

На правах рукописи

Сулейманов Руслан Закиевич

**ПОИСК И МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ НОВЫХ
МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ КАК ПРОДУЦЕНТОВ
КОРМОВОГО БЕЛКА ДЛЯ АКВАКУЛЬТУРЫ**

Специальность – 1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Москва - 2025

Работа выполнена в лаборатории молекулярной экологии и филогеномики бактерий Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Научный руководитель:

Дедыш Светлана Николаевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией молекулярной экологии и филогеномики бактерий Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Грабович Маргарита Юрьевна, доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки медико-биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет».

Акбердин Илья Ринатович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, направление «Вычислительная биология».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Защита диссертации состоится 05 июня 2025 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН: http://www.fbras.ru/materialyi-k-zashhite-dissertatsii_suleymanov-r-z.html.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2025 года

**Ученый секретарь
диссертационного совета**

доктор биологических наук
Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Аэробные метанотрофные бактерии – это группа прокариот, специализированных на использовании метана (CH_4) в качестве источника углерода и энергии (Hanson and Hanson, 1996; Гальченко, 2001; Троценко и Хмеленина, 2008; Trotsenko and Murrell, 2008). Описанное к настоящему времени разнообразие метанотрофных бактерий включает представителей около трех десятков родов, принадлежащих к классам *Gamma*proteobacteria (метанотрофы I типа) и *Alphaproteobacteria* (метанотрофы II типа), а также несколько родов метанотрофов филума *Verrucomicrobiota* (Dedysh and Knief, 2018). Метанотрофы населяют широкий спектр местообитаний, в которых одновременно доступны метан и кислород. Биологическое окисление метана является важным звеном глобального цикла CH_4 , а также и глобального круговорота углерода в природе (Conrad, 2009). Метанотрофы, однако, имеют также и значительный биотехнологический потенциал (Гальченко, 2001; Троценко и Хмеленина, 2008; Kalyuzhnaya *et al.*, 2020). Микробиологическая конверсия метана, являющегося доступным и сравнительно дешевым углеродным сырьем, обеспечивает доступ к производству продуктов с добавленной стоимостью (Strong *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2022; Le and Lee, 2023; Nizovtseva *et al.*, 2024) и находится на пороге крупномасштабной коммерциализации (Ritala *et al.*, 2009; Kalyuzhnaya *et al.*, 2020; García Martínez *et al.*, 2022). Одна из ключевых особенностей технологии – многократное снижение потребления водных и земельных ресурсов по сравнению с производством животного и растительного белка. Большие запасы природного газа в России и его хорошая транспортабельность предполагают высокую перспективность биотехнологий, основанных на использовании метанотрофных бактерий.

Впервые интерес к развитию подобных биотехнологий появился в 70-е годы XX века. Было показано, что метанотрофные бактерии могут быть источником биопротеина, синтезируемого на основе метана (Григорян, Горская, 1970). Промышленное производство кормового белка (Гаприна) из природного газа с использованием термотолерантного метанотрофа *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 было реализовано в СССР в середине 1980-х годов. Позднее, аналогичные производства кормового белка из природного газа были налажены в Норвегии и Дании. В качестве метанотрофа-продуцента в этих производствах используют хорошо изученный штамм *Methylococcus capsulatus* Bath (Vothe *et al.*, 2002).

По составу и количеству незаменимых аминокислот биомасса метанотрофов сопоставима с рыбной и соевой мукой и имеет определенные преимущества относительно продуктов растительного происхождения (Coty, 1969). Особенно выделяются метанотрофы класса *Gamma*proteobacteria, имеющие наиболее высокое содержание белка и незаменимых аминокислот (Плясов, 1988). При этом уровень нуклеиновых кислот варьирует от 11.5 до 15.5%, а перевариваемость биомассы

составляет 85-95% для метанотрофов класса *Gamma*proteobacteria и 75% для представителей *Alphaproteobacteria* (Четина и Троценко, 1984).

Недостаток кормов собственного производства и практически полная зависимость от импортных кормов являются одними из ключевых проблем развития отечественной отрасли аквакультуры (Головина и др., 2019). Реализация Государственной программы РФ «Развитие рыбохозяйственного комплекса» предусматривает ежегодное обеспечение прироста продукции аквакультуры на уровне не ниже 6 – 10% в год. Решение этой задачи предполагает развитие высокоэффективных аква-хозяйств, опирающихся на современные технологии производства кормов и наличие широкой линейки штаммов-продуцентов кормового белка. Наиболее востребованы в технологии производства биопротеина из метана термотолерантные или умеренно термофильные метанотрофы, обладающие высокими скоростями роста. Число таких штаммов ограничено, и все они являются представителями рода *Methylococcus*: *Mc. capsulatus* CONCEPT-8, ВКМ В-3289Д (патент РФ №2706074); *Mc. capsulatus* ГБС-15, ВКПМ В-12549 (патент РФ №2717991); *Mc. capsulatus* VS1, ВКМ В-3482Д (патент РФ №2765994); *Mc. capsulatus* ВF19-07, ВКПМ В-13764 (патент РФ №2745093); *Mc. capsulatus* ЛБТИ 028, ВКПМ В-13479 (патент РФ № 2728345). Введенный в России ГОСТ Р № 71301-2024 на белковую кормовую добавку на основе метанооксиляющих бактерий (Гаприн) предполагает применение именно штаммов *Mc. capsulatus*.

Метанотрофы рода *Methylococcus*, однако, не способны к синтезу каротиноидов, являющихся важным компонентом кормов для аквакультуры. Поиск быстрорастущих метанотрофов, синтезирующих каротиноиды, таким образом, является весьма актуальным. Также важным является и тот факт, что для культивирования ныне используемых штаммов-продуцентов требуется пресная вода. В контексте тенденции сокращения запасов пресной воды в мире особый интерес представляет и поиск метанотрофов-продуцентов, способных расти на морской воде.

Таким образом, поиск альтернативных продуцентов с улучшенными свойствами является одной из актуальных задач в биотехнологии получения кормового белка на основе метанотрофных микроорганизмов. Одним из необходимых условий выбора метанотрофного штамма-продуцента является анализ последовательности его генома, что позволяет получить информацию о метаболическом потенциале микроорганизма и открывает возможности его оптимизации с помощью подходов метаболической инженерии.

Цель и задачи исследования.

Целью работы был направленный поиск новых природных быстрорастущих штаммов метанотрофных бактерий, как продуцентов кормового белка на основе метана для аквакультуры, а также оптимизация их метаболизма с помощью подходов генной инженерии.

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

1. Выделение и отбор новых штаммов метанотрофов рода *Methylococcus*, демонстрирующих высокие скорости роста на метане и высокое содержание белка в клетках.
2. Направленный поиск штаммов быстрорастущих метанотрофов, синтезирующих каротиноиды.
3. Выделение метанотрофов-продуцентов, способных расти на морской воде.
4. Оптимизация продукционных характеристик новых штаммов *Methylococcus capsulatus* на основе анализа геномов и метаболической инженерии.

Научная новизна. Из природных и антропогенных местообитаний с высокими концентрациями метана получен спектр новых изолятов метанотрофных бактерий родов *Methylococcus*, *Methylomonas* и *Methylomarinum*. Ростовые и продукционные характеристики этих изолятов определены как с использованием периодических культур, так и непрерывного культивирования в биореакторе. Полные последовательности геномов всех новых штаммов определены и депонированы в GenBank, что позволило существенно пополнить число ныне доступных геномов метанотрофов высокого качества сборки. Показано, что применение методов метаболической инженерии позволяет получить штаммы *Methylococcus* с улучшенными биотехнологическими характеристиками.

Описаны два новых вида метанотрофов рода *Methylomonas* – *Mm. rapida* и “*Mm. montana*”. Показан высокий потенциал *Mm. rapida* для получения кормового белка, обогащенного каротиноидами. Описанный в работе “*Mm. montana*” является первым и пока единственным видом рода *Methylomonas*, представители которого не синтезируют пигменты. Описан новый вид галофильных метанотрофов рода *Methylomarinum*, “*Mr. roseum*”, способный расти на средах, сходных по составу с морской водой. Типовые штаммы новых видов метанотрофов депонированы в международных коллекциях микроорганизмов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в работе новые штаммы метанотрофных бактерий родов *Methylococcus*, *Methylomonas* и *Methylomarinum* имеют высокий потенциал для использования в качестве продуцентов кормового белка из метана. Ростовые характеристики штаммов рода *Methylococcus*, KN2 и MIR, не уступают таковым у известных штаммов-продуцентов *Mc. capsulatus* Bath и *Mc. capsulatus* ВСБ-874. Полученный в работе штамм *Mc. capsulatus* MIR с делециями генов гликогенсинтаз *glgA1* и *glgA2* имеет сокращенную лаг-фазу с быстрым переходом к логарифмической фазе роста, что экономически выгодно для биотехнологических процессов с использованием накопительного и отъемно-доливного режимов.

Новые штаммы рода *Methylomonas* способны продуцировать обогащенный каротиноидами биопротеин, который может быть востребован на рынке кормов для аквакультуры.

Изолят рода *Methylomarinum* может найти применение в технологии получения биопротеина на морской воде или грунтовых водах повышенной солености, что актуально для производств, расположенных в регионах с дефицитом пресной воды.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Экосистемы с высокими концентрациями метана являются богатым источником новых штаммов метанотрофов рода *Methylococcus*, пригодных для использования в биотехнологии получения кормового белка из природного газа.
2. Быстрорастущие штаммы пигментированных метанотрофных бактерий рода *Methylomonas* являются перспективными продуцентами кормового белка, обогащенного каротиноидами.
3. Галофильные метанотрофные бактерии рода *Methylomarinum* могут быть использованы в биотехнологии получения кормового белка на морской воде или грунтовых водах повышенной солености.
4. Редактирование геномов *Methylococcus capsulatus* путем делеции генов гликогенсинтаз позволяет предотвратить сток углерода и энергии штаммом-продуцентом на синтез запасных соединений.

Личный вклад автора. Данные, представленные в данной работе, были получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах исследований: планировании, проведении эксперимента, сборе и обработке данных, оформлении результатов и подготовке их к публикации. Личный вклад автора заключался в получении изолятов метанотрофных бактерий, их идентификации, анализе физиологических и ростовых характеристик, подготовке описаний новых видов метанотрофов и депонировании типовых штаммов в международных коллекциях микроорганизмов. Автор принимал непосредственное участие в работах по редактированию генома *Mc. capsulatus* MIR путем делеции генов *glgA1* и *glgA2*. Эксперименты по культивированию новых штаммов метанотрофов и их мутантов в биореакторе, с определением скоростей роста и оценкой продукционных характеристик были также проведены автором работы.

Степень достоверности полученных результатов

Представленные в работе данные были получены при использовании современных методов и оборудования. Данные подтверждены с использованием современных методов статистической обработки и оценки погрешности результатов.

Публикации и апробация работы. Материалы диссертации содержатся в 12 печатных работах: 9 экспериментальных статьях и 3 тезисах конференций. Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях и конгрессах: 1) XIII

Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 16-18 ноября 2022 г.); 2) III Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 5-7 декабря 2023 г.).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, заключения и выводов, изложенных на 130 страницах, включая 11 таблиц, 28 рисунков и списка литературы из 198 наименований, из них 14 – на русском и 184 – на английском языке.

Методы и методология исследования. Диссертационная работа выполнена с применением методов классической и молекулярной микробиологии, таких как получение чистых культур микроорганизмов и их культивирование, анализ физиологии и ростовых характеристик полученных изолятов, выделение ДНК, ПЦР, сравнительный анализ генов 16S рРНК и геномов, клонирование генов, электрофорез нуклеиновых кислот, получение штаммов с делециями в целевых генах. Работа выполнена с использованием современного сертифицированного оборудования.

Место проведения работы и благодарности. Работа была выполнена в лаборатории Молекулярной экологии и филогеномики бактерий ФИЦ Биотехнологии РАН с 2020 по 2025 годы. Автор выражает благодарность всему коллективу лаборатории за всестороннюю помощь в выполнении работы, в особенности к.б.н. И.Ю. Ошкину и к.б.н. А.А. Ивановой за анализ геномов полученных изолятов метанотрофных бактерий. Штаммы KN2, ВН, Ю1 и Мс7 были выделены совместно с к.б.н. И.Ю. Ошкиным и к.б.н. О.В. Даниловой. Часть работы по редактированию геномов изолятов метанотрофов была выполнена автором в лаборатории Радиоактивных изотопов ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино. Автор выражает благодарность заведующему этой лабораторией к.б.н. И.И. Мустахимову, а также ее сотрудникам к.б.н. О.Н. Розовой, д.б.н. Хмелениной и в особенности к.б.н. С.Ю. Буту за помощь в выполнении этого блока исследований. Автор также благодарит к.б.н. Н.Е. Сузину (ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино) за исследование ультратонкого строения клеток метанотрофов, к.б.н. А.А. Ашихмина (ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино) за анализ состава каротиноидов изолятов и Е.О. Ландесман (ФИЦ Биотехнологии РАН) за определение содержания белка в биомассе метанотрофов. Глубокая признательность выражается научному руководителю, зав. лаб., д.б.н. С.Н. Дедыш за неоценимую помощь при проведении диссертационного исследования.

Работа выполнена в рамках проекта НЦМУ «Агротехнологии будущего» и проекта Программы "Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Получение и идентификация изолятов метанотрофных бактерий. Для получения накопительных метанооксиляющих культур были использованы образцы природных и антропогенных местообитаний с высокой концентрацией CH_4 , таких как осадки пресноводных и соленых водоемов, активный ил очистных сооружений и покрывающие почвы полигонов твердых бытовых отходов. Для выделения пресноводных метанотрофов использовали жидкую среду dNMS, содержащую (г л^{-1}): KNO_3 – 0.4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.08; с добавлением 1% (об./об.) 200 мМ фосфатного буфера (рН 6.3) и 0.1% (об./об.) раствора микроэлементов для метанотрофов (Гальченко, 2001) следующего состава (г л^{-1}): ЭДТА – 5, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.03, $\text{CoCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0.2, 10 $\text{CuCl}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.02, Na_2MoO_4 – 0.03; H_3BO_3 – 0.3. Для выделения галофильных метанотрофов использовали среду MOR, содержащую (г л^{-1}): NH_4NO_3 – 0.6; KCl – 0.5; $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$ – 2.85; NaCl – 17; H_3BO_3 – 0.018; NaHCO_3 – 0.15; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.77; $\text{MgCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 7.47; с добавлением 1% (об./об.) 200 мМ фосфатного буфера (рН 6.8-7) и 0.2% (об./об.) вышеуказанного раствора микроэлементов. В газовую фазу инкубационных флаконов вводили метан (20-30 об. %). Культивирование проводили в шейкерах-инкубаторах Biosan ES-20/60 (Латвия) при 150 об/мин в диапазоне температур от 30 до 50°C. Развитие метанотрофов прослеживали с помощью фазово-контрастной микроскопии на микроскопе Zeiss AxioPlan 2 (Йена, Германия). Изоляты метанотрофных бактерий получали рассевом суспензий накопительных культур на агаризованные варианты соответствующих сред с последующим отбором колоний и очисткой полученных изолятов с помощью многократных серий предельных разведений на жидких средах. Идентификацию изолятов проводили путем анализа ПЦР-амплифицированных последовательностей генов 16S рРНК или *pmoA* с использованием пар праймеров 9F/1492r и A189f/A682r, соответственно (Weisburg *et al.*, 1991; Holmes *et al.*, 1995).

Анализ ростовых характеристик. Анализ оптимальных значений температуры и рН роста проводили в диапазонах 4-55°C и 5.0-8.0, соответственно. Культуры, показавшие наибольшие скорости роста, были отобраны для дальнейшей работы. Определение оптимального содержания NaCl в среде культивирования галотолерантного метанотрофа рода *Methylobacterium*, штамма Ch1-1, проводили в диапазоне 0-12% (вес/об.). Для оптимизации состава среды анализировали рост штамма Ch1-1 на средах MOR, MJ (Hirayama *et al.*, 2013) и ряде модификаций последней с общим содержанием солей в диапазоне 25-50 г л^{-1} . Рост метанотрофов оценивали путем измерений оптической плотности культур каждые два часа на

спектрофотометре Eppendorf Biophotometr AG (Германия). Все измерения производили в трехкратной повторности.

Экстракция тотальной ДНК и анализ геномов. Экстракцию тотальной ДНК изолятов метанотрофов проводили по стандартному протоколу с использованием СТАВ и фенол-хлороформа (Wilson, 2001). Набор NEBNext ultra II DNA Library kit использовали для подготовки библиотек к секвенированию, согласно рекомендациям производителя (New England BioLabs, Великобритания). Нуклеотидные последовательности геномов определяли с использованием платформ фирм Illumina и Oxford Nanopore. Гибридная сборка коротких и длинных прочтений была выполнена с помощью программы Unicycler (Wick *et al.*, 2017). Аннотацию полученных геномных последовательностей выполняли с помощью программы Prokka (Seemann, 2014).

Нокаут генов гликогенсинтаз *glgA1* и *glgA2* штамма *Methylococcus capsulatus* MIR проводили методом гомологичной рекомбинации с использованием штаммов-посредников: *Escherichia coli* Top10 использовали для высокоэффективного клонирования и размножения плазмидной ДНК; штамм *E. coli* S17-1 применяли для переноса плазмидной ДНК в клетки метанотрофа с помощью конъюгации. Целевой организм – *Mc. capsulatus* MIR – культивировали на минеральной агаризованной среде «П» (Гальченко, 2001). Штаммы *E. coli* культивировали на жидкой или агаризованной среде LB. Двойную гомологичную рекомбинацию проводили на основе суицидального плазмидного вектора pK18mob (Schäfer *et al.*, 1994). Для этого были сконструированы два вектора с клонированными фланкирующими последовательностями соответствующего гена гликогенсинтазы. Фланкирующие последовательности были амплифицированы из геномной ДНК *Mc. capsulatus* MIR, между которыми в плазмиде клонировали кассету устойчивости к маркерному селективному антибиотику – гентамицину или спектиномицину. Полученные рекомбинантные плазмиды pK18*glgA1*-Gm и pK18*glgA2*-Sp вносили от донора *E. coli* S17-1 к реципиенту *Mc. capsulatus* MIR для получения штамма с делецией одного из генов гликогенсинтаз. Штамм с делецией двух генов гликогенсинтаз был получен с.н.с. ФИЦ ПНЦБИ РАН лаборатории радиоактивных изотопов С.Ю. Бутом. Трансконъюганты отбирали по устойчивости к селективным антибиотикам и чувствительности к канамицину.

Культивирование в опытном биореакторе с рабочим объемом 1 л (GPC BIO, Франция) проводили для оценки продукционных и ростовых характеристик наиболее перспективных изолятов и штаммов-мутантов. Культивирование пресноводных метанотрофов осуществляли на среде следующего состава (г л⁻¹): (NH₄)₂SO₄ – 0.2; KCl – 0.125; MgSO₄ – 0.125; H₃PO₄ (85%) – 250 мкл л⁻¹ с добавлением 0.2% (об./об.) вышеуказанного раствора микроэлементов. Для культивирования галофильных метанотрофов использовали описанную выше среду MOR, в которой фосфатный буфер был заменен на H₃PO₄ (85%) в количестве 250 мкл л⁻¹. Для приготовления сред

использовали водопроводную воду. Для достижения нужного значения рН (6.3-7.0) производили титрование 0.5% раствором NH_4OH , который также служил дополнительным источником азота. Рабочие параметры биореактора, в зависимости от культивируемого штамма, были следующими: рН – 6.3-7.0; обороты мешалки – 1000 об./мин.; температура – 30-48°C; начальный расход газовой смеси в соотношении 1:1, а именно 6000 $\text{см}^3 \text{ч}^{-1}$ природного газа и 6000 $\text{см}^3 \text{ч}^{-1}$ воздуха, который увеличивали до 3:1 (воздух:метан) в процессе культивирования. Динамику роста прослеживали путем оценки оптической плотности (OD_{600}) на спектрофотометре Spectroquant Prove 300, Merck, Германия.

Анализ биомассы исследуемых штаммов. Для определения абсолютно сухого веса (АСВ) клеточной биомассы культивируемых в ферментере штаммов отбирали аликвоту культуры объемом 50 мл при OD_{600} 10, клетки осаждали центрифугированием (центрифуга Eppendorf 5804, Германия) при 12000 g 10 минут, замораживали при -76°C в течении часа, а затем лиофилизировали. Вес сухой биомассы определяли на аналитических весах и пересчитывали на литр культуры (мг л^{-1}). Концентрацию белка в лиофилизированной биомассе определяли по методу Кьельдаля (АОАС, 1990) с помощью анализатора Кьельдаля (FOSS, Швеция). Анализ содержания гликогена в биомассе проводили при помощи метода с антроновым реактивом (But *et al.*, 2020). Оптическую плотность измеряли при длине волны 620 нм (Genesys 50, Thermoscientific, США).

Таксономическое описание полученных в ходе работы новых видов метанотрофов проводили путем определения морфологических, физиологических и генотипических характеристик изолятов в соответствии с правилами Международного комитета по систематике бактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Поиск новых быстрорастущих представителей рода *Methylococcus*

В результате работ по получению накопительных метанооксиляющих культур микроорганизмов и выделению метанотрофных бактерий из активного ила очистных сооружений, осадков пресноводных водоемов и покрывающих почв полигона ТБО были получены пять изолятов термотолерантных метанотрофных бактерий – штаммы IO1, KN2 MIR, ВН и Мс7 (Таблица 1). Идентификация изолятов с помощью анализа последовательности гена 16S рРНК подтвердила их принадлежность к роду *Methylococcus*. Изоляты ВН, MIR, IO1 и KN2 обнаружили наибольшее сходство последовательностей генов 16S рРНК с *Ms. capulatus* Bath (99.02-99.97%). Штамм Мс7, полученный из образца почвы ТБО, продемонстрировал наиболее высокое сходство последовательности гена 16S рРНК (98.56%) с таковой у *Ms. geothermalis* IM1^T.

Таблица 1 – Источники выделения и некоторые характеристики новых изолятов рода *Methylococcus*, полученных в настоящей работе

Штамм	Источник выделения	Размер клеток, мкм	Диапазон Т, °С (оптимум)	Диапазон рН (оптимум)	Скорость роста, периодическая культура / биореактор, ч ⁻¹
Ю01	Активный ил, Москва	1.14±0.02	28-52 (48)	5.5-7.5 (6.5)	0.19/0.26
KN2	Активный ил, Москва	1.12±0.03	25-53 (48-50)	4.6-8.5 (6.2)	0.22/0.30
MIR	Активный ил, Иркутск	1.12±0.02	25-50 (42)	5.5-7.5 (6.3)	0.3/0.32
ВН	Озерный ил, Краснодарский край	1.12±0.02	25-52 (42)	5.5-8.0 (7.0)	0.18/0.28
Mc7	Почва ТБО, Ханты-Мансийск	1.59±0.03	28-53 (40)	5.5-7.5 (6.8)	0.23/0.27

Размеры геномов изолятов составили от 3.2 млн. п.о. у штамма ВН до 4.0 млн. п.о. у штамма Mc7; содержание пар Г+Ц - от 63.3 до 63.6% (Таблица 2). Каждый геном содержал две копии рРНК оперона, две копии оперона мембранной метанмонооксигеназы (мММО) и одну копию оперона растворимой ММО (рММО). Количество белок-кодирующих генов варьировало от 2912 до 3752.

Таблица 2 – Характеристики геномов изолятов, полученных в настоящей работе, в сравнении с таковыми у *Mc. capsulatus* Bath

Штаммы	MIR	KN2	ВН	Ю01	Mc7	Bath
Размер генома, млн. п.о.	3.2	3.6	3.2	3.3	4.0	3.3
Г+Ц в ДНК, %	63.50	63.49	63.52	63.49	63.44	63.60
Число белок-кодирующих генов	2872	3289	2912	3008	3752	3043
тРНК	47	48	50	50	48	49
5S, 16S, 23S	2, 2, 2	2, 2, 2	2, 2, 2	2, 2, 2	2, 2, 2	2, 2, 2
мММО	2	2	2	2	2	2
рММО	1	1	1	1	1	1

Последовательности геномов были депонированы в GenBank под номерами: CP079095 (Mc7); CP079096 (BH); CP079097 (KN2); CP079098 (IO1); CP097161 (MIR).

Значения сходства нуклеотидных последовательностей геномов (average nucleotide identity, ANI), рассчитанные для изолятов IO1, KN2, MIR, BH и *Mc. capsulatus* Bath, были в пределах 98.75-99.73%, что указывает на принадлежность этих организмов к одному виду, поскольку внутривидовой уровень определен на уровне $\geq 95\%$ ANI (Konstantinidis and Tiedje, 2005; Goris *et al.*, 2007). Величина ANI для штамма Mc7 и *Mc. geothermalis* IM1^T составила 88.56%. Таким образом, штамм Mc7 потенциально представляет новый вид рода *Methylococcus*.

Особое внимание было уделено анализу удельных скоростей роста новых штаммов на метане, результаты которого продемонстрированы на рисунке 1. Все культуры показали высокие удельные скорости роста (μ) от 0.18 до 0.32 ч⁻¹ при температурах (от 40 до 50°C), что сопоставимо с таковыми у промышленных штаммов метанотрофов (Рисунок 1).

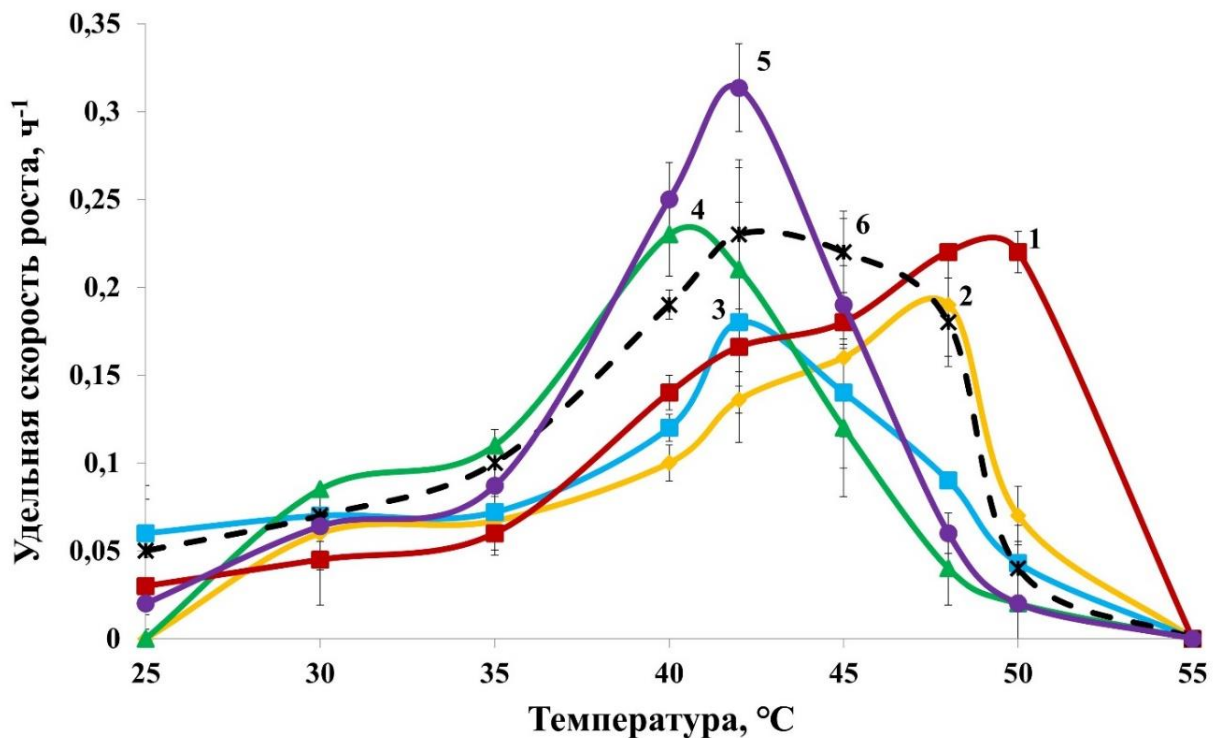


Рисунок 1. Удельные скорости роста новых штаммов рода *Methylococcus* на метане в зависимости от температуры. В качестве эталонного организма использовали *Mc. capsulatus* Bath. Обозначения штаммов: (1) штамм KN2; (2) штамм IO1; (3) штамм BH; (4) штамм Mc7; (5) штамм MIR; (6) *Mc. capsulatus* Bath. Цитировано с изменениями по Oshkin *et al.*, 2021.

Таким образом, были получены и охарактеризованы 4 новых термотолерантных штамма вида *Mc. capsulatus* – IO1, KN2, MIR, BH, обладающие высокими ростовыми характеристиками, а также штамм Mc7 – потенциально представляющий новый вид рода *Methylococcus*.

2. Получение быстрорастущих представителей рода *Methylobionas*

Помимо представителей рода *Methylococcus* биотехнологически значимыми метанотрофами считаются представители рода *Methylobionas*, способные к синтезу каротиноидов. Охарактеризованные в работе культуры метанотрофных бактерий рода *Methylobionas* были получены из образцов донных отложений пресноводных водоемов (Таблица 3). Из образца ила безымянного пруда Краснодарского края было получено три штамма представителей рода *Methylobionas*, при этом для всех из них ближайшим типовым штаммом являлся *Mm. koyamae* Fw12E-Y^T с уровнем сходства последовательностей генов 16S рРНК 97.91% (для штамма **MV1**), 100% (для штамма **MY1**) и 97.16% (для штамма **MP1^T**). Последовательность гена 16S рРНК штамма **MO1**, выделенного из донных отложений Мещерского пруда Москвы, обнаруживала 99.67% сходства с таковой у «*Mm. denitrificans*» FJG1 и 97.32% сходства с *Mm. methanica* MC09. Штамм **MW1^T** был выделен из донных отложений горной реки Хоста, Краснодарский край, и демонстрировал 97.29% сходства последовательностей генов 16S рРНК с типовым штаммом *Mm. methanica* S1^T.

Таблица 3 – Источники выделения и некоторые характеристики полученных штаммов метанотрофов рода *Methylobionas*

Штамм	Источник выделения	Ближайший родственник	Цвет колонии	Размер клетки, мкм	Диапазон температур (опт), °С	Скорость роста, ч ⁻¹
MP1^T	Безымянное озеро, Краснодарский край, Россия (N 44.42°; E 39.18 °)	<i>Mm. koyamae</i> Fw12E-Y ^T	Красный	1.1×2.1	8–45 (35)	0.33
MY1			Желтый	1.5×1.9	8–37 (30)	0.29
MV1			Розовый	0.7×2.2	4–38 (30)	0.25
MO1	Мещерский пруд, Москва, Россия (N 55.67°; E 37.40°)	« <i>Mm. denitrificans</i> » FJG1	Оранжевый	0.9 ×1.3	5–37 (32)	0.22
MW1^T	Река Хоста, Краснодарский край, Россия (N 43.53°; E 39.97°)	<i>Mm. methanica</i> S1 ^T	Белый	0.9×1.5	10–35 (30)	0.13

Геномы изолятов имели размеры от 4.95 млн. п.о. у штамма **MY1** до 5.42 млн. п.о. у штамма **MV1**; содержание Г+Ц-пар в ДНК составляло 51.44-56.16%. Для штамма **MP1^T** было показано наличие четырех копий оперона рРНК, в то время как доступные геномы других представителей рода *Methylobionas* содержали только три копии оперона рРНК. Это коррелировало с высокими скоростями роста штамма **MP1^T**. Каждый геном содержал одну копию кластера генов, кодирующих мММО. Количество белок-кодирующих последовательностей варьировало от 4201 до 4735.

Расчет величин ANI для геномных последовательностей полученных изолятов и таксономически описанных метанотрофов рода *Methylomonas* показал, что только один штамм, MY1, может быть отнесен к известному виду *Mm. koyamae*. Остальные штаммы - MP1^T, MV1, MW1^T и MO1 – представляли новые виды рода *Methylomonas*. Клетки изолятов были представлены короткими подвижными палочками с пигментацией от белой до красной (Рисунок 2А). Каротиноиды были выявлены в экстрактах пигментов всех штаммов, кроме MW1^T, который является исключением из всех ныне охарактеризованных представителей *Methylomonas*. Анализ генома штамма MW1^T показал отсутствие ряда генов синтеза каротиноидов. Во фракции пигментов остальных изолятов преобладали каротиноиды С30. Основным идентифицированным каротиноидом была 4,4'-диаполикопин-4,4'-диевая кислота (Рисунок 2Б).

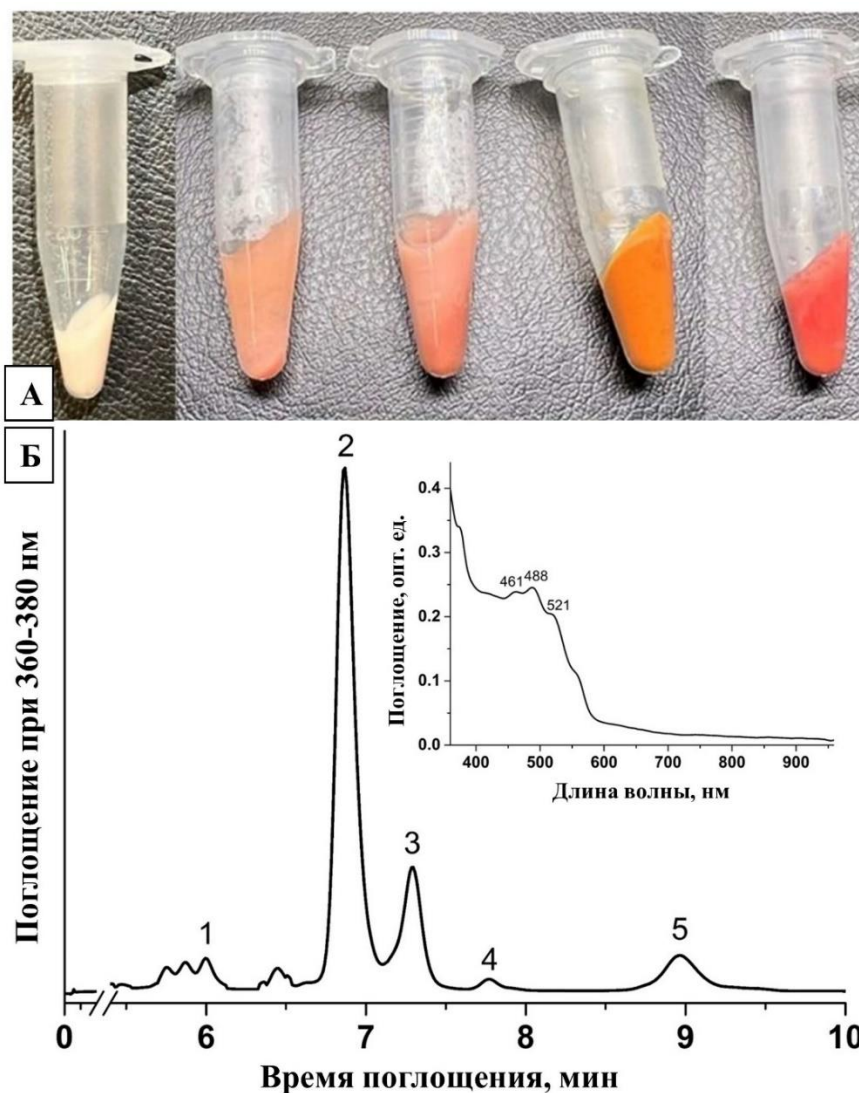


Рисунок 2. Пигментация клеток новых изолятов рода *Methylomonas*. (А) Осажденная биомасса штаммов, слева направо: MW1^T, MV1, MO, MY1 и MP1^T. (Б) ВЭЖХ экстрагированных пигментов штамма MP1^T. Номера пиков: **1** – 4'-апо-3,4-дидегидроликопин (С35); **2** – 4,4'-диаполикопин-4,4'-диевая кислота (С30); **3** – 1,1'-дигидрокси-3,4-дидегидроликопин (С40); **4** – 3,4,3',4' – тетрадегидроликопин (С40); **5** – 4,4'-диаполикопиновая кислота (С30). Вставка: спектр поглощения пигментного экстракта штамма MP1^T в этаноле. Цитировано по Oshkin, Tikhonova, Suleimanov *et al.*, 2023.

Все штаммы демонстрировали оптимальный рост в диапазоне температур 30-35°C. Наиболее широкий ростовой диапазон температур (8-45°C) показал штамм MP1^T, с максимальной скоростью роста 0.33 ч⁻¹ при 35°C. Высокую скорость роста показал также штамм MY1 – 0.29 ч⁻¹ при 30°C. Наименьшую скорость роста – 0.13 ч⁻¹ – демонстрировал штамм MW1^T. Для целей таксономического описания были выбраны штаммы MP1^T и MW1^T. Штамм MP1^T обладал самым высоким температурным оптимумом и высокой скоростью роста, то есть являлся биотехнологически перспективным. Штамм MW1^T был выбран по причине своей исключительности, поскольку не обладал способностью синтезировать каротиноиды. Филогенетическое положение этих штаммов относительно таксономически описанных представителей рода *Methylomonas* показано на рисунке 3.

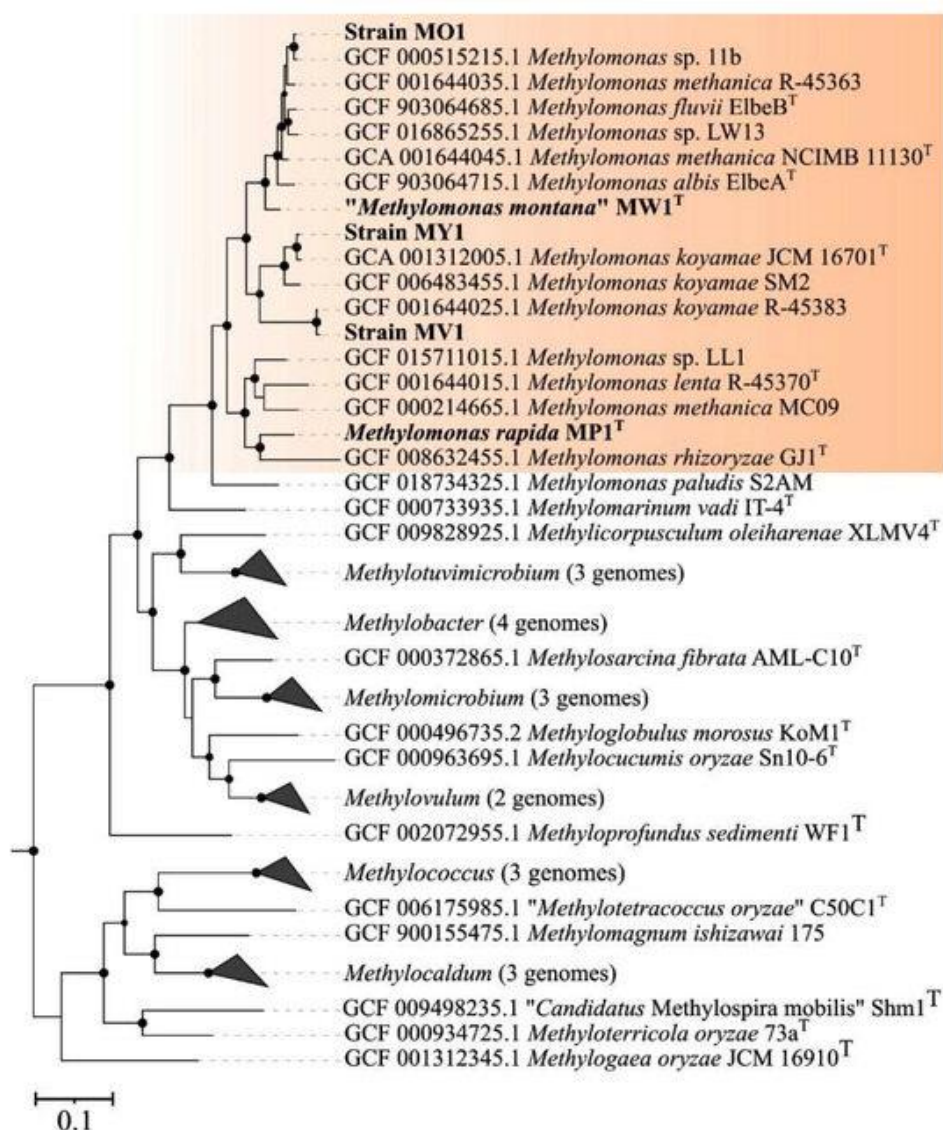


Рисунок 3. Филогеномная дендрограмма, построенная по результатам сравнительного анализа 120 маркерных белков, кодируемых в геномах новых штаммов (выделены жирным шрифтом) и других метанотрофов *Gamma*proteobacteria. Клада рода *Methylomonas* выделена оранжевым цветом. Маркер – 0.1 замена на аминокислотную позицию. Цитировано по Oshkin, Tikhonova, Suleimanov *et al.*, 2023.

Характеристика *Methylomonas rapida* sp. nov. (ra.pi'da. L. fem. adj. *rapida* – быстрая). Колонии от темно-оранжевого до красного цвета. Клетки представлены высокоподвижными короткими палочками шириной 1.10 ± 0.03 мкм и длиной 2.10 ± 0.08 мкм, имеющими один полярный жгутик. Источниками углерода являются метан и метанол. Метанол поддерживает рост в широком диапазоне концентраций, до 5% (об./об.) с оптимумом при 3.0% (об./об.). В качестве источников азота используют нитрат, нитрит, соли аммония и мочевины. Растут в диапазоне pH 5.5-7.8 (оптимум pH 6.3) и температур от 8 до 45°C (оптимум 35°C). NaCl ингибирует рост в концентрации выше 1% (вес/об.). Основные синтезируемые каротиноиды - 4,4'-диапликопин-4,4'-диовая кислота, 1,1'-дигидрокси-3,4-дидегидроликопин и 4,4'-диапликопиновая кислота. Типовой штамм вида - MP1^T (=VKM В-3663^T = КСТС 92586^T) был выделен из донных отложений безымянного озера Краснодарского края, Россия.

Характеристика *Methylomonas montana* sp. nov. (mon.ta'na. L. fem. adj. *montana* – горная).

Одиночные палочковидные подвижные клетки размером $0.9 \pm 0.04 \times 1.5 \pm 0.2$ мкм. Колонии непигментированные, кремово-белого цвета, округлые, выпуклые, слизистые. В жидкой среде рост гомогенный, без образования поверхностных пленок. Облигатные аэробы. Психротолерантные мезофилы и нейтрофилы с оптимумами роста 30-35°C и pH 6.3-7.0. Источниками углерода являются метан и метанол. Метанол поддерживает рост до 3% (об./об.). Не обладают растворимой метанмонооксигеназой. Источниками азота служат соли аммония, нитрат, мочевины, аланин, серин, глутамин, формамид, казаминовые кислоты, пептон и атмосферный азот. NaCl подавляет рост в концентрациях выше 1%. Типовой штамм вида – MW1^T (=VKM В-3737^T = UQM 41536^T) был выделен из донных отложений реки Хоста, Краснодарский край, Россия.

3. Поиск метанотрофных бактерий, способных к росту на морской воде

Образцы донных осадков реки Чернавка в месте ее впадения в гиперсоленое озеро Эльтон, Волгоградская область (N 49.2085; E 46.68024) были использованы для получения изолята метанотрофных бактерий, способных к росту на среде, сходной по составу с морской водой – штамма Ch1-1^T. Идентификация этого изолята с помощью анализа последовательности гена 16S рРНК показала его принадлежность к роду *Methylomarinum* и 97.09 - 97.24% сходства с таксономически описанными представителями *Mr. vadi*, штаммами IT-4^T и T2-1, которые были получены из морских местообитаний (Hirayama *et al.*, 2013). Результаты этого анализа свидетельствовали о том, что штамм Ch1-1^T принадлежит к новому виду рода *Methylomarinum*.

Штамм Ch1-1^T был представлен подвижными палочками размером 0.85 ± 0.05 мкм в ширину и 1.50 ± 0.10 мкм в длину (Рисунок 4А). В жидкой среде культура росла

гомогенно, приобретая со временем лососево-розовую окраску (Рисунок 4Б), поверхностных пленок не образовывала. Клетки размножались бинарным делением и, в отдельных случаях, формировали короткие цепочки до 4-х клеток. Анализ клеток с помощью электронной микроскопии выявил наличие одного полярного жгутика (Рисунок 4В), граммотрицательное строение клеточной стенки и стопки внутрицитоплазматических мембран I типа (Рисунок 4Г).

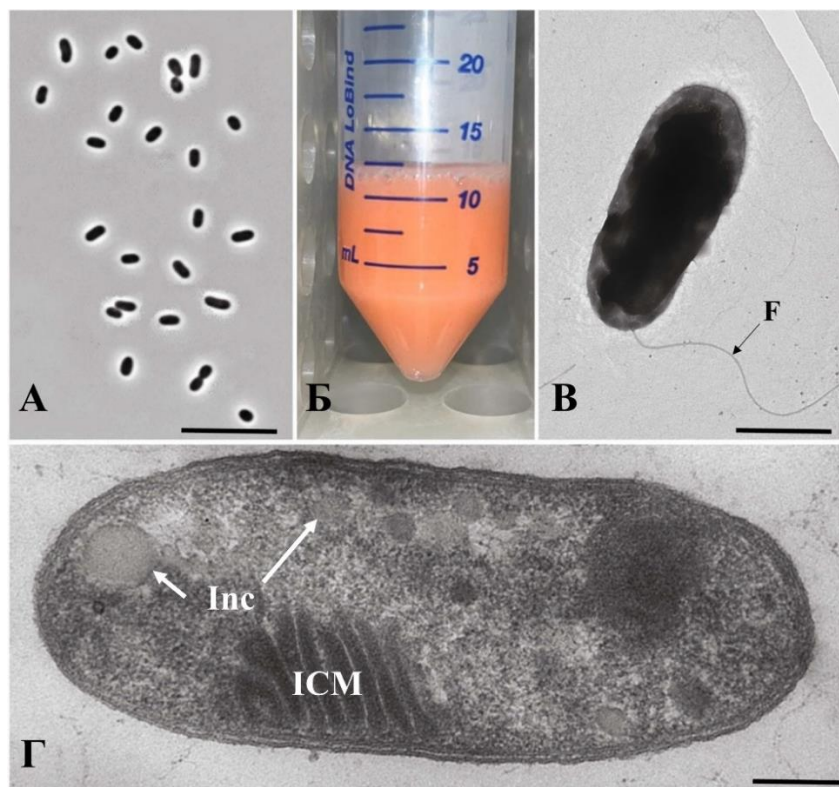


Рисунок 4. Изолят рода *Methylo Marinum*, штамм Ch1-1^T. (А) Фазово-контрастная микрофотография клеток штамма. Маркер, 10 мкм. (Б) Клеточная биомасса штамма, собранная центрифугированием. (В) Клетка штамма с одним полярным жгутиком, негативный контраст. Маркер, 1 мкм. (Г) Ультратонкий срез клетки штамма Ch1-1^T. Маркер, 200 нм. Сокращения: F — жгутик; ICM — внутриклеточные мембраны; Inc – включения. Цитировано по Suleimanov et al., 2024.

Штамм Ch1-1^T рос в узком диапазоне pH от 6.3 до 7.5, с оптимумом при pH 6.8. Температурный диапазон роста составил 5-42°C, с оптимумом при 30-35°C. Ростовый диапазон содержания NaCl в среде составил 0.1-10.0% (вес/об.), с оптимумом в 3.5-4%. Рост в отсутствие NaCl был невозможен. Максимальная удельная скорость роста культуры, достигаемая в оптимальных условиях, составила 0.29 ч⁻¹.

Полная последовательность генома штамма Ch1-1^T составила 4.8 млн. п.о. и содержала три копии оперона рРНК и 46 генов тРНК, 4305 белок-кодирующих генов, включая одну копию кластера генов мММО – *rhoSAB*. Содержание пар Г+Ц в ДНК составило 50.81%. По результатам сравнительного геномного анализа штамм Ch1-1^T образовал общий филогенетический кластер родового уровня с *Mr. vadi* IT-4^T (Hirayama et al., 2013), к которому также принадлежал метагеном метанооксиляющего

эндосимбионта моллюска *Gigantopelta aegis* из гидротермального источника (Рисунок 5). Значение идентичности нуклеотидных последовательностей (ANI) геномов штамма Ch1-1^T и описанного ранее *Mr. vadi* IT-4^T составило 78.8%. На основании генотипических, а также ряда фенотипических отличий (способность к синтезу каротиноидов, более широкие ростовые диапазоны температуры и содержания солей в среде) штамм Ch1-1^T был описан в качестве нового вида рода *Methylomarinum*, *Mr. roseum* sp. nov.

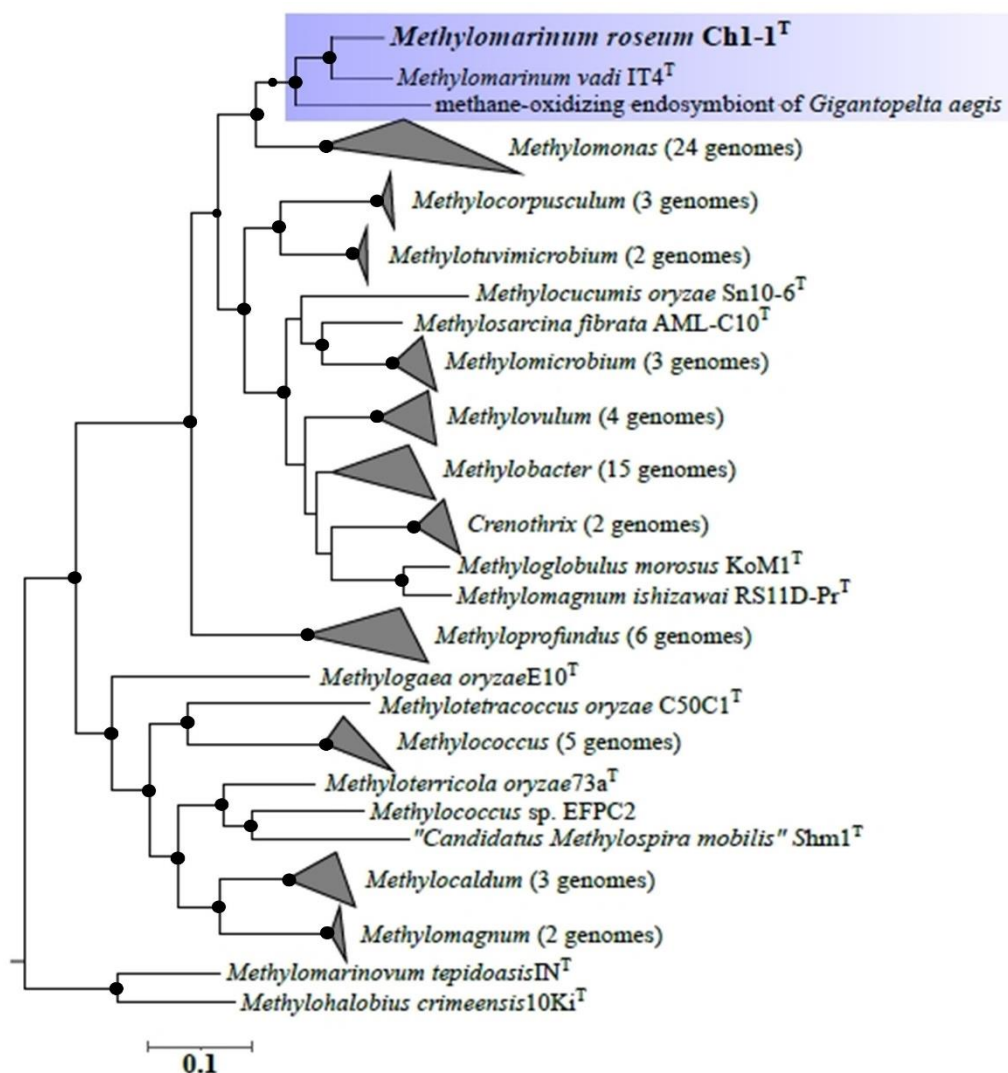


Рисунок 5. Филогеномная дендрограмма, построенная по результатам сравнительного анализа 120 маркерных белков, кодируемых в геномах штамма Ch1-1^T (выделен жирным шрифтом) и других метанотрофных представителей *Gammaproteobacteria*. Корень составлен из 13 геномов представителей рода *Methylocystis*. Филогенетический кластер *Methylomarinum*-подобных метанотрофов выделен синим цветом. Маркер – 0.1 замена на аминокислотную позицию.

Характеристика *Methylomarinum roseum* sp. nov. (ro.se'um. L. neut. adj. roseum – розовый).

Короткие подвижные палочки размером $0.85 \pm 0.05 \times 1.50 \pm 0.10$ мкм, встречающиеся поодиночке, парами или в коротких цепочках до четырех клеток. Подвижность обеспечивается наличием одного полярного жгутика. Жидкие культуры имеют

лососево-розовый цвет. Облигатные аэробы. Термотолерантные мезофилы и нейтрофилы с оптимумом роста при 30-35°C и рН 6.5-6.8. В качестве источника углерода используют метан и метанол. Растворимая метанмонооксигеназа отсутствует. Источниками азота являются нитраты, соли аммония, мочевины, пептон и L-глутамин. Не способны фиксировать атмосферный азот. Рост наблюдается только при наличии в среде NaCl в диапазоне концентраций 0.5-10% (вес/об.) с оптимумом 3.5-4% (вес/об.). Содержание пар Г+Ц в ДНК составляет 50.8%. Типовой штамм вида – Ch1-1^T (=VKM B-3852^T = UQM 41855^T), выделен из донных отложений реки Чернавка в месте ее впадения в гиперсоленое озеро Эльтон, Россия.

При культивировании в биореакторе в фазе накопительного режима *Mr. roseum* Ch1-1^T показал удельную скорость роста 0.155 ч⁻¹; в проточном режиме культура поддерживала устойчивый рост со средней скоростью разбавления 0.14 ч⁻¹. АСВ биомассы составил 3.5 г л⁻¹ при OD₆₀₀ 13 с содержанием белка до 68%.

Все описанные на сегодняшний день метанотрофные бактерии из морских экосистем имеют низкие ростовые характеристики, включая ближайший к штамму Ch1-1^T – *Mr. vadi*, штамм IT-4^T, а потому непригодны для биотехнологических производств. Изолят Ch1-1^T, полученный в настоящей работе, имеет значительный биотехнологический потенциал. Данные о его ростовых характеристиках в условиях непрерывного культивирования на среде, эквивалентной по составу морской воде, являются основой для дальнейших исследований возможности получения кормового белка на природном газе в условиях дефицита пресной воды.

На основании проведенных исследований был произведен отбор новых изолятов метанотрофных бактерий, обладающих наибольшим потенциалом для использования в качестве штаммов-продуцентов кормового белка на метане. Эти штаммы и их ключевые характеристики приведены в Таблице 4.

Таблица 4 – Полученные в работе штаммы метанотрофов, обладающие наибольшим биотехнологическим потенциалом

Род	<i>Methylococcus</i>		<i>Methylomonas</i>	<i>Methylomarinum</i>
Штамм	MIR	KN2	MP1 ^T	Ch1-1 ^T
μ в ферментере, ч ⁻¹	0.25-0.30	0.25-0.30	0.22	0.14
Температурный оптимум, °С	42	45-48	35	35
Содержание белка, %	69.4-73.0	65.6-74.1	66.8-68.9	60.6-67.6
Синтез каротиноидов	–	–	+	+
Рост на морской воде	–	–	–	+

Так как принятый ГОСТ Р № 71301-2024 на производство «Гаприна» предусматривает использование *Ms. capsulatus*, из штаммов, указанных в Таблице 4, для работ по метаболической инженерии был выбран штамм MIR.

4. Редактирование генома *Methylococcus capsulatus* MIR

Запасным веществом, синтезируемым метанотрофами класса *Gammaproteobacteria*, является гликоген. Рабочая гипотеза состояла в том, что отсутствие стока углерода и энергии на синтез запасных веществ будет способствовать увеличению содержания белка в продуцируемой биомассе. Стратегия редактирования генома *Ms. capsulatus* MIR, таким образом, заключалась в делеции генов синтеза гликогена, *glgA1* и *glgA2*, кодирующих две изоформы гликогенсинтаз (Рисунок 6).

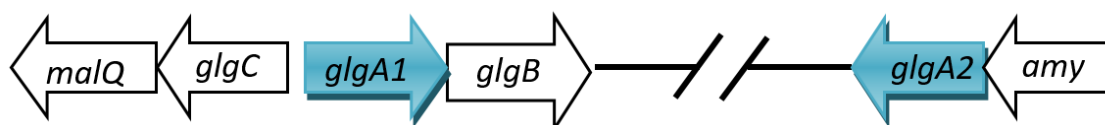


Рисунок 6. Кластеры генов, ответственных за метаболизм гликогена у штамма MIR: *glgA1*, *glgA2* – гены гликогенсинтаз; *glgB* – ген фермента ветвления гликогена; *glgC* – ген АДФ-глюкопирифосфорилазы; *malQ* – ген 4- α -глюкантрансферазы; *amy* – гены α -амилазы.

С использованием метода двойной гомологичной рекомбинации были получены три штамма: с делецией каждого из генов *glgA1* и *glgA2* (штаммы $\Delta glgA1$ и $\Delta glgA2$, соответственно) и двух генов одновременно (штамм $\Delta glgA1\Delta glgA2$).

Наиболее высокие скорости роста в периодических культурах на минеральной среде «П» – 0.13 ч⁻¹ и 0.135 ч⁻¹ – были зарегистрированы для штамма дикого типа (WT) и штамма $\Delta glgA1\Delta glgA2$ (Таблица 5).

Таблица 5 – Удельные скорости роста и содержание гликогена в биомассе штамма *Ms. capsulatus* MIR дикого типа (WT) и штаммов с делецией генов гликогенсинтаз на жидкой минеральной среде «П» с метаном в газовой фазе

Штаммы	WT	$\Delta glgA1$	$\Delta glgA2$	$\Delta glgA1\Delta glgA2$
μ , ч ⁻¹	0.13±0.01	0.11±0.01	0.10±0.02	0.14±0.01
Гликоген, мг г ⁻¹ АСВ	13.43±0.06	33.89±0.21	14.61±0.07	1.96±0.02

Анализ содержания углеводов (в том числе гликогена) в лиофильно высушенной биомассе показал, что синтез запасных веществ в штаммах с делецией одиночных генов *glgA* не снижается или даже увеличивается (Таблица 5). Однако, в клетках штамма $\Delta glgA1\Delta glgA2$, как и ожидалось, содержание углеводов было минимальным. Предположительно, выявленные высокочувствительным антроновым

реактивом в биомассе штамма $\Delta glgA1\Delta glgA2$ углеводы представлены не гликогеном, а низкомолекулярными углеводами, принимающими участие в центральном метаболизме клеток.

Дальнейшие эксперименты с культивированием в биореакторе были проведены со штаммом *Ms. capsulatus* MIR дикого типа и штаммом $\Delta glgA1\Delta glgA2$ для анализа влияния выполненных модификаций генома на удельную скорость роста, продуктивность, синтез гликогена и содержание белка в биомассе.

5. Ростовые характеристики штамма *Ms. capsulatus* MIR с делецией генов *glgA* при культивировании в биореакторе

В накопительном режиме культивирования как для *Ms. capsulatus* MIR дикого типа, так и для штамма $\Delta glgA1\Delta glgA2$ были зарегистрированы высокие удельные скорости роста, около 0.3 ч^{-1} , а также показан устойчивый продолжительный рост в условиях непрерывного культивирования со скоростью разбавления 250 мл ч^{-1} . В отличие от штамма дикого типа, штамм $\Delta glgA1\Delta glgA2$ демонстрировал существенное (двукратное) сокращение лаг-фазы роста и ускорение выхода в логарифмическую фазу роста (Рисунок 7). При одинаковых параметрах культивирования АСВ клеточной биомассы в культуре штамма $\Delta glgA1\Delta glgA2$ был выше (4.72 г л^{-1}), чем у штамма дикого типа *Ms. capsulatus* MIR (4.12 г л^{-1}).

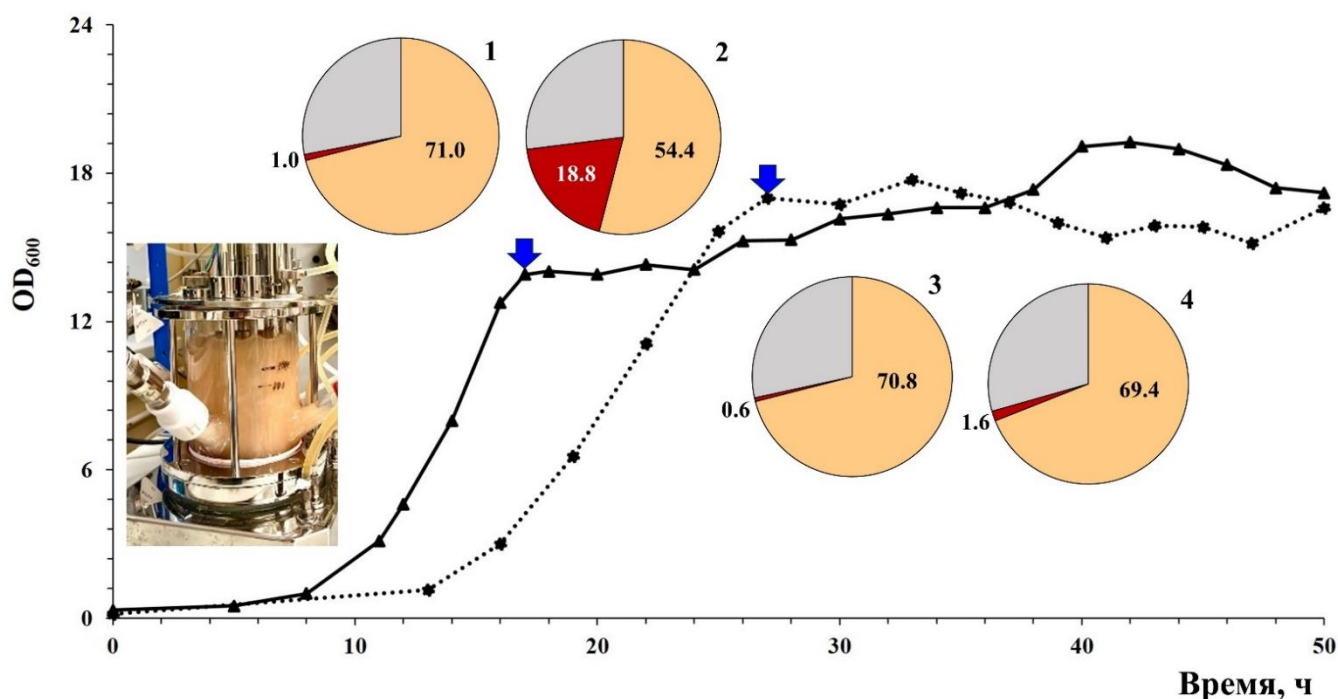


Рисунок 7. Динамика роста *Ms. capsulatus* MIR дикого типа (пунктирная линия) и модифицированного штамма $\Delta glgA1\Delta glgA2$ (сплошная линия) в биореакторе. Переключение режима работы реактора с накопительного на проточный указано стрелками. Круговые диаграммы показывают процентное содержание белка (кремовый цвет), гликогена (красный цвет) и других клеточных компонентов (серый цвет) в сухой биомассе. (1 и 3) Состав биомассы штамма $\Delta glgA1\Delta glgA2$ в накопительном и проточном режимах, соответственно. (2 и 4) Состав биомассы штамма дикого типа в накопительном и проточном режимах, соответственно. Цитировано по Vut, Suleimanov *et al.*, 2024.

Наиболее значительные отличия были отмечены в отношении содержания белка и гликогена в клетках исходного и модифицированного штаммов. Так, в накопительном режиме культивирования в ферментере биомасса штамма дикого типа содержала лишь 54.4% белка, а штамма $\Delta glgA1\Delta glgA2$ – 71.0% (диаграммы 1 и 2 на рисунке 7). Это отличие объяснялось высоким содержанием гликогена (18.8%) в биомассе штамма дикого типа, тогда как штамм $\Delta glgA1\Delta glgA2$ не был способен его синтезировать. В пользу этого предположения свидетельствовало также более высокое потребление азота из среды культивирования модифицированным штаммом $\Delta glgA1\Delta glgA2$ – 61.5 мг N г⁻¹ сухой биомассы против 52.0 мг N г⁻¹ у штамма дикого типа.

В условиях непрерывного культивирования содержание белка в биомассе сравниваемых штаммов было близким – 69.4% и 70.8% – у штаммов WT и $\Delta glgA1\Delta glgA2$, соответственно. По всей видимости, это объясняется отсутствием лимитирования роста метанотрофов в проточном режиме культивирования и, как следствие, отсутствием синтеза и накопления запасных веществ клетками. Это подтверждают результаты анализа сухой биомассы штаммов метанотрофов в проточном режиме культивирования (диаграммы 3 и 4 на рисунке 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование ставило своей целью направленный поиск новых природных быстрорастущих штаммов метанотрофных бактерий, которые могли быть использованы в качестве продуцентов кормового белка на основе метана для аквакультуры. В ходе работы был получен и идентифицирован ряд новых термотолерантных изолятов метанотрофных бактерий родов *Methylococcus*, *Methylomonas* и *Methylomarinum*. Для всех изолятов были получены, проанализированы и депонированы в GenBank полные последовательности геномов, что существенно пополнило число ныне доступных геномов метанотрофов высокого качества сборки.

Результатом блока работ по получению накопительных культур и выделению изолятов метанотрофных бактерий рода *Methylococcus* явились пять новых штаммов – IO1, KN2 MIR, ВН и Mc7. Первые 4 изолята были идентифицированы как представители вида *Mc. capulatus*, которые традиционно используют в биотехнологии получения кормового белка из метана или природного газа. Пятый штамм, Mc7, потенциально представляет новый вид рода *Methylococcus*. При повышенных температурах инкубации (от 40 до 50°C) полученные культуры продемонстрировали высокие скорости роста на метане, до 0.3 ч⁻¹, что сопоставимо с таковыми у промышленных штаммов метанотрофов. Штамм MIR, как один из наиболее быстрорастущих, был выбран для дальнейшей работы по метаболической инженерии, с целью улучшения ростовых и продукционных характеристик. На основе этого

изолята был получен модифицированный штамм с делецией генов гликогенсинтаз ($\Delta glgA1\Delta glgA2$) и проведено сравнение его характеристик с таковыми у штамма дикого типа. В условиях культивирования в биореакторе не синтезирующий гликогена штамм $\Delta glgA1\Delta glgA2$ не уступал штамму дикого типа в скоростях роста (0.3 ч^{-1} в накопительном и 0.25 ч^{-1} в проточном режимах) и показал более быстрый переход к логарифмической фазе роста, что экономически выгодно для биотехнологических процессов с использованием накопительного и отъемно-доливного режимов. Как штамм дикого типа, так и модифицированный штамм $\Delta glgA1\Delta glgA2$ демонстрировали высокое содержание белка в продуцируемой биомассе в режиме проточного культивирования – до 71%.

В результате направленного поиска биотехнологически перспективных штаммов метанотрофов, способных синтезировать каротиноиды, были получены 5 новых изолятов представителей рода *Methylomonas*, штаммы $MP1^T$, $MY1$, $MV1$, $MO1$ и $MW1^T$. Согласно полученным величинам сходства с ранее описанными видами *Methylomonas* по генам 16S рРНК и последовательностям геномов, все штаммы, кроме $MY1$, представляли собой новые виды этого рода. Штаммы $MY1$ и $MP1^T$ демонстрировали наиболее высокие скорости роста – $0.29-0.33 \text{ ч}^{-1}$ – при температурах $30-35^\circ\text{C}$, что сопоставимо с таковыми у производственных штаммов. Все изоляты, кроме штамма $MW1^T$, были способны синтезировать каротиноиды, производные ликопина. В настоящей работе были описаны два новых вида аэробных метанотрофных бактерий рода *Methylomonas*, *Mm. rapida* и “*Mm. montana*”. “*Mm. montana*” – первый вид рода *Methylomonas*, представители которого неспособны к синтезу каротиноидов. Типовые штаммы новых видов были депонированы в международных коллекциях микроорганизмов.

В ходе работы по поиску метанотрофов-продуцентов, способных расти на морской воде, был получен изолят галотофильных метанотрофных бактерий рода *Methylomarinum*, штамм $Ch1-1^T$. На основании результатов сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК и генома этого изолята с таковыми у ранее описанных представителей *Methylomarinum*, а также ряда фенотипических отличий (способности к синтезу каротиноидов, более широких ростовых диапазонов температуры и содержания солей в среде) штамм $Ch1-1^T$ был описан в качестве нового вида рода *Methylomarinum*, “*Mr. roseum*” sp. nov. Анализ удельных скоростей роста при культивировании этого штамма в опытном биореакторе на среде, близкой по составу морской воде с общим содержанием солей 36 г л^{-1} , показал способность культуры расти со скоростью 0.16 ч^{-1} в накопительном режиме, а также способность поддерживать устойчивый рост со средней скоростью разбавления 0.14 ч^{-1} . Анализ продуцируемой биомассы при нестерильном проточном культивировании показал содержание белка до 67.6%. Полученные данные по ростовым и продукционным характеристикам для штамма $Ch1-1^T$ превосходят показатели ранее описанных

галотолерантных метанотрофов и являются основой для дальнейших исследований возможности получения кормового белка на природном газе и морской воде.

ВЫВОДЫ

1. Из ила очистных сооружений, осадков пресноводных водоемов и почв полигона ТБО получены и охарактеризованы 5 новых изолятов термотолерантных метанотрофов рода *Methylococcus* – штаммы IO1, ВН, KN2, Mc7 и MIR. Наиболее высокие скорости роста в биореакторе, до 0.3 ч^{-1} , и высокое содержание белка в биомассе, до 73-74%, зарегистрированы для штаммов MIR и KN2.
2. Сформирована коллекция изолятов метанотрофных бактерий рода *Methylomonas*, способных синтезировать каротиноиды, производные ликопина. Анализ ростовых характеристик изолятов в периодических и непрерывных культурах позволил отобрать культуру, обладающую наиболее высокой скоростью роста и содержанием каротиноидов в биомассе – штамм MP1^T.
3. Описаны два новых вида метанотрофных бактерий рода *Methylomonas*, *Mm. rapida* и “*Mm. montana*”. *Mm. rapida* обладает высоким биотехнологическим потенциалом в силу высоких скоростей роста на метане, до 0.33 ч^{-1} . “*Mm. montana*” – первый вид рода *Methylomonas*, представители которого неспособны к синтезу каротиноидов.
4. Из осадков соленого озера Эльтон получен новый вид галотолерантных метанотрофных бактерий, “*Methylomarinum roseum*”, штамм Ch1-1^T, растущий при содержании NaCl в среде до 10%. Экспериментально подтвержден устойчивый рост штамма Ch1-1^T в биореакторе на природном газе и среде с общим содержанием солей 36 г л^{-1} и содержанием белка в продуцируемой биомассе до 68%.
5. Исследования модифицированного штамма *Methylococcus capsulatus* MIR с инактивированными генами *glgA1* и *glgA2*, кодирующими изоформы гликогенсинтаз, подтвердили, что модифицированный штамм не синтезирует гликоген и не уступает штамму дикого типа по скорости роста в биореакторе и содержанию белка в клетках, однако имеет более короткую лаг-фазу с быстрым переходом к логарифмической фазе роста.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Экспериментальные статьи

1. Ошкин И.Ю., Данилова О.В., Сулейманов Р.З., Тихонова Е.Н., Малахова Т.В., Мурашова А.И., Пименов Н.В., Дедыш С.Н. Термотолерантные метанотрофные бактерии из осадков реки Черная, Крым, и оценка их ростовых характеристик // Микробиология. – 2021. – Т. 90(5). – С. 553–563.
2. Oshkin I.Y., Danilova O.V., But S.Y., Miroshnikov K.K., **Suleimanov R.Z.**, Belova S.E., Tikhonova E.N., Kuznetsov N.N., Khmelenina V.N., Pimenov N.V., Dedysh S.N. 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. – V. 12. – art. 756830.
3. Oshkin I.Y., **Suleimanov R.Z.**, Khmelenina V.N., Mardanov A.V., Pimenov N.V., Dedysh S.N. Complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* MIR, a methanotroph capable of growth on methanol // *Microbiology Resource Announcements*. – 2022. – V. 11(9). – art. e00542-22.
4. Oshkin I.Y., Tikhonova E.N., **Suleimanov R.Z.**, Ashikhmin A.A., Ivanova A.A., Pimenov N.V., Dedysh S.N. All kinds of sunny colors synthesized from methane: genome-encoded carotenoid production by *Methylomonas* species // *Microorganisms*. – 2023. – V. 11(12). – art. 2865.
5. Сулейманов Р.З., Тихонова Е.Н., Ошкин И.Ю., Данилова О.В., Дедыш С.Н. *Methylomonas montana* sp. nov., первый непигментированный метанотроф рода *Methylomonas*, выделенный из донных отложений горной реки // Микробиология. – 2023. – Т. 92(6) – С. 766-774.
6. Tikhonova E.N., **Suleimanov R.Z.**, Miroshnikov K.K., Oshkin I.Y., Belova S.E., Danilova O.V., Ashikhmin A.A., Konopkin A.A., But S.Y., Pimenov N.V., Dedysh S.N. *Methylomonas rapida* sp. nov., a novel species of fast-growing, carotenoid-producing obligate methanotrophs with high biotechnological potential // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2023. – V. 46(2). – art. 126398.
7. Tikhonova E.N., **Suleimanov R.Z.**, Oshkin I.Y., Konopkin A.A., Fedoruk D.V., Pimenov N.V., Dedysh S.N. Growing in saltwater: biotechnological potential of novel *Methylotuvimicrobium*- and *Methylomarinum*-like methanotrophic bacteria // *Microorganisms*. – 2023. – V. 11(9). – art. 2257.
8. But S.Y., **Suleimanov R.Z.**, Oshkin I.Y., Rozova O.N., Mustakhimov I.I., Pimenov N.V., Dedysh S.N., Khmelenina V.N. New solutions in single-cell protein production from methane: construction of glycogen-deficient mutants of *Methylococcus capsulatus* MIR // *Fermentation*. – 2024. – V. 10(5). – art. 265.
9. **Suleimanov R.Z.**, Oshkin I.Y., Danilova O.V., Suzina N.E., Dedysh S.N. *Methylomarinum roseum* sp. nov., a novel halophilic methanotrophic bacterium from the hypersaline lake Elton // *Microbiology*. – 2024. – V. 93(6). – P. 724-729.

Тезисы конференций

1. Сулейманов Р.З., Ошкин И.Ю., Тихонова Е.Н., Дедыш С.Н. Новый вид термотолерантных метанотрофных бактерий рода *Methylobionas* с высокими ростовыми характеристиками. XIII Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» / Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН – Москва, 16-18 ноября 2022 г., М: Ваш формат, 2022. С. 252-254.
2. Конопкин А.А., Тихонова Е.Н., Сулейманов Р.З., Дедыш С.Н. Новые изоляты бактерий рода *Methylobionas*, синтезирующие каротиноиды, и их ростовые характеристики в условиях непрерывного культивирования на метане. XIII Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» / Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН – Москва, 16-18 ноября 2022 г., М: Ваш формат, 2022. С. 118-120.
3. Бут С.Ю., Розова О.Н., Сулейманов Р.З. Генетическая модификация биотехнологически перспективного штамма метанотрофа *Methylococcus capsulatus* MIR – продуцента белка одноклеточных. III Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии, микробное разнообразие» / Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН – Пущино, 5-7 декабря 2023 г., М: ООО «ГЕОС», 2023 г. С. 19-20.