8795.
58. Chu F., Lidstrom M. E. XoxF acts as the predominant methanol dehydrogenase in the type I methanotroph *Methylomicrobium buryatense* //Journal of bacteriology. – 2016. – T. 198. – №. 8. – C. 1317-1325.
59. Nakagawa T. et al. A catalytic role of XoxF1 as La<sup>3+</sup>-dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1 //PloS one. – 2012. – T. 7. – №. 11. – C. e50480.
60. Kalyuzhnaya M. G., Gomez O. A., Murrell J. C. The methane-oxidizing bacteria (methanotrophs) //Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes. – 2019. – C. 245-278.
61. Karthikeyan O. P. et al. Review of sustainable methane mitigation and biopolymer production //Critical Reviews in Environmental Science and Technology. – 2015. – T. 45. – №. 15. – C. 1579-1610.
62. Chistoserdova L. Modularity of methylotrophy, revisited //Environmental microbiology. – 2011. – T. 13. – №. 10. – C. 2603-2622.
63. Pieja A. J., Sundstrom E. R., Criddle C. S. Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in the type II methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP //Applied and environmental microbiology. – 2011. – T. 77. – №. 17. – C. 6012-6019.
64. Tays C. Growth characterization and transcriptomics of methanotrophic bacteria as effected by carbon and nitrogen sources. – 2019.
65. Ullrich N. et al. Proteomic evidence of methanotrophy in methane-enriched hypolimnetic lake water //Limnology and Oceanography. – 2016. – T. 61. – №. S1. – C. S91-S100.

66. Alshareedah A., Sallis P. Methanotrophic oxygen dependency and availability for sustained oxidation //International Journal of Waste Resources. – 2016. – T. 6. – №. 3.
67. Cantera S. et al. Resilience and robustness of alphaproteobacterial methanotrophs upon methane feast-famine scenarios //Environmental Research. – 2023. – T. 239. – C. 117376.
68. Jia M. et al. Mitigating toxic formaldehyde to promote efficient utilization of C<sub>1</sub> resources //Critical Reviews in Biotechnology. – 2024. – C. 1-13.
69. But S. Y. et al. Biochemical properties and phylogeny of hydroxypyruvate reductases from methanotrophic bacteria with different c<sub>1</sub>-assimilation pathways //Biochemistry (Moscow). – 2017. – T. 82. – C. 1295-1303.
70. Nariya S., Kalyuzhnaya M. G. Diversity, physiology, and biotechnological potential of halo (alkali) philic methane-consuming bacteria //Methanotrophs: Microbiology Fundamentals and Biotechnological Applications. – 2019. – C. 139-161.
71. Yao X., Wang J., Hu B. How methanotrophs respond to pH: a review of ecophysiology //Frontiers in Microbiology. – 2023. – T. 13. – C. 1034164.
72. Nguyen A. D., Kim D., Lee E. Y. A comparative transcriptome analysis of the novel obligate methanotroph *Methylomonas* sp. DH-1 reveals key differences in transcriptional responses in C<sub>1</sub> and secondary metabolite pathways during growth on methane and methanol //BMC genomics. – 2019. – T. 20. – C. 1-16.
73. Fu Y., Li Y., Lidstrom M. The oxidative TCA cycle operates during methanotrophic growth of the Type I methanotroph *Methylomicrobium buryatense* 5GB1 //Metabolic Engineering. – 2017. – T. 42. – C. 43-51.
74. Aversch N. J. H., Kracke F. Metabolic network analysis of microbial methane utilization for biomass formation and upgrading to bio-fuels //Frontiers in Energy Research. – 2018. – T. 6. – C. 106.
75. Khmelenina V. N. et al. Metabolic features of aerobic methanotrophs: news and views //Current Issues in Molecular Biology. – 2019. – T. 33. – №. 1. – C. 85-100.
76. Yang S. et al. Global molecular analyses of methane metabolism in methanotrophic *Alphaproteobacterium*, *Methylosinus trichosporium* OB3b. Part II. Metabolomics and <sup>13</sup>C-labeling study //Frontiers in microbiology. – 2013. – T. 4. – C. 70.

77. Giri D. D. et al. Bioremediation potential of methylotrophic bacteria //Microbe mediated remediation of environmental contaminants. – Woodhead Publishing, 2021. – C. 199-207.
78. Vorobev A. et al. Genomic and transcriptomic analyses of the facultative methanotroph *Methylocystis* sp. strain SB2 grown on methane or ethanol //Applied and environmental microbiology. – 2014. – T. 80. – №. 10. – C. 3044-3052.
79. Khmelenina V. N. et al. Biosynthesis of secondary metabolites in methanotrophs: biochemical and genetic aspects //Applied biochemistry and microbiology. – 2015. – T. 51. – C. 150-158.
80. Cui J. et al. Metabolomics revealed an association of metabolite changes and defective growth in *Methylobacterium extorquens* AM1 overexpressing ecm during growth on methanol //PloS one. – 2016. – T. 11. – №. 4. – C. e0154043.
81. Gilman A. et al. Bioreactor performance parameters for an industrially-promising methanotroph *Methylomicrobium buryatense* 5GB1 //Microbial cell factories. – 2015. – T. 14. – C. 1-8.
82. Henard C. A. et al. Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) is essential for growth of the methanotroph *Methylococcus capsulatus* strain Bath //Applied and Environmental Microbiology. – 2021. – T. 87. – №. 18. – C. e00881-21.
83. Khadem A. F. et al. Autotrophic methanotrophy in *Verrucomicrobia*: *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV uses the Calvin-Benson-Bassham cycle for carbon dioxide fixation //Journal of bacteriology. – 2011. – T. 193. – №. 17. – C. 4438-4446.
84. Semrau J. D., DiSpirito A. A., Vuilleumier S. Facultative methanotrophy: false leads, true results, and suggestions for future research //FEMS microbiology letters. – 2011. – T. 323. – №. 1. – C. 1-12.
85. Tamas I. et al. The (d) evolution of methanotrophy in the *Beijerinckiaceae*—a comparative genomics analysis //The ISME journal. – 2014. – T. 8. – №. 2. – C. 369-382.
86. Farhan Ul Haque M. et al. Identification of active gaseous-alkane degraders at natural gas seeps //The ISME journal. – 2022. – T. 16. – №. 7. – C. 1705-1716.
87. Wutkowska M. et al. Leveraging genome-scale metabolic models to understand aerobic methanotrophs //The ISME Journal. – 2024. – T. 18. – №. 1. – C. wrae102.

88. Hwangbo M. et al. Acidophilic methanotrophs: Occurrence, diversity, and possible bioremediation applications //Environmental Microbiology Reports. – 2023. – T. 15. – №. 4. – C. 265-281.
89. Im J. et al. Characterization of a novel facultative *Methylocystis* species capable of growth on methane, acetate and ethanol //Environmental Microbiology Reports. – 2011. – T. 3. – №. 2. – C. 174-181.
90. Dunfield P. F. et al. *Methylocapsa aurea* sp. nov., a facultative methanotroph possessing a particulate methane monooxygenase, and emended description of the genus *Methylocapsa* //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2010. – T. 60. – №. 11. – C. 2659-2664.
91. Belova S. E. et al. Acetate utilization as a survival strategy of peat-inhabiting *Methylocystis* spp //Environmental Microbiology Reports. – 2011. – T. 3. – №. 1. – C. 36-46.
92. Picone N. et al. More than a methanotroph: a broader substrate spectrum for *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV //Frontiers in Microbiology. – 2020. – T. 11. – C. 604485.
93. Kaparullina E. N. et al. *Methylocystis borbori* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from the sludge of a freshwater lake and its metabolic properties //Antonie van Leeuwenhoek. – 2025. – T. 118. – №. 1. – C. 29.
94. Oh S. H. et al. Development and optimization of the biological conversion of ethane to ethanol using whole-cell methanotrophs possessing methane monooxygenase //Molecules. – 2019. – T. 24. – №. 3. – C. 591.
95. Samanta D. et al. From genome to evolution: investigating type II methylotrophs using a pangenomic analysis //Msystems. – 2024. – T. 9. – №. 6. – C. e00248-24.
96. Belova S. E. et al. *Methylocystis bryophila* sp. nov., a facultatively methanotrophic bacterium from acidic Sphagnum peat, and emended description of the genus *Methylocystis* (ex Whittenbury et al. 1970) Bowman et al. 1993 //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2013. – T. 63. – №. Pt\_3. – C. 1096-1104.
97. Haque M. F. U. et al. Facultative methanotrophs–diversity, genetics, molecular ecology and biotechnological potential: a mini-review //Microbiology. – 2020. – T. 166. – №. 10. – C. 894.

98. Шилов А. Е., Штейнман А. А. Проблема гидроксирования метана: биомиметический подход //Успехи химии. – 2012. – Т. 81. – №. 4. – С. 291-316.
99. Chidambarampadmavathy K., Obulisamy P K., Heimann K. Role of copper and iron in methane oxidation and bacterial biopolymer accumulation //Engineering in Life Sciences. – 2015. – Т. 15. – №. 4. – С. 387-399.
100. Zhang T. et al. Coupled effects of methane monooxygenase and nitrogen source on growth and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) production of *Methylosinus trichosporium* OB3b //Journal of Environmental Sciences. – 2017. – Т. 52. – С. 49-57.
101. Bokad A., Telang M. A Patent Landscape on Methane Oxidizing Bacteria (MOB) or Methanotrophs //Recent Patents on Biotechnology. – 2025. – Т. 19. – №. 4. – С. 301-318.
102. Park Y. R. et al. Biocatalytic oxidations of substrates through soluble methane monooxygenase from *Methylosinus sporium* //Catalysts. – 2018. – Т. 8. – №. 12. – С. 582.
103. Banerjee R., Jones J. C., Lipscomb J. D. Soluble methane monooxygenase //Annual review of biochemistry. – 2019. – Т. 88. – №. 1. – С. 409-431.
104. Штейнман А. А. Биоинспирированное окисление метана: от академических моделей метанмонооксигеназ к процессу прямого получения метанола //Кинетика и катализ. – 2020. – Т. 61. – №. 3. – С. 312-333.
105. Koo C. W., Rosenzweig A. C. Biochemistry of aerobic biological methane oxidation //Chemical Society Reviews. – 2021. – Т. 50. – №. 5. – С. 3424-3436.
106. Balasubramanian R. et al. Oxidation of methane by a biological dicopper centre //Nature. – 2010. – Т. 465. – №. 7294. – С. 115-119.
107. Sirajuddin S. et al. Effects of zinc on particulate methane monooxygenase activity and structure //Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Т. 289. – №. 31. – С. 21782-21794.
108. Semrau J. D. et al. Methanobactin from methanotrophs: genetics, structure, function and potential applications //FEMS microbiology letters. – 2020. – Т. 367. – №. 5. – С. fnaa045.
109. Donoghue P. J. et al. Rapid C–H bond activation by a monocopper (III)–hydroxide complex //Journal of the American Chemical Society. – 2011. – Т. 133. – №. 44. – С. 17602-17605.
110. Akberdin I. R. et al. Methane utilization in *Methylomicrobium alcaliphilum* 20ZR: a systems approach //Scientific reports. – 2018. – Т. 8. – №. 1. – С. 2512.

111. Kenney G. E., Sadek M., Rosenzweig A. C. Copper-responsive gene expression in the methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b //Metallomics. – 2016. – T. 8. – №. 9. – C. 931-940.
112. Peng P. et al. MmoD regulates soluble methane monooxygenase and methanobactin production in *Methylosinus trichosporium* OB3b //Applied and Environmental Microbiology. – 2023. – T. 89. – №. 12. – C. e01601-23.
113. Semrau J. D. et al. Methanobactin and MmoD work in concert to act as the ‘copper-switch’ in methanotrophs //Environmental microbiology. – 2013. – T. 15. – №. 11. – C. 3077-3086.
114. Kim H. et al. MMOD-induced structural changes of hydroxylase in soluble methane monooxygenase //Science advances. – 2019. – T. 5. – №. 10. – C. eaax0059.
115. Chan S. I., Lee S. J. The biochemistry of methane monooxygenases //Methanotrophs: Microbiology Fundamentals and Biotechnological Applications. – 2019. – C. 71-120.
116. Lawton T. J., Rosenzweig A. C. Methane-oxidizing enzymes: an upstream problem in biological gas-to-liquids conversion //Journal of the American Chemical Society. – 2016. – T. 138. – №. 30. – C. 9327-9340.
117. Rhee S. K., Awala S. I., Nguyen N. L. Enrichment and isolation of aerobic and anaerobic methanotrophs //Methanotrophs: Microbiology fundamentals and biotechnological applications. – 2019. – C. 39-69.
118. Tentori E. F., Richardson R. E. Methane monooxygenase gene transcripts as quantitative biomarkers of methanotrophic activity in *Methylosinus trichosporium* OB3b //Applied and environmental microbiology. – 2020. – T. 86. – №. 23. – C. e01048-20.
119. Stein L. Y., Roy R., Dunfield P. F. Aerobic methanotrophy and nitrification: processes and connections //eLS. – 2012. – C. 1-11.
120. Schnyder E. et al. Do temporal and spatial heterogeneity modulate biodiversity–functioning relationships in communities of methanotrophic bacteria? //Soil Biology and Biochemistry. – 2023. – T. 185. – C. 109141.
121. Leng L. et al. Uncultivated *Methylocystis* species in paddy soil include facultative methanotrophs that utilize acetate //Microbial ecology. – 2015. – T. 70. – C. 88-96.

122. Zhu Y. et al. Structure and activity of particulate methane monooxygenase arrays in methanotrophs //Nature communications. – 2022. – T. 13. – №. 1. – C. 5221.
123. Whiddon K. T. et al. Fluorescence-based analysis of the intracytoplasmic membranes of type I methanotrophs //Microbial biotechnology. – 2019. – T. 12. – №. 5. – C. 1024-1033.
124. Whiddon K. T. et al. Fluorescence-based analysis of the intracytoplasmic membranes of type I methanotrophs //Microbial biotechnology. – 2019. – T. 12. – №. 5. – C. 1024-1033.
125. Krause S., Lüke C., Frenzel P. Succession of methanotrophs in oxygen–methane counter-gradients of flooded rice paddies //The ISME journal. – 2010. – T. 4. – №. 12. – C. 1603-1607.
126. Oshkin I. Y. et al. Expanding characterized diversity and the pool of complete genome sequences of *Methylococcus* species, the bacteria of high environmental and biotechnological relevance //Frontiers in Microbiology. – 2021. – T. 12. – C. 756830.
127. Vorobev A. V. et al. *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium that possesses only a soluble methane monooxygenase //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2011. – T. 61. – №. 10. – C. 2456-2463.
128. Orata F. D. et al. Phylogenomic analysis of the gammaproteobacterial methanotrophs (order *Methylococcales*) calls for the reclassification of members at the genus and species levels //Frontiers in microbiology. – 2018. – T. 9. – C. 3162.
129. Howe K. L. et al. Metagenomics and metatranscriptomics reveal broadly distributed, active, novel methanotrophs in the Gulf of Mexico hypoxic zone and in the marine water column //FEMS Microbiology Ecology. – 2023. – T. 99. – №. 2. – C. fiac153.
130. Ghashghavi M. et al. *Methylotetracoccus oryzae* strain C50C1 is a novel type Ib gammaproteobacterial methanotroph adapted to freshwater environments //Msphere. – 2019. – T. 4. – №. 3. – C. 10.1128/msphere.00631-18.
131. Rahalkar M. C. et al. Cultivation of important methanotrophs from Indian rice fields //Frontiers in Microbiology. – 2021. – T. 12. – C. 669244.
132. Bussmann I. et al. *Methylomonas albis* sp. nov. and *Methylomonas fluvii* sp. nov.: two cold-adapted methanotrophs from the river Elbe and emended description of the species

*Methylovulum psychrotolerans* //Systematic and applied microbiology. – 2021. – T. 44. – №. 6. – C. 126248.

133. Deutzmann J. S., Hoppert M., Schink B. Characterization and phylogeny of a novel methanotroph, *Methyloglobulus morosus* gen. nov., spec. nov //Systematic and Applied Microbiology. – 2014. – T. 37. – №. 3. – C. 165-169.

134. Scanlan J. et al. The proteobacterial methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b remodels membrane lipids in response to phosphate limitation //Mbio. – 2022. – T. 13. – №. 3. – C. e00247-22.

135. Fenibo E. O. et al. Untapped talents: insight into the ecological significance of methanotrophs and its prospects //Science of The Total Environment. – 2023. – T. 903. – C. 166145.

136. Bodelier P. L. E. et al. Methanotroph ecology, environmental distribution and functioning. – Springer International Publishing, 2019. – C. 1-38.

137. Tan J. N. et al. Methane to bioproducts: unraveling the potential of methanotrophs for biomanufacturing //Current Opinion in Biotechnology. – 2024. – T. 90. – C. 103210.

138. Wang J., Salem D. R., Sani R. K. Microbial polymers produced from methane: Overview of recent progress and new perspectives //Microbial and natural macromolecules. – 2021. – C. 117-142.

139. Strong P. J. et al. A methanotroph-based biorefinery: potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation //Bioresource technology. – 2016. – T. 215. – C. 314-323.

140. Øverland M. et al. Evaluation of methane-utilising bacteria products as feed ingredients for monogastric animals //Archives of animal nutrition. – 2010. – T. 64. – №. 3. – C. 171-189.

141. Gundupalli M. P. et al. Bacterial single cell protein (BSCP): a sustainable protein source from *Methylobacterium* species //Trends in Food Science & Technology. – 2024. – C. 104426.

142. Wang S., An Z., Wang Z. W. Bioconversion of methane to chemicals and fuels by methane-oxidizing bacteria //Advances in bioenergy. – Elsevier, 2020. – T. 5. – C. 169-247.

143. Huang H. M. et al. New approach for raw biogas: Production of single cell protein by sulfide-tolerant methane-oxidizing bacteria consortia //Chemical Engineering Journal. – 2024. – T. 495. – C. 153678.

144. Agyemang P., Kwofie E. M. Response-to-failure analysis of global food system initiatives: a resilience perspective //Frontiers in Sustainable Food Systems. – 2021. – T. 5. – C. 676997.
145. García Martínez J. B. et al. Methane single cell protein: Potential to secure a global protein supply against catastrophic food shocks //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – T. 10. – C. 906704.
146. Ma Y. et al. Single cell protein production from methane in a gas-delivery membrane bioreactor //Water Research. – 2024. – T. 259. – C. 121820.
147. Bratosin B. C., Darjan S., Vodnar D. C. Single cell protein: A potential substitute in human and animal nutrition //Sustainability. – 2021. – T. 13. – №. 16. – C. 9284.
148. Biswas A. et al. Methanotroph (*Methylococcus capsulatus*, Bath) bacteria meal as an alternative protein source for Japanese yellowtail, *Seriola quinqueradiata* //Aquaculture. – 2020. – T. 529. – C. 735700.
149. Zhang Q. et al. Effects of replacing fishmeal with methanotroph (*Methylococcus capsulatus*, Bath) bacteria meal (FeedKind®) on growth and intestinal health status of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) //Fish & Shellfish Immunology. – 2022. – T. 122. – C. 298-305.
150. Chen Y. et al. Replacement of fish meal with Methanotroph (*Methylococcus capsulatus*, Bath) bacteria meal in the diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) //Aquaculture. – 2021. – T. 541. – C. 736801.
151. Ruiz A. et al. Single cell protein from methanotrophic bacteria as an alternative healthy and functional protein source in aquafeeds, a holistic approach in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles //Aquaculture. – 2023. – T. 576. – C. 739861.
152. Martínez J. B. G. et al. Methane Single Cell Protein: securing protein supply during global food catastrophes. – 2020.
153. Petersen L. A. H. et al. Dynamic investigation and modeling of the nitrogen cometabolism in *Methylococcus capsulatus* (Bath) //Biotechnology and Bioengineering. – 2019. – T. 116. – №. 11. – C. 2884-2895.
154. Sharif M. et al. Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition //Aquaculture. – 2021. – T. 531. – C. 735885.

155. Xu M. et al. Sulfide restrains the growth of *Methylocapsa acidiphila* converting renewable biogas to single cell protein //Water research. – 2020. – T. 184. – C. 116138.
156. Zha X. et al. Bioconversion of wastewater to single cell protein by methanotrophic bacteria //Bioresource Technology. – 2021. – T. 320. – C. 124351.
157. Areniello M. et al. Microbial protein production from sulfide-rich biogas through an enrichment of methane-and sulfur-oxidizing bacteria //Bioresource Technology. – 2023. – T. 383. – C. 129237.
158. Volova T. G., Barashkov V. A. Characteristics of proteins synthesized by hydrogen-oxidizing microorganisms //Applied Biochemistry and Microbiology. – 2010. – T. 46. – C. 574-579.
159. Kuźniar A. et al. Methanotrophic bacterial biomass as potential mineral feed ingredients for animals //International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2019. – T. 16. – №. 15. – C. 2674.
160. Haynes C. A., Gonzalez R. Rethinking biological activation of methane and conversion to liquid fuels //Nature chemical biology. – 2014. – T. 10. – №. 5. – C. 331-339.
161. Dalton B. et al. A review on biological synthesis of the biodegradable polymers polyhydroxyalkanoates and the development of multiple applications //Catalysts. – 2022. – T. 12. – №. 3. – C. 319.
162. Kalia V. C. et al. Manipulating microbial cell morphology for the sustainable production of biopolymers //Polymers. – 2024. – T. 16. – №. 3. – C. 410.
163. Roohi, Zaheer M. R., Kuddus M. PHB (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation //Polymers for Advanced Technologies. – 2018. – T. 29. – №. 1. – C. 30-40.
164. Akaraonye E., Keshavarz T., Roy I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice //Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2010. – T. 85. – №. 6. – C. 732-743.
165. Rostkowski K. H., Pfluger A. R., Criddle C. S. Stoichiometry and kinetics of the PHB-producing Type II methanotrophs *Methylosinus trichosporium* OB3b and *Methylocystis parvus* OBBP //Bioresource technology. – 2013. – T. 132. – C. 71-77.

166. Liu L. Y. et al. Biological conversion of methane to polyhydroxyalkanoates: current advances, challenges, and perspectives //Environmental Science and Ecotechnology. – 2020. – T. 2. – C. 100029.
167. Bordel S., Rojas A., Muñoz R. Reconstruction of a genome scale metabolic model of the polyhydroxybutyrate producing methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP //Microbial cell factories. – 2019. – T. 18. – C. 1-11.
168. López J. C. et al. Assessing the influence of CH<sub>4</sub> concentration during culture enrichment on the biodegradation kinetics and population structure //Journal of environmental management. – 2014. – T. 146. – C. 116-123.
169. Chidambarampadmavathy K. et al. Responses of mixed methanotrophic consortia to variable Cu<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup> ratios //Journal of Environmental Management. – 2017. – T. 197. – C. 159-166.
170. Pérez R. et al. The effect of temperature during culture enrichment on methanotrophic polyhydroxyalkanoate production //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2019. – T. 140. – C. 144-151.
171. Myung J. et al. Low energy emulsion-based fermentation enabling accelerated methane mass transfer and growth of poly (3-hydroxybutyrate)-accumulating methanotrophs //Bioresource technology. – 2016. – T. 207. – C. 302-307.
172. Zaldívar Carrillo J. A., Stein L. Y., Sauvageau D. Defining nutrient combinations for optimal growth and polyhydroxybutyrate production by *Methylosinus trichosporium* OB3b using response surface methodology //Frontiers in microbiology. – 2018. – T. 9. – C. 1513.
173. Rahnama F. et al. PHB production by *Methylocystis hirsuta* from natural gas in a bubble column and a vertical loop bioreactor //Biochemical engineering journal. – 2012. – T. 65. – C. 51-56.
174. Cantera S. et al. Bio-conversion of methane into high profit margin compounds: an innovative, environmentally friendly and cost-effective platform for methane abatement //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2019. – T. 35. – C. 1-10.
175. Strong P. J. et al. The opportunity for high-performance biomaterials from methane //Microorganisms. – 2016. – T. 4. – №. 1. – C. 11.

176. Sharma H. K., Sauvageau D., Stein L. Y. Optimization of methane feed and N: C ratio for biomass and polyhydroxybutyrate production by the alphaproteobacterial methanotroph *Methylocystis* sp. Rockwell //Methane. – 2022. – T. 1. – №. 4. – C. 355-364.
177. Patel S. K. S. et al. Polyhydroxyalkanoate production by Methanotrophs: recent updates and perspectives //Polymers. – 2024. – T. 16. – №. 18. – C. 2570.
178. Chen R., Weng G. M. Sustainable energy resources for driving methane conversion //Advanced Energy Materials. – 2023. – T. 13. – №. 36. – C. 2301734.
179. Rumah B. L. et al. Isolation and characterisation of *Methylocystis* spp. for poly-3-hydroxybutyrate production using waste methane feedstocks //AMB Express. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 6.
180. Chau T. H. T., Nguyen A. D., Lee E. Y. Engineering type I methanotrophic bacteria as novel platform for sustainable production of 3-hydroxybutyrate and biodegradable polyhydroxybutyrate from methane and xylose //Bioresource Technology. – 2022. – T. 363. – C. 127898.
181. Guo W. et al. Synthesizing value-added products from methane by a new *Methylomonas* //Journal of Applied Microbiology. – 2017. – T. 123. – №. 5. – C. 1214-1227.
182. Nwodo U. U., Green E., Okoh A. I. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects //International journal of molecular sciences. – 2012. – T. 13. – №. 11. – C. 14002-14015.
183. Mouro C., Gomes A. P., Gouveia I. C. Microbial exopolysaccharides: structure, diversity, applications, and future frontiers in sustainable functional materials //Polysaccharides. – 2024. – T. 5. – №. 3. – C. 241-287.
184. Taberero A., Cardea S. Microbial exopolysaccharides as drug carriers //Polymers. – 2020. – T. 12. – №. 9. – C. 2142.
185. Tiwari O. N. et al. Comprehensive review on recent trends and perspectives of natural exo-polysaccharides: pioneering nano-biotechnological tools //International Journal of Biological Macromolecules. – 2024. – C. 130747.
186. Gao Z. et al. A novel nutritional induction strategy flexibly switching the biosynthesis of food-like products from methane by a methanotrophic bacterium //Green Chemistry. – 2024. – T. 26. – №. 12. – C. 7048-7058.

187. He R. et al. Response of methanotrophic activity to extracellular polymeric substance production and its influencing factors //Waste Management. – 2017. – T. 69. – C. 289-297.
188. Hernández J., Gómez-Cuervo S., Omil F. EPS and SMP as stability indicators during the biofiltration of diffuse methane emissions //Water, Air, & Soil Pollution. – 2015. – T. 226. – C. 1-12.
189. Wang J., Salem D. R., Sani R. K. Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications //Carbohydrate polymers. – 2019. – T. 205. – C. 8-26.
190. Cantera S. et al. Multi-production of high added market value metabolites from diluted methane emissions via methanotrophic extremophiles //Bioresource technology. – 2018. – T. 267. – C. 401-407.
191. Dong T. et al. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: a critical review //Applied Energy. – 2016. – T. 177. – C. 879-895.
192. Fei Q. et al. Bioconversion of natural gas to liquid fuel: opportunities and challenges //Biotechnology advances. – 2014. – T. 32. – №. 3. – C. 596-614.
193. Balasubramanian R., Kenney G. E., Rosenzweig A. C. Dual pathways for copper uptake by methanotrophic bacteria //Journal of biological chemistry. – 2011. – T. 286. – №. 43. – C. 37313-37319.
194. Demidenko A. et al. Fatty acid biosynthesis pathways in *Methylomicrobium buryatense* 5G (B1) //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 7. – C. 2167.
195. Fei Q. et al. Enhanced biological fixation of methane for microbial lipid production by recombinant *Methylomicrobium buryatense* //Biotechnology for Biofuels. – 2018. – T. 11. – C. 1-11.
196. Patel S. K. S., Kalia V. C., Lee J. K. Integration of biogas derived from dark fermentation and anaerobic digestion of biowaste to enhance methanol production by methanotrophs //Bioresource Technology. – 2023. – T. 369. – C. 128427.
197. Bennett R. K. et al. Engineering the bioconversion of methane and methanol to fuels and chemicals in native and synthetic methylotrophs //Current opinion in biotechnology. – 2018. – T. 50. – C. 81-93.

198. Patel S. K. S. et al. Repeated batch methanol production from a simulated biogas mixture using immobilized *Methylocystis bryophila* //Energy. – 2018. – T. 145. – C. 477-485.
199. Sheets J. P. et al. Biological conversion of biogas to methanol using methanotrophs isolated from solid-state anaerobic digestate //Bioresource technology. – 2016. – T. 201. – C. 50-57.
200. Othman A. R. et al. Improving methanol production by *Methylosinus trichosporium* through the one factor at a time (OFAT) approach //Greenhouse Gases: Science and Technology. – 2022. – T. 12. – №. 5. – C. 661-668.
201. Patel S. K. S. et al. Biological methanol production by a type II methanotroph *Methylocystis bryophila* //Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2016. – T. 26. – №. 4. – C. 717-724.
202. Hogendoorn C. et al. Methanol production by “*Methylacidiphilum fumariolicum*” SolV under different growth conditions //Applied and environmental microbiology. – 2020. – T. 86. – №. 18. – C. e01188-20.
203. Patel S. K. S. et al. Synthetic design of methanotroph co-cultures and their immobilization within polymers containing magnetic nanoparticles to enhance methanol production from wheat straw-based biogas //Bioresource Technology. – 2022. – T. 364. – C. 128032.
204. Avila-Nuñez G. et al. Methanol excretion by *Methylomonas methanica* is induced by the supernatant of a methanotrophic consortium //Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2024. – T. 99. – №. 6. – C. 1356-1363.
205. Kenney G. E., Rosenzweig A. C. Methanobactins: Maintaining copper homeostasis in methanotrophs and beyond //Journal of Biological Chemistry. – 2018. – T. 293. – №. 13. – C. 4606-4615.
206. Salem R., ElDyasti A., Audette G. F. Biomedical applications of biomolecules isolated from methanotrophic bacteria in wastewater treatment systems //Biomolecules. – 2021. – T. 11. – №. 8. – C. 1217.
207. Cantera S. et al. Novel haloalkaliphilic methanotrophic bacteria: An attempt for enhancing methane bio-refinery //Journal of environmental management. – 2019. – T. 231. – C. 1091-1099.

208. Cantera S. et al. A systematic comparison of ectoine production from upgraded biogas using *Methylobacterium alcaliphilum* and a mixed haloalkaliphilic consortium //Waste Management. – 2020. – T. 102. – C. 773-781.
209. Lim S. E. et al. High production of ectoine from methane in genetically engineered *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z by preventing ectoine degradation //Microbial Cell Factories. – 2024. – T. 23. – №. 1. – C. 127.
210. Choi Y. et al. *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z based ectoine production from various industrial CH<sub>4</sub> sources: Cultivation optimization and comprehensive analysis //Chemical Engineering Journal. – 2024. – T. 499. – C. 156039.
211. Semrau J. D. et al. Metals and methanotrophy //Applied and environmental microbiology. – 2018. – T. 84. – №. 6. – C. e02289-17.
212. Pesch M. L. et al. Isolation and purification of Cu-free methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b //Geochemical transactions. – 2011. – T. 12. – C. 1-9.
213. Kang-Yun C. S. et al. Evidence for methanobactin “Theft” and novel chalkophore production in methanotrophs: impact on methanotrophic-mediated methylmercury degradation //The ISME Journal. – 2022. – T. 16. – №. 1. – C. 211-220.
214. Reyes R. M., Rosenzweig A. C. Purification and biochemical characterization of methanobactin biosynthetic enzymes //Methods in enzymology. – 2024. – T. 702. – C. 171.
215. Dassama L. M. K. et al. Methanobactin transport machinery //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – T. 113. – №. 46. – C. 13027-13032.
216. Squitti R., Siotto M., Polimanti R. Low-copper diet as a preventive strategy for Alzheimer's disease //Neurobiology of aging. – 2014. – T. 35. – C. S40-S50.
217. Yang L. et al. Chalkophomycin biosynthesis revealing unique enzyme architecture for a hybrid nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase //Molecules. – 2024. – T. 29. – №. 9. – C. 1982.
218. Ho A. et al. Environmental applications of methanotrophs //Methanotrophs: Microbiology Fundamentals and Biotechnological Applications. – 2019. – C. 231-255.
219. Pandey V. C. et al. Methanotrophs: promising bacteria for environmental remediation //International Journal of Environmental Science and Technology. – 2014. – T. 11. – C. 241-250.

220. Tyagi B. et al. Microbial transformation of methane to biofuels and biomaterials //Biomass, Biofuels, Biochemicals. – Elsevier, 2022. – C. 203-230.
221. Faheem M. et al. Enhanced adsorptive bioremediation of heavy metals ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) by methane-oxidizing epipelton //Microorganisms. – 2020. – T. 8. – №. 4. – C. 505.
222. Boden R., Murrell J. C. Response to mercury (II) ions in *Methylococcus capsulatus* (Bath) //FEMS microbiology letters. – 2011. – T. 324. – №. 2. – C. 106-110.
223. Strong P. J. et al. Methanotrophs: methane mitigation, denitrification and bioremediation //Agro-Environmental Sustainability: Volume 2: Managing Environmental Pollution. – 2017. – C. 19-40.
224. Chen P. et al. Cometabolic degradation mechanism and microbial network response of methanotrophic consortia to chlorinated hydrocarbon solvents //Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2022. – T. 230. – C. 113110.
225. Jiang H. et al. Methanotrophs: multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering //Biochemical Engineering Journal. – 2010. – T. 49. – №. 3. – C. 277-288.
226. Lee J. H., Yang H., Cho K. S. Inoculation effect of methanotrophs on rhizoremediation performance and methane emission in diesel-contaminated soil //Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2023. – T. 33. – №. 7. – C. 886.
227. Kwon M., Ho A., Yoon S. Novel approaches and reasons to isolate methanotrophic bacteria with biotechnological potentials: recent achievements and perspectives //Applied microbiology and biotechnology. – 2019. – T. 103. – C. 1-8.
228. Guo S. et al. Systems metabolic engineering of methanotrophic bacteria for biological conversion of methane to value-added compounds //One-Carbon Feedstocks for Sustainable Bioproduction. – Cham : Springer International Publishing, 2022. – C. 91-126.
229. Comesaña-Gándara B. et al. Recent trends and advances in biogas upgrading and methanotrophs-based valorization //Chemical Engineering Journal Advances. – 2022. – T. 11. – C. 100325.
230. Lee O. K., Nguyen D. T. N., Lee E. Y. Metabolic engineering of methanotrophs for the production of chemicals and fuels //Methanotrophs: microbiology fundamentals and biotechnological applications. – 2019. – C. 163-203.

231. Henard C. A., Guarnieri M. T. Metabolic engineering of methanotrophic bacteria for industrial biomanufacturing //Methane biocatalysis: paving the way to sustainability. – 2018. – C. 117-132.
232. Cha S. et al. Enhancing D-lactic acid production from methane through metabolic engineering of *Methylomonas* sp. DH-1 //Microbial Cell Factories. – 2025. – T. 24. – №. 1. – C. 70.
233. Le H. T. Q., Lee E. Y. Insights into C<sub>1</sub> and C<sub>3</sub> assimilation pathways in type I methanotrophic bacterium from co-production of 1,2-propanediol and lactate //Bioresource Technology. – 2022. – T. 365. – C. 128172.
234. Nguyen T. T. et al. Bioconversion of methane to cadaverine and lysine using an engineered type II methanotroph, *Methylosinus trichosporium* OB3b //Green Chemistry. – 2020. – T. 22. – №. 22. – C. 7803-7811.
235. Madavi T. B. et al. Microbial methanotrophy: Methane capture to biomanufacturing of platform chemicals and fuels //Next Energy. – 2025. – T. 8. – C. 100251.
236. McCabe J. W., Vangala R., Angel L. A. Binding selectivity of methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b for copper (I), silver (I), zinc (II), nickel (II), cobalt (II), manganese (II), lead (II), and iron (II) //Journal of the American Society for Mass Spectrometry. – 2017. – T. 28. – №. 12. – C. 2588-2601.
237. Dershwitz P. et al. Oxygen generation via water splitting by a novel biogenic metal ion-binding compound //Applied and Environmental Microbiology. – 2021. – T. 87. – №. 14. – C. e00286-21.
238. Xin J., Zhang S. Biobased synthesis of gold nanoparticles by methanobactin //2015 International Conference on Education, Management, Information and Medicine. – Atlantis Press, 2015. – C. 775-778.
239. Lai C. Y. et al. Selenate and nitrate bioreductions using methane as the electron donor in a membrane biofilm reactor //Environmental science & technology. – 2016. – T. 50. – №. 18. – C. 10179-10186.
240. Eswayah A. S. et al. Microbial transformations of selenite by methane-oxidizing bacteria //Applied Microbiology and Biotechnology. – 2017. – T. 101. – C. 6713-6724.

241. Su Y. et al. Microbial community and function of enrichment cultures with methane and toluene //Applied microbiology and biotechnology. – 2014. – T. 98. – C. 3121-3131.
242. Kim J., Kim D. H. D., Yoon S. Rapid isolation of fast-growing methanotrophs from environmental samples using continuous cultivation with gradually increased dilution rates //Applied Microbiology and Biotechnology. – 2018. – T. 102. – №. 13. – C. 5707-5715.
243. Wei X. M. et al. Responses of methanotrophic activity, community and EPS production to CH<sub>4</sub> and O<sub>2</sub> concentrations in waste biocover soils //Waste Management. – 2015. – T. 42. – C. 118-127.
244. Gwak J. H. et al. Sulfur and methane oxidation by a single microorganism //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2022. – T. 119. – №. 32. – C. e2114799119.
245. Tsapekos P. et al. Methane oxidising bacteria to upcycle effluent streams from anaerobic digestion of municipal biowaste //Journal of environmental management. – 2019. – T. 251. – C. 109590.
246. Zhu J. et al. Optimum O<sub>2</sub>: CH<sub>4</sub> ratio promotes the synergy between aerobic methanotrophs and denitrifiers to enhance nitrogen removal //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 1112.
247. Zhang T. et al. Enrichments of methanotrophic–heterotrophic cultures with high poly-β-hydroxybutyrate (PHB) accumulation capacities //Journal of Environmental Sciences. – 2018. – T. 65. – C. 133-143.
248. Shen L. et al. Effects of abrupt and gradual increase of atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on methanotrophs in paddy fields //Environmental Research. – 2023. – T. 223. – C. 115474.
249. Zhang T. et al. Poly-β-hydroxybutyrate production by *Methylosinus trichosporium* OB3b at different gas-phase conditions //Iranian Journal of Biotechnology. – 2019. – T. 17. – №. 1. – C. e1866.
250. Banks M. et al. Industrial production of microbial protein products //Current Opinion in Biotechnology. – 2022. – T. 75. – C. 102707.
251. Hyun S. W. et al. Methanotrophs mediated biogas valorization: Sustainable route to polyhydroxybutyrate production //Bioresource Technology. – 2024. – T. 402. – C. 130759.

252. Henard C. A. et al. Biogas biocatalysis: methanotrophic bacterial cultivation, metabolite profiling, and bioconversion to lactic acid //Frontiers in microbiology. – 2018. – Т. 9. – С. 2610.
253. Cattaneo C. R. et al. Biogas bioconversion into poly (3-hydroxybutyrate) by a mixed microbial culture in a novel Taylor flow bioreactor //Waste Management. – 2022. – Т. 150. – С. 364-372.
254. Areniello M. et al. Sulfur-containing microbial protein production from sulfide-rich biogas in hollow fiber membrane bioreactors //Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2025. – Т. 13. – №. 1. – С. 115264.
255. Шубенкова О. В. и др. Влияние минеральных соединений азота и метанола на состав метанотрофных накопительных культур из осадка метанового сипа озера Байкал //Микробиология. – 2021. – Т. 90. – №. 4. – С. 430-442.
256. Fu Y. et al. Core metabolism shifts during growth on methanol versus methane in the methanotroph *Methylomicrobium buryatense* 5GB1 //MBio. – 2019. – Т. 10. – №. 2. – С. 10.1128/mbio.00406-19.
257. Zuñiga C., Morales M., Revah S. Polyhydroxyalkanoates accumulation by *Methylobacterium organophilum* CZ-2 during methane degradation using citrate or propionate as cosubstrates //Bioresource technology. – 2013. – Т. 129. – С. 686-689.
258. He R. et al. Ammonium conversion and its feedback effect on methane oxidation of *Methylosinus sporium* //Journal of bioscience and bioengineering. – 2017. – Т. 123. – №. 4. – С. 466-473.
259. Ho A. et al. Response of a methane-driven interaction network to stressor intensification //FEMS Microbiology Ecology. – 2020. – Т. 96. – №. 10. – С. fiae180.
260. AlSayed A. et al. Kinetics of type I methanotrophs mixed culture enriched from waste activated sludge //Biochemical engineering journal. – 2018. – Т. 132. – С. 60-67.
261. Nguyen N. L. et al. A novel methanotroph in the genus *Methylomonas* that contains a distinct clade of soluble methane monooxygenase //Journal of Microbiology. – 2017. – Т. 55. – С. 775-782.
262. Tays C. et al. Combined effects of carbon and nitrogen source to optimize growth of proteobacterial methanotrophs //Frontiers in Microbiology. – 2018. – Т. 9. – С. 2239.

263. Dizon L. S. H. et al. Analysis of methanotroph populations from various sources for production of high-value products //Engineering Proceedings. – 2023. – T. 31. – №. 1. – C. 30.
264. Midot F. et al. Temporal dynamics of soil microbial C and N cycles with GHG fluxes in the transition from tropical peatland forest to oil palm plantation //Applied and Environmental Microbiology. – 2025. – T. 91. – №. 1. – C. e01986-24.
265. Dedysh S. N., Dunfield P. F. Cultivation of methanotrophs //Hydrocarbon and lipid microbiology protocols: Isolation and cultivation. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. – C. 231-247.
266. Xing Z. et al. Effects of copper on expression of methane monooxygenases, trichloroethylene degradation, and community structure in methanotrophic consortia //Engineering in life sciences. – 2018. – T. 18. – №. 4. – C. 236-243.
267. Cardoso L. O. B. et al. Enrichment of *Methylosinus*-dominant consortia from mangroves for polyhydroxybutyrate (PHB) production //Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2022. – T. 10. – №. 5. – C. 108490.
268. Di C., Yu W., Lu Y. Screening of methanotrophic strain for scale applications: methane emission reduction and resource utilization //Sustainability. – 2025. – T. 17. – №. 8. – C. 3687.
269. Zhang Y. et al. Decreased CH<sub>4</sub> emissions associated with methanogenic and methanotrophic communities and their interactions following Fe (III) fertiliser application in rice paddies //Geoderma. – 2023. – T. 431. – C. 116375.
270. Sundstrom E. R., Criddle C. S. Optimization of methanotrophic growth and production of poly (3-hydroxybutyrate) in a high-throughput microbioreactor system //Applied and environmental microbiology. – 2015. – T. 81. – №. 14. – C. 4767-4773.
271. del Rosario Rodero M. et al. Influence of operational conditions on the performance of biogas bioconversion into ectoines in pilot bubble column bioreactors //Bioresource Technology. – 2022. – T. 358. – C. 127398.
272. Abazari M. et al. Methane Removal of Isolated *Methylocystis* Strains in the Culture Medium Designed by Evaluating Strain Capacity under Adverse Conditions //Journal of Microbial Biology. – 2021. – T. 10. – №. 40. – C. 23-36.

273. Bai X. et al. Impact of co-introduction of soluble potassium and nitrogen on methanotrophs //Chemical Engineering Journal. – 2025. – C. 162171.
274. Han D., Link H., Liesack W. Response of *Methylocystis* sp. strain SC2 to salt stress: physiology, global transcriptome, and amino acid profiles //Applied and Environmental Microbiology. – 2017. – Т. 83. – №. 20. – C. e00866-17.
275. Ho A. et al. Effect of salt stress on aerobic methane oxidation and associated methanotrophs; a microcosm study of a natural community from a non-saline environment //Soil Biology and Biochemistry. – 2018. – Т. 125. – C. 210-214.
276. Guo K. et al. Asparagine Uptake: a Cellular Strategy of *Methylocystis* to Combat Severe Salt Stress //Applied and Environmental Microbiology. – 2023. – Т. 89. – №. 6. – C. e00113-23.
277. Tikhonova E. N. et al. Growing in saltwater: biotechnological potential of novel *Methylovivimicrobium*-and *Methylomarinum*-like methanotrophic bacteria //Microorganisms. – 2023. – Т. 11. – №. 9. – C. 2257.
278. Danilova O. V. et al. *Methylomonas paludis* sp. nov., the first acid-tolerant member of the genus *Methylomonas*, from an acidic wetland //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2013. – Т. 63. – №. Pt\_6. – C. 2282-2289.
279. Case D. H. et al. Aerobic and anaerobic methanotrophic communities associated with methane hydrates exposed on the seafloor: a high-pressure sampling and stable isotope-incubation experiment //Frontiers in Microbiology. – 2017. – Т. 8. – C. 2569.
280. Benner J. et al. Exploring methane-oxidizing communities for the co-metabolic degradation of organic micropollutants //Applied Microbiology and Biotechnology. – 2015. – Т. 99. – C. 3609-3618.
281. Meruvu H. et al. From nature to nurture: Essence and methods to isolate robust methanotrophic bacteria //Synthetic and systems biotechnology. – 2020. – Т. 5. – №. 3. – C. 173-178.
282. Ошкин И. Ю. и др. Термотолерантные метанотрофные бактерии из осадков реки Черная, Крым, и оценка их ростовых характеристик //Микробиология. – 2021. – Т. 90. – №. 5. – C. 553-563.

283. Iguchi H., Yurimoto H., Sakai Y. Interactions of methylotrophs with plants and other heterotrophic bacteria //Microorganisms. – 2015. – T. 3. – №. 2. – C. 137-151.
284. Iguchi H., Yurimoto H., Sakai Y. Stimulation of methanotrophic growth in cocultures by cobalamin excreted by Rhizobia //Applied and environmental microbiology. – 2011. – T. 77. – №. 24. – C. 8509-8515.
285. Islam M. M. et al. Investigation of microbial community interactions between Lake Washington methanotrophs using genome-scale metabolic modeling //PeerJ. – 2020. – T. 8. – C. e9464.
286. Oshkin I. Y. et al. Molecular analysis of the microbial community developing in continuous culture of *Methylococcus* sp. Concept-8 on natural gas //Microbiology. – 2020. – T. 89. – C. 551-559.
287. Van Der Ha D. et al. Selection of associated heterotrophs by methane-oxidizing bacteria at different copper concentrations //Antonie Van Leeuwenhoek. – 2013. – T. 103. – C. 527-537.
288. Yu Z., Beck D. A. C., Chistoserdova L. Natural selection in synthetic communities highlights the roles of *Methylococcaceae* and *Methylophilaceae* and suggests differential roles for alternative methanol dehydrogenases in methane consumption //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 2392.
289. Hernandez M. E. et al. Oxygen availability is a major factor in determining the composition of microbial communities involved in methane oxidation //PeerJ. – 2015. – T. 3. – C. e801.
290. Chi Z. et al. Diversity of methanotrophs in a simulated modified biocover reactor //Journal of Environmental Sciences. – 2012. – T. 24. – №. 6. – C. 1076-1082.
291. Fergala A., AlSayed A., Eldyasti A. Factors affecting the selection of PHB accumulating methanotrophs from waste activated sludge while utilizing ammonium as their nitrogen source //Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2018. – T. 93. – №. 5. – C. 1359-1369.
292. Zheng Y. et al. Metagenomic insight into environmentally challenged methane-fed microbial communities //Microorganisms. – 2020. – T. 8. – №. 10. – C. 1614.

293. Chidambarampadmavathy K. et al. Response of mixed methanotrophic consortia to different methane to oxygen ratios //Waste Management. – 2017. – T. 61. – C. 220-228.
294. Guo B. et al. A natural gas fermentation bacterial meal (FeedKind®) as a functional alternative ingredient for fishmeal in diet of largemouth bass, *Micropterus salmoides* //Antioxidants. – 2022. – T. 11. – №. 8. – C. 1479.
295. Shahzad H. M. A. et al. Challenges and opportunities in biogas conversion to microbial protein: a pathway for sustainable resource recovery from organic waste //Process Safety and Environmental Protection. – 2024.
296. Krause S. M. B. et al. Lanthanide-dependent cross-feeding of methane-derived carbon is linked by microbial community interactions //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – T. 114. – №. 2. – C. 358-363.
297. Großkopf T., Soyer O. S. Synthetic microbial communities //Current opinion in microbiology. – 2014. – T. 18. – C. 72-77.
298. De Roy K. et al. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities //Environmental microbiology. – 2014. – T. 16. – №. 6. – C. 1472-1481.
299. Ho A. et al. The more, the merrier: heterotroph richness stimulates methanotrophic activity //The ISME journal. – 2014. – T. 8. – №. 9. – C. 1945-1948.
300. Nunes J. J. et al. Enhanced production of single cell protein from *M. capsulatus* (Bath) growing in mixed culture //The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – 2016. – T. 6. – №. 3. – C. 894.
301. Kerckhof F. M. et al. From biogas and hydrogen to microbial protein through co-cultivation of methane and hydrogen oxidizing bacteria //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2021. – T. 9. – C. 733753.
302. Khoshnevisan B. et al. From renewable energy to sustainable protein sources: Advancement, challenges, and future roadmaps //Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2022. – T. 157. – C. 112041.
303. Hays S. G. et al. Better together: engineering and application of microbial symbioses //Current opinion in biotechnology. – 2015. – T. 36. – C. 40-49.

304. Lee H. et al. Syntrophic co-culture of a methanotroph and heterotroph for the efficient conversion of methane to mevalonate //Metabolic Engineering. – 2021. – T. 67. – C. 285-292.
305. Veraart A. J. et al. Living apart together—bacterial volatiles influence methanotrophic growth and activity //The ISME journal. – 2018. – T. 12. – №. 4. – C. 1163-1166.
306. Xu T. et al. Single cell protein production potential of enriched microbial populations from rice paddy soils and roots: Insights into protein yield enhancement by *Methylophilaceae* //Bioresource Technology. – 2025. – T. 427. – C. 132397.
307. Bayrakdar A., Tilahun E., Calli B. Biogas desulfurization using autotrophic denitrification process //Applied microbiology and biotechnology. – 2016. – T. 100. – C. 939-948.
308. Jiang D. et al. Biological conversion of methane to methanol at high H<sub>2</sub>S concentrations with an H<sub>2</sub>S-tolerant methanotrophic consortium //Renewable Energy. – 2023. – T. 204. – C. 475-484.
309. Ma L. et al. Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex //Antonie Van Leeuwenhoek. – 2013. – T. 103. – C. 299-312.
310. Babis W., Jastrzebski J. P., Ciesielski S. Fine-tuning of DADA2 parameters for multiregional metabarcoding analysis of 16S rRNA genes from activated sludge and comparison of taxonomy classification power and taxonomy databases //International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – T. 25. – №. 6. – C. 3508.
311. Sabale T. R., Kulkarni P. P., Ghosalkar A. R. Methane based continuous culture of *Methylosinus trichosporium* for production of poly-3-hydroxybutyrate using membrane recycle system //Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2023. – T. 28. – №. 4. – C. 519-527.
312. Dubencovs K. et al. Medium formulation and fed-batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* //Key Engineering Materials. – 2022. – T. 933. – C. 179-184.
313. Mohammed N., Katari J. K., Das D. Overproduction of poly-β-hydroxybutyrate in *Methylosinus trichosporium* 11131 as degradable food packaging material utilizing methane //Biomass Conversion and Biorefinery. – 2024. – T. 14. – №. 18. – C. 21963-21978.

314. Luangthongkam P. et al. The effect of methane and odd-chain fatty acids on 3-hydroxybutyrate (3HB) and 3-hydroxyvalerate (3HV) synthesis by a *Methylosinus*-dominated mixed culture // *Bioresources and Bioprocessing*. – 2019. – Т. 6. – №. 1. – С. 50.
315. Li Y. et al. Silver-based surface plasmon sensors: fabrication and applications // *International journal of molecular sciences*. – 2023. – Т. 24. – №. 4. – С. 4142.
316. ГОСТ 31640-2012. Корма. Методы определения содержания сухого вещества. – Москва : Стандартинформ, 2014. – 8 с.
317. ГОСТ 32044.1-2012 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение массовой доли азота и вычисление массовой доли сырого протеина. Часть 1. Метод Кьельдаля. – М.: Стандартинформ, 2014. – 12 с.
318. Barea P. et al. Membrane fractionation of hydrolysates of the water-soluble protein from tuna fish meal obtained by subcritical water and enzymatic treatments. Comparison of physical and chemical properties // *Bioresources and Bioprocessing*. – 2025. – Т. 12. – №. 1. – С. 16.
319. Wada O. Z. et al. Evaluation of cell disruption methods for protein and coenzyme Q10 quantification in purple non-sulfur bacteria // *Frontiers in Microbiology*. – 2024. – Т. 15. – С. 1324099.
320. Rondel C., Marcato-Romain C. E., Girbal-Neuhauser E. Development and validation of a colorimetric assay for simultaneous quantification of neutral and uronic sugars // *Water research*. – 2013. – Т. 47. – №. 8. – С. 2901-2908.
321. Decker E. M. et al. Dynamic production of soluble extracellular polysaccharides by *Streptococcus mutans* // *International journal of dentistry*. – 2011. – Т. 2011. – №. 1. – С. 435830.
322. Космачевская О. В. и др. Влияние условий культивирования на синтез поли-3-гидроксибутирата клубеньковыми бактериями *Rhizobium phaseoli* // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2020. – Т. 56. – №. 1. – С. 60-68.
323. ОФС.1.7.2.0018.15 Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в биологических лекарственных препаратах // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. – М., 2018. – Т. 2. – С. 1199–1204.
324. ISO 20776-1:2019. Исследование чувствительности возбудителей инфекционных болезней и оценка функциональных характеристик изделий для определения

чувствительности к антимикробным препаратам. Часть 1: Референтный метод микроразведений в бульоне для исследования активности *in vitro* антимикробных препаратов в отношении быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни. – Женева : ISO, 2019. – 26 с.

325. Ansari M. A. et al. Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MSRA on isolates from skin infections. – 2011.

326. Nian H. et al. Overexpression of the formaldehyde dehydrogenase gene from *Brevibacillus brevis* to enhance formaldehyde tolerance and detoxification of tobacco //Applied biochemistry and biotechnology. – 2013. – Т. 169. – С. 170-180.

327. Habibi A., Vahabzadeh F. Degradation of formaldehyde in packed-bed bioreactor by kissiris-immobilized *Ralstonia eutropha* //Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2013. – Т. 18. – С. 455-464.

328. Grunwald S. et al. Kinetic and stoichiometric characterization of organoautotrophic growth of *Ralstonia eutropha* on formic acid in fed-batch and continuous cultures //Microbial Biotechnology. – 2015. – Т. 8. – №. 1. – С. 155-163.

329. Volke D. C., Orsi E., Nikel P. I. Emergent CRISPR–Cas-based technologies for engineering non-model bacteria //Current Opinion in Microbiology. – 2023. – Т. 75. – С. 102353.

330. Amer A., Kim Y. Minimizing the lag phase of *Cupriavidus necator* growth under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions //Applied and Environmental Microbiology. – 2023. – Т. 89. – №. 2. – С. e02007-22.

331. Santin A. et al. Autotrophic poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Cupriavidus necator* for sustainable bioplastic production triggered by nutrient starvation //Bioresource Technology. – 2024. – Т. 406. – С. 131068.

332. Modica V. et al. Toxicological evaluation of protein powder derived from *Cupriavidus necator* //Journal of Applied Toxicology. – 2023. – Т. 43. – №. 6. – С. 887-912.

333. Zhai Z. et al. Biological denitrification potential of cellulase-producing *Cupriavidus* sp. ZY7 and denitrifying *Aquabacterium* sp. XL4 at low carbon-to-nitrogen ratio: Performance and synergistic properties //Bioresource Technology. – 2022. – Т. 360. – С. 127600.

334. Yang P. et al. Efficient heterotrophic nitrification–aerobic denitrification by a novel bacterium *Ralstonia pickettii* J4: Isolation, identification, and application //Biochemical Engineering Journal. – 2024. – Т. 210. – С. 109417.
335. Esembaeva M. A. et al. From single organisms to communities: Modeling methanotrophs and their satellites //Microorganisms. – 2025. – Т. 14. – №. 1. – С. 3.
336. Takahashi Y., Nakashima T. Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics //Antibiotics. – 2018. – Т. 7. – №. 2. – С. 45.
337. Miyaji A., Nitta M., Baba T. Influence of copper ions removal from membrane-bound form of particulate methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b on its activity for methane hydroxylation //Journal of biotechnology. – 2019. – Т. 306. – С. 100001.
338. Myung J. et al. Long-term cultivation of a stable *Methylocystis*-dominated methanotrophic enrichment enabling tailored production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) //Bioresource technology. – 2015. – Т. 198. – С. 811-818.
339. Singh A. et al. Silver nanoparticles as fluorescent probes: new approach for bioimaging //Int. J. Sci. Technol. Res. – 2013. – Т. 2. – №. 11. – С. 153-157.
340. Sharma K., Guleria S., Razdan V. K. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ocimum gratissimum* leaf extract: characterization, antimicrobial activity and toxicity analysis //Journal of plant biochemistry and biotechnology. – 2020. – Т. 29. – С. 213-224.
341. Le Ouay, B., Stellacci, F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight // Nano Today, 2015, 10(3), С. 339-354.
342. ГОСТ Р 57683–2017. Продукция микробиологическая. Микробный протеиновый кормовой концентрат 60 %. Технические условия. – Введ. 2018–08–01. – Москва: Стандартинформ, 2017. – 12 с.
343. Dickson R., Mansouri S. S. Sustainable production of fermentation-based novel proteins //Computers & Chemical Engineering. – 2025. – Т. 195. – С. 109033.
344. El Abbadi S. H. et al. Stranded methane to food: techno-economic analysis of methanotrophic protein production //Preprint at EarthArXiv X5PP5D. – 2021.
345. Бабурченкова О. А., Бабусенко Е. С., Градова Н. Б. [и др.] Strain of methane-oxidizing bacteria *Methylococcus capsulatus* GBS-15 for obtaining of microbial protein mass : пат. RU 2613365 C1. – № 2016113268/10.

346. Ye L. et al. Single-cell protein: Overcoming technological and biological challenges towards improved industrialization //Current Opinion in Biotechnology. – 2024. – T. 88. – C. 103171.
347. Petersen L. A. H. et al. Mixing and mass transfer in a pilot scale U-loop bioreactor //Biotechnology and Bioengineering. – 2017. – T. 114. – №. 2. – C. 344-354.
348. Hassan H. et al. Drying strategies for maximizing polyhydroxybutyrate recovery from microalgae cultivated in a raceway pond: A comparative study //Environmental Pollution. – 2024. – T. 361. – C. 124821.
349. Magomnang J. et al. Bioplastic production potential, growth optimization, and biokinetics of methane-oxidizing bacterium *Methylosinus* sp. strain C49 //Bioresource Technology. – 2025. – C. 133075.
350. Duan C., Luo M., Xing X. High-rate conversion of methane to methanol by *Methylosinus trichosporium* OB3b //Bioresource technology. – 2011. – T. 102. – №. 15. – C. 7349-7353.
351. Manikandan N. A., Pakshirajan K., Pugazhenth G. Techno-economic assessment of a sustainable and cost-effective bioprocess for large scale production of polyhydroxybutyrate //Chemosphere. – 2021. – T. 284. – C. 131371.
352. Levett I. et al. Techno-economic assessment of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from methane—The case for thermophilic bioprocessing //Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2016. – T. 4. – №. 4. – C. 3724-3733.
353. de Oliveira Santos W. et al. Analysis of Poly-3-Hydroxybutyrate production with different microorganisms using the dynamic simulations for evaluation of economic Potential Approach //ACS omega. – 2025. – T. 10. – №. 26. – C. 27756-27774.



ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ  
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР "ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ  
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ" РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
Коллекция уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных  
физиологических групп биотехнологического значения (Коллекция UNIQEM)

Адрес: Проспект 60-летия Октября 7/2, Москва 117312 Россия, e-mail: uniqem@fbras.ru

#### СЕРТИФИКАТ О НАЦИОНАЛЬНОМ ПАТЕНТНОМ ДЕПОНИРОВАНИИ

Депозитор: д.т.н. Калёнов С.В., Сачавский А.А.

Штамм *Methylococcus capsulatus* KS-24 депонирован в ЦКП «Коллекция уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных физиологических групп биотехнологического значения» («Коллекция UNIQEM») на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН) в связи с подачей заявки на оформление национального патента

Регистрационный номер, присвоенный штамму: UQM 42109.

Продукты, продуцируемые штаммом (область применения штамма): продуцент биомассы с высоким содержанием белка.

К сертификату о депонировании прилагается паспорт с научным описанием штамма и таксономическим определением.

Дата национального патентного депонирования: 27.05.2025.

Заместитель директора по научной работе  
Федерального исследовательского центра  
"Фундаментальные основы биотехнологий"  
Российской академии наук

д.б.н. Пименов Н.В.

Руководитель  
"Коллекции UNIQEM"



д.б.н. Мулюкин А.Л.

УТВЕРЖДАЮ



Генеральный директор  
ООО "Гапрохим-БТ"  
канд. тех. наук

Н.А. Суясов

» апреля 2023 «

## АКТ

о внедрении результатов кандидатской диссертационной работы

Сачавского Александра Александровича

Комиссия в составе:

председатель: Суясов Н.А. – генеральный директор ООО "Гапрохим-БТ"

члены комиссии:

Парижева Р.А. – главный бухгалтер ООО "Гапрохим-БТ";

Игнашкова Д.А. – заведующий отделом культивирования.

составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Сачавского А.А. «Управляемое культивирование сообществ метаноокисляющих микроорганизмов», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук, использованы в научно-исследовательской деятельности по конструированию сообществ метаноокисляющих организмов, а также дальнейшей оптимизации ростовой среды для их культивирования на пилотных установках.

Подход, изложенные в кандидатской диссертации, позволили повысить продуктивность культивирования сообществ метаноокисляющих микроорганизмов на основе штамма *Methylococcus capsulatus*, а также увеличить содержание целевого продукта в получаемой биомассе.

Председатель комиссии:

Генеральный директор

Суясов А.А.

Члены комиссии:

Главный бухгалтер

ООО "Гапрохим-БТ"

Парижева Р.А.

Заведующий отделом культивирования

Игнашкова Д.А.

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ГАПРОХИМ-БТ"

(ООО "Гапрохим-БТ")



Утверждаю  
Генеральный директор  
ООО "Гапрохим-БТ",  
Исаев С.И. (подпись)  
инженер тех. наук

Суюсов Н.А.  
«26» апреля 2023 г.

#### ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕТ

НА ПОЛУЧЕНИЕ БИОМАССЫ *METHYLOCOCCUS CAPSULATUS* В СОСТАВЕ  
СИНТЕТИЧЕСКОГО МЕТАНОКИСЛЯЮЩЕГО СООБЩЕСТВА

Согласовано

Заведующий отделом культивирования  
ООО "Гапрохим-БТ",

(подпись) Игнашкова Д.А.  
«26» апреля 2023 г.

Москва

2023

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский химико-технологический университет  
имени Д.И. Менделеева» (РХТУ им. Д.И. Менделеева)

**ПРИКАЗ**

«27» марта 2026 г.

№ 63 ОЦ

Москва

О правовой охране РИД в качестве секрета  
производства (ноу-хау)

На основании протокола Комиссии по интеллектуальной собственности  
№ 01/26 от 17.03.2026 года

**ПРИКАЗЫВАЮ:**

1. Признать сведения в отношении РИД «Метод направленного конструирования синтетических метанотрофных сообществ», содержащиеся на материальном носителе (флеш-накопитель, инвентарный № 01/26) в качестве секрета производства (ноу-хау), правообладателем которого является РХТУ им. Д.И. Менделеева.

2. Ввести в отношении сведений о РИД «Метод направленного конструирования синтетических метанотрофных сообществ» режим коммерческой тайны.

3. Главному бухгалтеру Т.А. Коробовой обеспечить принятие к бухгалтерскому учету права на секрет производства (ноу-хау) «Метод направленного конструирования синтетических метанотрофных сообществ» в качестве нематериального актива с соблюдением законодательно установленных требований.

4. Ответственным лицом за сохранение режима конфиденциальных сведений назначить Панфилова Виктора Ивановича - Заведующего кафедрой биотехнологии РХТУ им. Менделеева.

5. Начальнику Общего отдела А.Г. Нестеровой довести данный приказ до сведения должностных лиц РХТУ им. Д.И. Менделеева в части их касающейся.

6. Контроль за исполнением настоящего приказа оставляю за собой.

И.о. первого проректора



Р.А. Козловский