

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
**«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»**  
(ФИЦ «Биотехнологии» РАН)

*На правах рукописи*

СУЛЕЙМАНОВ РУСЛАН ЗАКИЕВИЧ

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

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
Доктор биологических наук  
Светлана Николаевна Дедыш

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
ГЛАВА 1. МЕТАНОТРОФЫ – УНИКАЛЬНАЯ ГРУППА ПРОКАРИОТ .....	12
1.1 Разнообразие и биосферная роль аэробных метанотрофных бактерий.....	12
1.2. Физиологические типы аэробных метанотрофов.....	16
1.2.1. Термотолерантные и термофильные метанотрофные бактерии .....	17
1.2.2. Галотолерантные и галофильные метанотрофные бактерии .....	18
ГЛАВА 2. МЕТАБОЛИЗМ АЭРОБНЫХ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ .....	22
2.1. Мембранная метанмонооксигеназа .....	24
2.2. Растворимая метанмонооксигеназа .....	27
2.3. Окисление метанола .....	29
2.4. Окисление формальдегида .....	31
2.5. Пути ассимиляции C <sub>1</sub> -соединений у метанотрофных бактерий.....	34
ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ.....	38
ГЛАВА 4. РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ МЕТАНОТРОФОВ.....	41
4.1. Двойная гомологичная рекомбинация на основе суицидального вектора .....	42
4.2. Безмаркерные мутации метанотрофных бактерий.....	42
4.3. CRISPR/Cas9-опосредованный мутагенез метанотрофов .....	44
4.4. Методы трансформации метанотрофных бактерий.....	47
ГЛАВА 5. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ.....	49
5.1. Метанотрофы как продуценты.....	49
5.2. Производство кормового белка на основе метана .....	51
ГЛАВА 6. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	56

6.1. Получение накопительных культур метанотрофных бактерий.....	56
6.2. Получение и идентификация чистых культур метанотрофов .....	57
6.3. Оценка ростовых характеристик изолятов .....	59
6.4. Анализ геномов изолятов метанотрофов .....	59
6.5. Описание новых видов аэробных метанотрофов .....	60
6.6. Редактирование генома <i>Ms. capsulatus MIR</i> . .....	60
6.6.1. Проверка антибиотикорезистентности целевого штамма .....	61
6.6.2. Подбор векторных систем.....	62
6.6.3. Нокаут генов синтеза гликогена <i>glgA1</i> и <i>glgA2</i> .....	64
6.7. Культивирование наиболее перспективных изолятов в биореакторе.....	67
6.7.1. Культивирование метанотрофов из пресноводных экосистем .....	67
6.7.2. Культивирование галофильных метанотрофов .....	68
6.7.3. Анализ биомассы культур, полученной в ходе накопительного и непрерывного режимов культивирования.....	69
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	71
ГЛАВА 7. ПОИСК НОВЫХ БЫСТРОРАСТУЩИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>METHYLOCOCCUS</i> .....	71
7.1. Новые изоляты и их идентификация .....	71
7.2. Исследование физиологии и ростовых характеристик изолятов рода <i>Methylococcus</i> .....	74
ГЛАВА 8. ПОЛУЧЕНИЕ БЫСТРОРАСТУЩИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>METHYLOMONAS</i> .....	77
8.1. Идентификация изолятов рода <i>Methylomonas</i> .....	77
8.2. Анализ физиологии и ростовых характеристик изолятов рода <i>Methylomonas</i> . .....	78
8.3 Таксономическое описание новых видов рода <i>Methylomonas</i> .....	81
8.3.1. Описание <i>Methylomonas rapida</i> sp. nov. ....	81

8.3.2. Описание <i>Methylomonas montana</i> sp. nov.....	87
ГЛАВА 9. ПОИСК МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ, СПОСОБНЫХ К РОСТУ НА МОРСКОЙ ВОДЕ .....	92
9.1 Физиологические и ростовые характеристики штамма Ch1-1 <sup>T</sup> .....	92
9.2. Анализ генома штамма Ch1-1 <sup>T</sup> .....	94
9.3. Культивирование штамма Ch1-1 <sup>T</sup> в биореакторе.....	98
ГЛАВА 10. РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА <i>METHYLOCOCCUS CAPSULATUS</i> MIR .....	100
10.1. Проверка антибиотикорезистентности штамма MIR .....	100
10.2. Дизайн вектора для делеции генов гликогенсинтаз путем двойной гомологичной рекомбинации .....	100
10.3. Делеция генов синтеза гликогена .....	101
10.4. Анализ влияния делеций на ростовые характеристики штамма MIR.....	102
ГЛАВА 11. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ШТАММА MIR $\Delta glgA1\Delta glgA2$ В БИОРЕАКТОРЕ .....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	107
ВЫВОДЫ.....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	110

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Аэробные метанотрофные бактерии – это группа прокариот, специализированных на использовании метана (CH<sub>4</sub>) 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 *Gammaproteobacteria* (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<sub>4</sub>, 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 биопroteина, 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 (Bothe *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* КОНЦЕПТ-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 биопроtein, который может быть востребован на рынке кормов для аквакультуры.

Изолят рода *Methylomarinum* может найти применение в технологии получения биопроteина 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 *Ms. 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» (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 лаборатории 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

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### ГЛАВА 1. МЕТАНОТРОФЫ – УНИКАЛЬНАЯ ГРУППА ПРОКАРИОТ

#### 1.1 Разнообразие и биосферная роль аэробных метанотрофных бактерий

Аэробные метанотрофные бактерии – это группа прокариот, специализированных на окислении и использовании метана ( $\text{CH}_4$ ) в качестве источника углерода и энергии (Hanson and Hanson, 1996; Гальченко, 2001; Троценко и Хмеленина, 2008; Trotsenko and Murrell, 2008). Филогенетически, ныне известные представители этой группы микроорганизмов относятся к классам *Alpha-* и *Gamma*proteobacteria филума *Pseudomonadota* (прежнее название *Proteobacteria*), а также к порядку *Methylacidiphilales* филума *Verrucomicrobiota*. Способность к окислению метана обуславлена наличием у этих бактерий уникального фермента - метанмонооксигеназы (ММО), встречающейся в двух формах, мембранной (мММО) и растворимой (рММО), и окисляющей метан с использованием кислорода.

Изучение метанотрофных бактерий берет свое начало с открытия способности некоторых микроорганизмов к росту на метане, сделанному в 1906 году немецким микробиологом Зёнгеном, который выделил первую метаноокисляющую бактерию «*Bacillus methanicus*», известную ныне как *Methylomonas methanica*. За прошедшие с этого времени 120 лет спектр полученных в культурах и таксономически охарактеризованных аэробных метанотрофных бактерий существенно увеличился и насчитывает представителей более трех десятков родов (см. обзор Dedysh and Knief, 2018). В дополнение к классическим аэробным метанотрофам были описаны бактерии филы-кандидата NC10 (ныне филум *Methylomirabilota*), способные окислять  $\text{CH}_4$  за счет нитрита в бескислородных условиях (Ettwig *et al.*, 2010). Процесс анаэробного окисления метана был также открыт у некоторых групп архей, однако в настоящей работе будут рассмотрены только аэробные метанотрофные бактерии.

В 1970 году, в ходе описания обширной коллекции изолятов аэробных метанотрофных бактерий, выделенных из различных экосистем, было предложено разделить их на две основные группы - тип I и тип II (Whittenbury *et al.*, 1970). В качестве критериев для разделения метанотрофов на две группы были использованы следующие

характеристики: различие в расположении внутрицитоплазматических мембран (ВЦП), способ ассимиляции углерода в ходе метаболизма, способность к фиксации атмосферного азота и преобладание жирных кислот либо с 16, либо с 18 атомами углерода. По предложенной классификации к I типу были отнесены представители родов *Methylomonas*, *Methylococcus* и *Methylobacter*, ВЦМ которых расположены перпендикулярно цитоплазматической мембране в виде везикулярных стопок, ассимилируют углерод с использованием рибулозомонофосфатного и отличаются преобладанием жирных кислот с 16 атомами углерода. Ко II типу были отнесены метанотрофы родов *Methylosinus* и *Methylocystis*, для которых характерны ВЦМ, расположенные параллельно цитоплазматической мембране, использование серинового пути для ассимиляции углерода и преобладание жирных кислот с 18 атомами углерода. Позже, метанотрофы рода *Methylococcus* были выделены в тип X из-за наличия рибулозо-1,5-бисфосфатного пути ассимиляции углерода в дополнение к рибулозомонофосфатному пути (Whittenbury, 1981; Whittenbury, Dalton, 1981).

С введением в практику микробиологических исследований сравнительного анализа последовательностей генов 16S рРНК правильность ранее предложенного разделения метанотрофов на различные типы была подтверждена. Была показана принадлежность метанотрофных бактерий I и X типов к классу *Gammaproteobacteria*, в то время как метанотрофы II тип образовывали филогенетический кластер в пределах класса *Alphaproteobacteria* (Hanson and Hanson, 1996).

В последующие годы, с описанием все большего числа родов метанооксиляющих бактерий и расширением спектра методов молекулярного анализа классификация этих бактерий претерпела некоторые изменения. Так, в классе *Gammaproteobacteria* ныне выделяют типы Ia и Ib в пределах семейства *Methylococcaceae* и тип Ic, представляющий семейство *Methylothermaceae* (Knief, 2015). Класс *Alphaproteobacteria* в настоящий момент представлен метанотрофами типов IIa и IIb, к первому относится семейство *Methylocystaceae*, ко второму – *Beijerinckiaceae* (Knief, 2018; Dedysh and Knief, 2018). Метанотрофов филума *Verrucomicrobiota* зачастую выделяют в III тип (Рисунок 1).

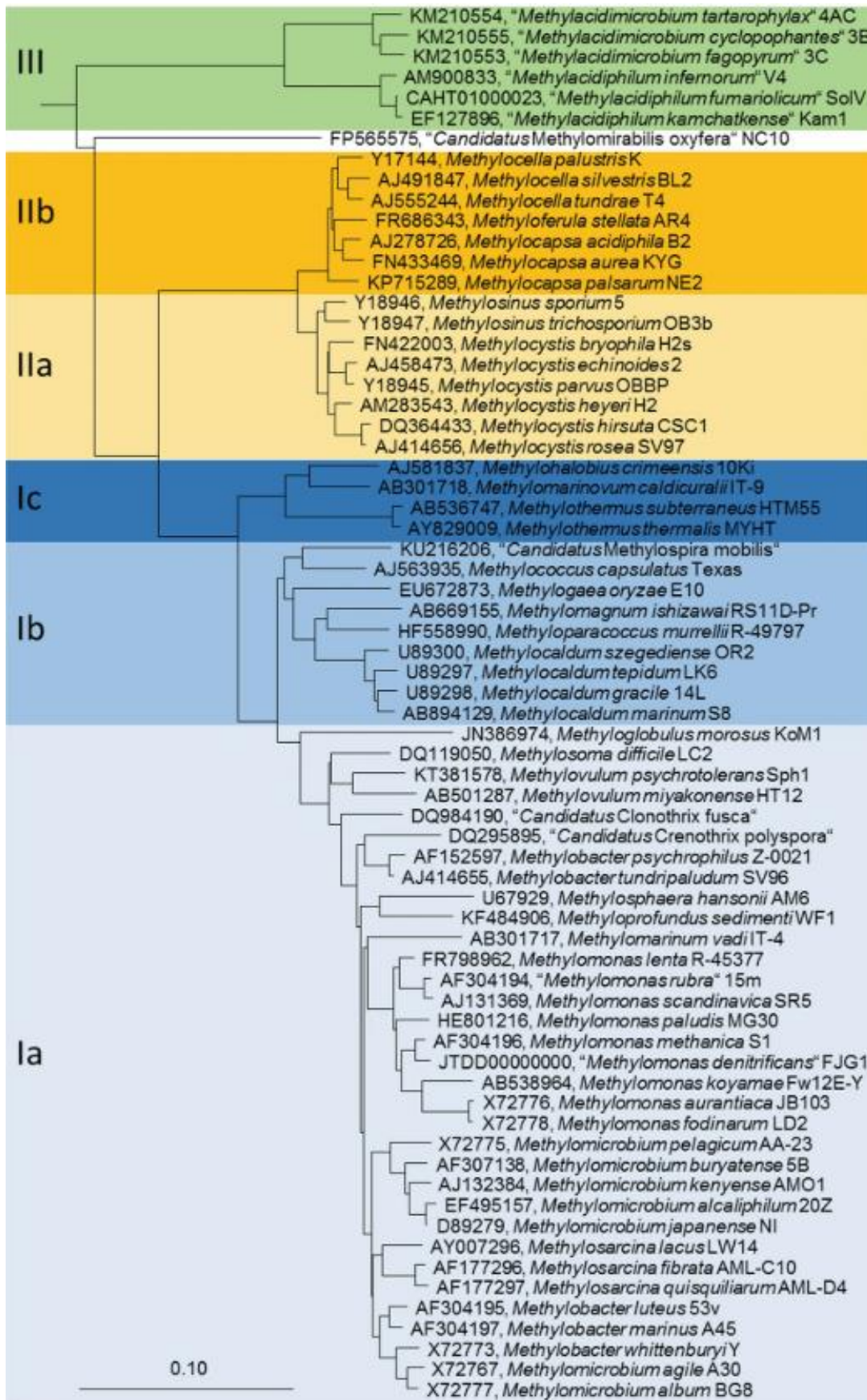


Рисунок 1 – Филогения описанных аэробных метанотрофных бактерий на основе последовательностей гена 16S рРНК. Маркер – 0.10 замена на нуклеотидную позицию. Цитировано по Dedysh and Knief, 2018.

Метанотрофы особенно многочисленны в экосистемах, где активно идут процессы образования метана метаногенными археями и одновременно доступен кислород – это такие биотопы, как болота и заболоченные земли, торфяники, рисовые поля, полигоны ТБО, пресноводные и морские водоемы и др. (Knief, 2015). Метан, образованный в анаэробной зоне, перехватывается на пути в атмосферу метанотрофными бактериями, образующими естественный «биофильтр», позволяющий существенно снижать природные и антропогенные выбросы парникового газа (Conrad, 2009; Kirschke *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2024).

Окисление  $\text{CH}_4$  метанотрофами является важной частью круговорота углерода на Земле. Метан является вторым по значимости парниковым газом после  $\text{CO}_2$ , и имеет по сравнению с ним более значительное, примерно на 30%, влияние на парниковый эффект (Saunois *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2024; Tucci and Rosenzweig, 2024). В современном мире антропогенные выбросы метана неуклонно растут, достигая 60% от всей его эмиссии в атмосферу, за 2008-2017 гг. они достигли  $359 \text{ Тг год}^{-1}$  (Saunois *et al.*, 2019; Tucci and Rosenzweig, 2024). При этом было подсчитано, что в период с 1990 по 2009 гг. годовое совокупное потребление  $\text{CH}_4$  почвенными аэробными метанотрофными бактериями составило  $33.5 \pm 0,6 \text{ Тг}$  (Murguía-Flores *et al.*, 2018). Глобальное моделирование выявило, что аэробные метанотрофы имеют более высокие показатели поглощения метана в зонах с умеренной влажностью, что благоприятствует насыщению почв кислородом, и где практически отсутствуют сезонные колебания температур (Murguía-Flores *et al.*, 2018). В некоторых биотопах ассимиляция метана представляет собой единственный источник органического вещества, так что биологическое окисление метана играет важную роль в функционировании таких экосистем.

Ряд метанотрофных бактерий обладают RuBисКО, ключевым ферментом фиксации  $\text{CO}_2$ , играющим важную роль в глобальном цикле углерода на планете (Erb and Zarzycki, 2018). Последние исследования подтвердили важную роль этого фермента в обеспечении оптимального метаболического функционирования аэробных метанотрофных бактерий, а также выявили наличие недавно открытого пути фиксации диоксида углерода. Так, *Methylococcus capsulatus* Bath включал углерод экзогенного  $^{13}\text{CO}_2$  в количестве более 10% биомассы при условии, что в газовой фазе присутствует 8% углекислоты (Henard *et al.*, 2021). В геноме этой метанотрофной бактерии обнаружены гены восстановительного глицинового пути (rGlyP – reductive glycine pathway) – нового пути фиксации  $\text{CO}_2$

(Sánchez-Andrea *et al.*, 2020), который зарекомендовал себя как многообещающий путь для использования в биотехнологиях будущего, благодаря высокой эффективности выработки АТФ (Claassens *et al.*, 2022). Известно, что и другие метанотрофы – филумов *Verrucomicrobiota* и *Methylomirabilota*, окисляют метан до углекислого газа с получением энергии, которую расходуют на фиксацию эндо- и экзогенного CO<sub>2</sub> (Khadem *et al.*, 2011; Rasigraf *et al.*, 2014; Mohammadi *et al.*, 2019).

Таким образом, новые исследования, направленные на изучение C<sub>1</sub>-метаболизма аэробных метанотрофных бактерий, могут помочь в понимании не только эволюционных связей между метанотрофией и автотрофией, но и расширить представления о глобальном вкладе этих микроорганизмов в сокращения выбросов двух основных парниковых газов в атмосферу Земли.

## **1.2. Физиологические типы аэробных метанотрофов.**

Метанотрофные бактерии встречаются в широком спектре экосистем с различными физико-химическими характеристиками, такими как значения pH от 1 до 11, температуры от 0 до 72°C, а также соленость среды от 0 до 30% (Trotsenko and Khmelena, 2002; Троценко и Хмеленина, 2008). Метанотрофы, населяющие экотопы с экстремальными характеристиками, представлены экстремофильными типами – термофилами, психрофилами, ацидофилами, алкалофилами и галофилами. Большая часть накопленных к настоящему времени знаний о биологии, метаболизме и ростовых характеристиках метанотрофных бактерий относится к мезофильным и нейтрофильным метанотрофам, поскольку именно эта экологическая группа насчитывает наибольшее число полученных в чистых культурах и детально охарактеризованных представителей. Для целей биотехнологии производства белка на основе метана, которой посвящена настоящая работа, особый интерес представляли быстрорастущие умеренно термофильные или термотолерантные метанотрофные бактерии, а также галофильные или галотолерантные метанотрофы, способные к росту на морской воде. Известное разнообразие этих двух физиологических типов метанотрофов представлено ниже.



### 1.2.1. Термотолерантные и термофильные метанотрофные бактерии

Истинных термофилов, имеющих оптимальную температуру роста более 60°C, среди аэробных метанотрофных бактерий нет (Op den Camp *et al.*, 2009). Известное разнообразие полученных в чистую культуру умеренно термофильных и термотолерантных аэробных метанотрофных бактерий представлено в Таблице 1.

Таблица 1 – Таксономически описанное разнообразие умеренно термофильных и термотолерантных метанотрофных бактерий.

Штамм(ы)	Диапазон T (опт), °C	Скорость роста, ч <sup>-1</sup>	Источник выделения	Ссылка
<i>Methylococcus capsulatus</i> Texas <sup>T</sup>	До 55 (37)	0.2	Активный ил сточных вод, США	Foster and Davis, 1966
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	20-55 (42)	0.22	Ил Римских терм в Бате, Англия	Whittenbury <i>et al.</i> , 1970
<i>Methylococcus thermophilus</i> IMV 2Yu <sup>T</sup>	37-55 (н.о.)	н.о.	Активный ил, Россия	Малашенко <i>и др.</i> , 1975
<i>Methylococcus geothermalis</i> IM1 <sup>T</sup>	15-48 (30-45)	0.2	Гидротермы, Корея	Awala <i>et al.</i> , 2020
<i>Methylocaldum gracile</i> VKM-14L <sup>T</sup>	20-47 (42)	н.о.	Гидротермы, Венгрия	Bodrossy <i>et al.</i> , 1997
<i>Methylocaldum szegediense</i> OR2 <sup>T</sup>	37-62 (55)	н.о.	Гидротермы, Венгрия	Bodrossy <i>et al.</i> , 1997
<i>Methylocaldum tepidum</i> LK6 <sup>T</sup>	30-47 (42)	н.о.	Гидротермы, Венгрия	Bodrossy <i>et al.</i> , 1997
<i>Methylocaldum marinum</i> S8 <sup>T</sup>	20-47 (36)	0.044	залив Кагосима, Япония	Takeuchi <i>et al.</i> , 2014
<i>Methylomarinum vadi</i> IT-4 <sup>T</sup>	20-44 (37-43)	0.33	Морской осадок, Япония	Hirayama <i>et al.</i> , 2013
<i>Methylothermus subterraneus</i> HTM55 <sup>T</sup>	37-65 (55-60)	0.3	Подземные гидротермы, Япония	Hirayama <i>et al.</i> , 2011
<i>Methylothermus thermalis</i> MYHT <sup>T</sup>	37-67 (57-59)	0.1	Гидротермы, Япония	Tsubota <i>et al.</i> , 2005
<i>Methylomarinovum caldicuralii</i> IT-9 <sup>T</sup>	30-55 (45-50)	0.33	Морские гидротермы, Япония	Hirayama <i>et al.</i> , 2014
<i>Methylohalobius crimeensis</i> 10Ki <sup>T</sup>	15-42 (30)	0.028	Озеро Круглое, Крым	Heyer <i>et al.</i> , 2005
<i>Methylacidiphilum kamchatkense</i> Kam1 <sup>T</sup>	37-60 (55)	0.11	Геотермальный источник, Россия	Ratnadevi <i>et al.</i> , 2023
<i>Methylacidiphilum caldifontis</i> IT-6 <sup>T</sup>	(50-55)	н.о.	Гидротермы, Италия	Awala <i>et al.</i> , 2023

н.о. – не определено.

Как видно из таблицы 1, к умеренно термофильным и термотолерантным метанотрофам относят некоторых представителей класса *Gamma*proteobacteria семейства *Methylococcaceae* и *Methylothermaceae*, а также метанотрофов семейства *Methylacidiphilaceae* филума *Verrucomicrobiota*.

В контексте использования метанотрофных бактерий в биотехнологии производства белка одноклеточных в первую очередь востребована именно эта группа метанотрофов, способных к росту при повышенных температурах. Особенно большой интерес вызывают представители, обладающие высокими скоростями роста и высокой продуктивностью. Однако, многие из вышеперечисленных микроорганизмов, несмотря на высокую удельную скорость роста, до  $0.33 \text{ ч}^{-1}$ , при оптимальных температурах выше  $40^\circ\text{C}$  не способны к достижению плотности культуры ( $\text{OD}_{600}$ ) больше, чем 0.25 (Tsubota *et al.*, 2005; Hirayama *et al.*, 2011; Hirayama *et al.*, 2013). Это делает их использование совершенно нецелесообразным для применения в экономически выгодных биотехнологиях. Кроме того, многие из умеренно термофильных и термотолерантных метанотрофов требуют постоянных множественных пересевов, без которых они быстро теряют жизнеспособность. Поэтому, среди всех метанотрофов этой группы применение в биотехнологических производствах нашли только представители рода *Methylococcus*, *Mc. capsulatus* Bath и ВСБ-874.

Таким образом, поиск альтернативных продуцентов с наиболее подходящими для биотехнологии свойствами является одной из актуальных задач получения кормового белка на основе аэробных метанотрофных бактерий.

### **1.2.2. Галотолерантные и галофильные метанотрофные бактерии**

Первым охарактеризованным морским метанотрофом, выделенным из воды Саргассового моря, являлся «*Methylomonas pelagica*» (Sieburth *et al.*, 1987). Этот изолят, штамм АА-23<sup>T</sup>, рос в диапазоне содержания NaCl в среде 0.5-4.7% (вес/об.) с оптимумом 0.5-2% при рН 6.8. Позднее он был реклассифицирован, как представитель рода *Methylotuvimicrobium*, «*Methylotuvimicrobium pelagicum*» (Orata *et al.*, 2018). К настоящему времени описано множество видов метанотрофов, способных к росту при высокой концентрации солей, которые были выделены как из наземных гиперсоленых и содовых озер, так и морских местообитаний. Известное разнообразие полученных в чистую

культуру галотолерантных и галофильных аэробных метанотрофных бактерий представлено в Таблице 2.

Таблица 2 – Известное разнообразие галотолерантных и галофильных метанотрофных бактерий. Цитировано с изменениями по Tikhonova, Suleimanov *et al.*, 2023.

Штамм(ы)	Диапазон NaCl (опт), %	Диапазон pH (опт)	Источник выделения	Ссылка
<i>"Methylomonas pelagica"</i> AA-23 <sup>T</sup>	0.5-4.7 (0.5-2)	н.о. (6.8)	Морская вода Саргассового моря	Sieburth <i>et al.</i> , 1987
<i>Methylomicrobium</i> sp. IR1	1.2-4.1 (1.5-1.9)	(6.0-7.0)	Морская вода, Плимутский залив	Bowman <i>et al.</i> , 1993
<i>Methylosphaera hansonii</i> AM6 <sup>T</sup> , AM11	н.о., требует морскую воду для роста	н.о.	Асе Lake, Антарктида	Bowman <i>et al.</i> , 1997
<i>Methylomicrobium modestohalophilus</i> 10S	0.2-8.8 (2.3)	5.5-8.5 (6.5)	Озеро Сасык,, Крым	Khmelenina <i>et al.</i> , 1996
<i>Methylomicrobium buryatense</i> 5B <sup>T</sup> , 4G, 5G, 6G, 7G	0-8.2 (0.8)	6.0-11.0 (8.0-8.5)	Содовые озера, Россия	Kalyuzhnaya <i>et al.</i> , 1999
<i>Methylohalobius crimeensis</i> 10Ki <sup>T</sup> , 4Kr	1.2-15 (5.8-8.7)	6.5-7.5 (7.0)	Озеро Круглое, Крым	Heyer <i>et al.</i> , 2005
<i>Methylomicrobium kenyense</i> AMO-1 <sup>T</sup>	до 6.4 (н.о.)	9.0-10.5 (9.5)	Содовые озера, Кения	Kalyuzhnaya <i>et al.</i> , 2008
<i>Methylotuvimicrobium japonense</i> NI <sup>T</sup>	0.2-8.8 (2.3-4.7)	(8.1)	Морской осадок, Япония	Kalyuzhnaya <i>et al.</i> , 2008
<i>Methylotuvimicrobium alcaliphilum</i> 20Z <sup>T</sup> , 5Z	0.5-8.8 (2.0-4.0)	7-10.5 (9.0-9.5)	Озера Тувы, Россия	Khmelenina <i>et al.</i> , 1996
<i>Methylomarinum vadi</i> IT-4 <sup>T</sup> , T2-1	1.0-8.0 (2.0-3.0)	4.5-8.1 (6.2-7.0)	Морской осадок, Япония	Hirayama <i>et al.</i> , 2013
<i>Methylomarinovum caldicuralii</i> IT-9 <sup>T</sup>	1.0-5.0 (3.0)	5.3-6.9 (6.0-6.4)	Морские гидротермы, Япония	Hirayama <i>et al.</i> , 2014
<i>Methylocaldum marinum</i> S8 <sup>T</sup>	0.5-5 (2.0)	6.0-8.0 (7.0)	залив Кагосима, Япония	Takeuchi <i>et al.</i> , 2014
<i>Methyloprofundus sedimenti</i> WF1 <sup>T</sup>	1.0-4.0 (2.0)	6.0-8.0 (6.5-7.5)	Морские отложения, Калифорния	Tavormina <i>et al.</i> , 2015

н.о. – не определено.

Среди них выделяются:

- *Methylohalobius crimeensis* 10Ki<sup>T</sup>, выделенный из гиперсоленого озера Крыма, демонстрирующий наибольшую устойчивость к содержанию NaCl в среде (до 15% вес/об.) (Heyer *et al.*, 2005);
- Представители рода *Methylovivimicrobium* – *M. alcaliphilum* 20Z<sup>T</sup> и *M. japonense* NI<sup>T</sup>, полученные из содового озера и морских отложений, соответственно, демонстрирующие широкий диапазон роста при солености 0.03-1.5М NaCl с высокими скоростями роста (Khmelenina *et al.*, 1996; Kalyuzhnaya *et al.*, 2008).
- *Methylomarinum vadi* IT-4<sup>T</sup> выделен из морской среды берегов Японии, демонстрирующий высокую скорость роста до 0.33 ч<sup>-1</sup> при оптимальных условиях солености 2-3% (вес/об.) (Hirayama *et al.*, 2013);
- *Methylomarinovum caldicuralii* IT-9<sup>T</sup> получен из мелководной гидротермальной системы кораллового рифа берегов Японии, умеренный термофил, имеющий оптимальную температуру роста 45-50°C с оптимумом солености 3% (вес/об.), также показавший высокую скорость роста до 0.33 ч<sup>-1</sup> (Hirayama *et al.*, 2014).

Особого внимания заслуживает *Methylohalobius crimeensis*, чья способность к росту при содержании NaCl в среде до 15% является рекордной для группы метанотрофных бактерий, однако, его медленный рост при оптимальных условиях, составляющий 0.019-0.028 ч<sup>-1</sup> (Heyer *et al.*, 2005), ограничивает его использование в промышленной биотехнологии. Напротив, представители родов *Methylomarinum* и *Methylomarinovum* демонстрируют наиболее подходящие для биотехнологических применений значения содержания соли в среде и скорости роста. Однако, их продуктивность является крайне низкой, составляя максимум OD<sub>600</sub> 0.2 (Hirayama *et al.*, 2013; Hirayama *et al.*, 2014), что также делает их непригодными в биотехнологиях.

Среди всех перечисленных выше метанотрофов, представители рода *Methylovivimicrobium* больше всего подходят для промышленного применения, обладая такими характеристиками, как высокая скорость роста, высокая продуктивность, широкий диапазон роста NaCl. Именно благодаря этому *Mt. alcaliphilum* 20Z<sup>T</sup> стал одним из модельных организмов в исследованиях метанотрофов и практических аспектов их использования. Недостатком представителей этого рода в контексте использования в биотехнологических процессах является их оптимум роста в щелочном диапазоне pH~9.0,

что требует дополнительных затрат для коррекции кислотности среды, увеличивает эксплуатационные затраты и ограничивает совместимость с уже имеющимися технологиями производства белка одноклеточных на основе метанотрофии.

Таким образом, важным представляется поиск галотолерантных и галофильных бактерий, демонстрирующих устойчивый, быстрый и продуктивный рост на нейтральных средах, сопоставимых с составом морской воды. Способность таких метанотрофов к росту на морской или солоноватой воде открывает перспективы для создания на их основе биотехнологических процессов в условиях нехватки или отсутствия пресной воды и расширяет географию применения.

## ГЛАВА 2. МЕТАБОЛИЗМ АЭРОБНЫХ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

Способность использовать метан как источник углерода и энергии всегда считалась одной из самых уникальных способностей микроорганизмов. Основные элементы путей утилизации метана были четко установлены к началу 1980-х годов (Anthony, 1982). За последние десятилетия подходы системной биологии, биохимии, молекулярной биологии, спектроскопии помогли лучше понять молекулярные механизмы работы этих метаболических путей (Tucci and Rosenzweig, 2024). В накопленном на настоящий момент огромном объеме информации об использовании метана микроорганизмами, однако, остается множество загадок и исключений, которые бросают вызов исследователям метанотрофии.

Окисление  $\text{CH}_4$  осуществляется при помощи ферментов метанмонооксигеназ (ММО) (Рисунок 2). Первая форма этого фермента – медь-зависимая мембрансвязанная ММО (мММО), вторая – растворимая ММО, в активном центре которой содержится железо (рММО) (Culpepper and Rosenzweig 2012; Sirajuddin and Rosenzweig 2015; Tucci and Rosenzweig, 2024). мММО имеется у подавляющего большинства изученных метанотрофов за исключением бактерий родов *Methylocella* и *Methyloferula* (Dedysh *et al.*, 2000; Dedysh *et al.*, 2004). У нескольких представителей метаноокисляющих бактерий присутствуют обе формы метанмонооксигеназы, при том известно, что медь ( $\text{Cu}^{2+}$ ) является ключевым фактором регуляции экспрессии генов, кодирующих как мММО, так и рММО, а также активности этих ферментов (Semrau *et al.*, 2010; Hur *et al.*, 2017; Ro, Rosenzweig, 2018; Nguyen *et al.*, 2019). Оба фермента нуждаются в кислороде, один атом которого восстанавливается до воды, второй включается в субстрат, образуя метанол, который далее окисляется в формальдегид с помощью PQQ-зависимой метанолдегидрогеназы (МДГ) (Chistoserdova, 2011). Хотя классическая МДГ и кодирующие ее гены *mxaFI* наиболее широко распространены у метанотрофов и наиболее детально изучены, существует и другая форма МДГ (Mdh2, кодируемая генами *hox*), имеющаяся у целого ряда видов метанотрофов (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008a; Semrau *et al.*, 2018). Окисление метана тесно связано с ассимиляцией углерода, которое происходит на уровне окисления до формальдегида (Chistoserdova and Lidstrom, 2013; Kalyuzhnaya *et al.*, 2015). У некоторых видов формальдегид включается во фруктозо-6-фосфат в ходе двухэтапной реакции, управляемой одним слитым или двумя отдельными ферментами,

гексулозофосфатсинтазой и изомеразой (Rozova *et al.*, 2017). Эти два этапа ассимиляции составляют основу рибулозомонофосфатного пути (РМФ), характерного для представителей класса *Gamma*proteobacteria, который дополнительно включает реакции пентозофосфатного пути (ПФП) и по крайней мере один из гликолитических путей. Таким образом, углерод метана включается в пути катаболизма сахаров для регенерации окислительно-восстановительного потенциала или производства основных предшественников для биосинтеза.

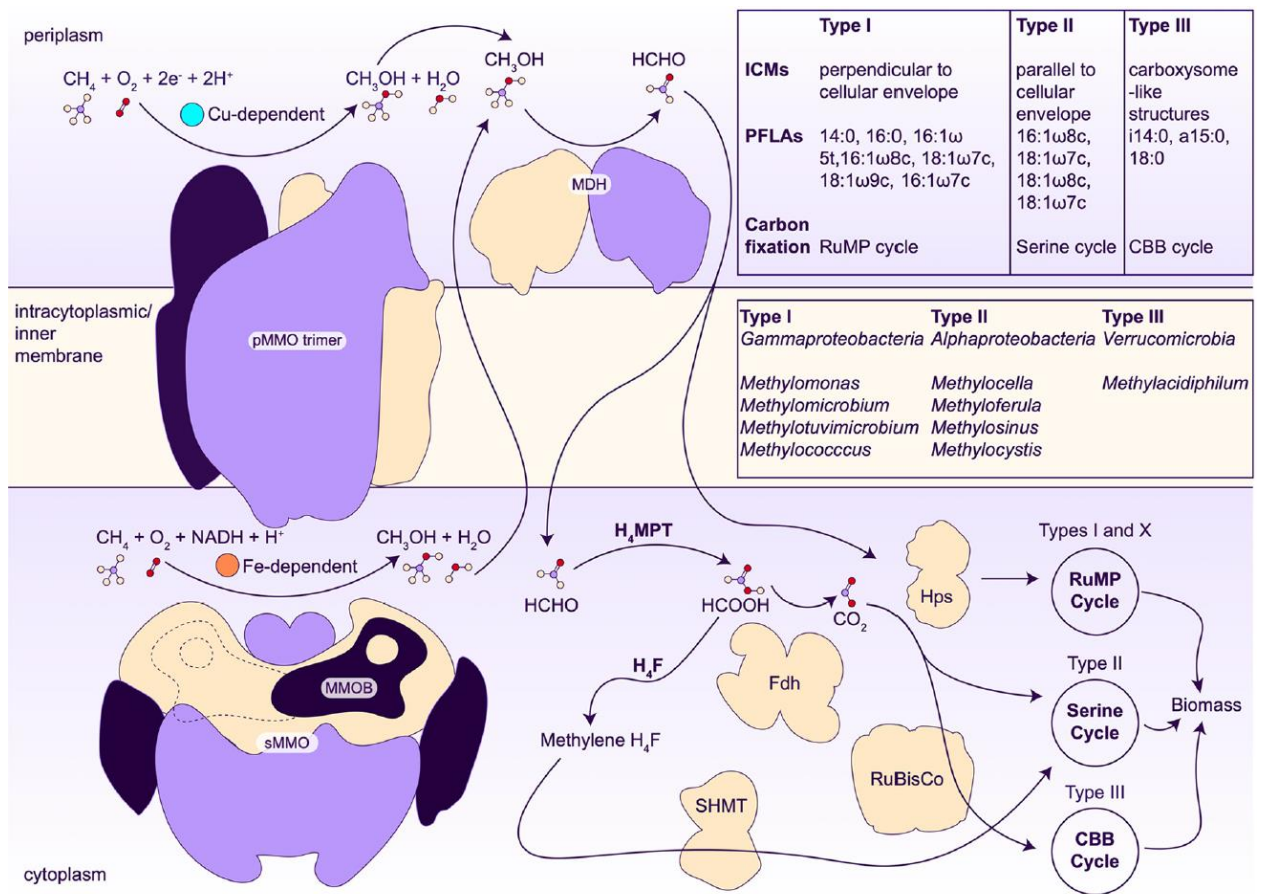


Рисунок 2 – Метаболические пути метанотрофов. Тример мММО имеет симметричную организацию. рММО составляет комплекс вместе с регуляторным белком В (ММОВ). MDH – метанолдегидрогеназа; ICM – внутрицитоплазматические мембраны; PFLA – фосфолипидные жирные кислоты; RuMP – рибулозомонофосфат; CBB – цикл Кальвина-Бенсона-Басшама; H<sub>4</sub>MPT – тетрагидрометаноптериновый путь; H<sub>4</sub>F – тетрагидрофолатный путь; Fdh – формиатдегидрогеназа; SHMT – серингидроксиметилтрансфераза; Hps – гексулозо-6-фосфатсинтаза; RuBisCo – рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза. Цитировано по Tucci and Rosenzweig, 2024.

У большинства известных представителей *Alphaproteobacteria*, утилизирующих метан при помощи серинового цикла, формальдегид сначала окисляется до формиата,

который затем включается в биомассу посредством реакций переноса C<sub>1</sub>-соединений при помощи тетрагидрофолата (Matsen *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Было высказано предположение, что для того, чтобы быть эффективным и самоподдерживающимся путем утилизации C<sub>1</sub>-соединения, сериновый цикл должен быть связан с путем регенерации глиоксилата, таким как глиоксилатный шунт (GS) или этилмалонил-КоА путь (EMC) (Anthony, 1982; Erb *et al.*, 2007). Оба варианта серинового цикла, связанные с путями GS или EMC, были идентифицированы у метанотрофов. Генетические детерминанты ключевых ферментов серинового пути также были обнаружены в геномах метанотрофных *Gammaproteobacteria*, однако ни один из них не указывает на наличие известного пути регенерации глиоксилата (Kalyuzhnaya *et al.*, 2015).

Все метанотрофные представители *Verrucomicrobiota* и некоторые *Pseudomonadota* являются автотрофами, ассимилирующими CO<sub>2</sub> в цикле Кальвина (Taylor *et al.*, 1981; Vorobev *et al.*, 2011). Представители филума *Verrucomicrobiota* – *Methylacidiphilum* и *Methylacidimicrobium* используют метан лишь в качестве источника энергии, окисляя его до углекислого газа с последующей его ассимиляцией (Khadem *et al.*, 2011).

Все три группы метанотрофов обладают функциональными циклами трикарбоновых кислот и достаточно сложными и часто избыточными наборами систем переноса электронов. Предполагается, что электроны в результате окисления метана переносятся на кислород, восстанавливая энергию для биосинтеза.

Было предсказано, что базовые энергетические потребности для окисления метана относительно высоки, и около четверти утилизируемого CH<sub>4</sub> используется для поддержания функций метаболически активного состояния клетки (Akberdin *et al.*, 2018). Этим можно объяснить сохранение многочисленных PP<sub>i</sub>-зависимых реакций у всех основных групп метанотрофов. Предполагаемые затраты энергии, зависящие от роста, попадают в диапазон, типичный для многих видов микроорганизмов (Akberdin *et al.*, 2018).

## 2.1. Мембранная метанмонооксигеназа

Ключевым ферментом окисления метана метанотрофными бактериями является мембранная метанмонооксигеназа. Впервые она была выделена и охарактеризована из бактерии *Methylococcus capsulatus* Bath (Semrau *et al.*, 1995; Semrau *et al.*, 2010). мММО локализуется в многочисленных внутрицитоплазматических мембранах метанотрофов,



составляя значительную долю всего белка клеток. Так, мММО у *Methylococcus capsulatus* Bath составляет около 80% белка всех мембран бактерии и 20% от общего клеточного белка (Yu *et al.*, 2003; Martinho *et al.*, 2007). Данные показывают, что внутрицитоплазматические мембраны (ИСМ) происходят непосредственно из внутренней клеточной мембраны, где мММО собирается в упорядоченный гексагональный массив, причем именно наличие ионов меди активизирует их активное образование (Zhu *et al.*, 2022). Таким образом, в физиологии метанотрофов медь играет очень важную роль, поэтому в условиях дефицита этого элемента бактерии начинают синтезировать метанобактин. Эти специализированные пептиды способны с высоким средством связывать ионы меди из окружающей среды, минералов или даже стекла (Tucci and Rosenzweig, 2024). Кроме того, метанотрофные бактерии, имеющие обе формы ММО способны переключаться с одной на другую в зависимости от соотношения содержания Cu в среде к биомассе – такое явление носит название «медный переключатель». При снижении концентрации меди <1 мкМ активизируется рММО, при концентрации >5 мкМ – мММО (Tucci and Rosenzweig, 2024).

Фермент мММО является медь-зависимым и представляет собой тример (массой 300 кДа), состоящий из следующих субъединиц – PmoA ( $\beta$ ); PmoB ( $\alpha$ ); PmoC ( $\gamma$ ), кодируемых опероном *pmoCAB* (Park and Lee, 2013). Анализ мембранных метанмонооксигеназ различных метанотрофных бактерий показал наличие трех центров связывания меди (Ro *et al.*, 2018). Одним из центров связывания меди является PmoB, обладающий двумя медьсодержащими сайтами – bis-His и Cu<sub>v</sub>, причем первый присутствует только у представителей *Gammaproteobacteria*, а второй – отсутствует у представителей *Verrucomicrobiota* (Koo *et al.*, 2022). Оба сайта не являются консервативными для группы метанооксиляющих бактерий. Напротив, одна аспарагиновая кислота и два гистидиновых лиганда третьего сайта, Cu<sub>s</sub>, расположенного в PmoC, строго консервативны. Геометрия этого сайта с повышенной активностью в нем процесса окисления метана предположительно может говорить о том, что именно PmoC является активным медьсодержащим центром фермента (Ross *et al.*, 2019, Jodts *et al.*, 2021).

Несмотря на то, что последовательность превращения субстрата в ходе его окисления и ассимиляции известна, до конца остается неясным механизм переноса электронов, в котором нуждается фермент для превращения метана в метанол. Сложность

изучения мММО заключается в конформационных изменениях, которым подвергается фермент в ходе выделения и очистки. Это пока не позволяет детально изучить процесс связывания метана с кислородом в мембранном окружении (Koo and Rosenzweig, 2021). В последние годы, однако, появились данные о выделении активных препаратов мММО при помощи липидных нанодисков, что позволяет более детально изучать процесс окисления метана (Koo *et al.*, 2022). Именно приближение к нативным условиям может помочь в понимании механизма сборки и активности мММО. Это станет неотъемлемой частью будущих работ по использованию метанотрофов в биотехнологии, например, по производству метанола в условиях атмосферного давления и температуры (Zhu *et al.*, 2022).

Филогения кодирующего мММО гена *pmoA* (McDonald *et al.*, 1995) хорошо соответствует филогении метанотрофных бактерий на основе генов 16S рРНК, что показано на рисунке 3. Это позволяет использовать ген *pmoA* в качестве мишени для молекулярных исследований (Dedysh and Knief, 2018). Последние данные о высокой консервативности гена *pmoC*, возможно, также смогут в будущем помочь в исследованиях молекулярной экологии и разнообразия этой группы бактерий в различных биотопах.

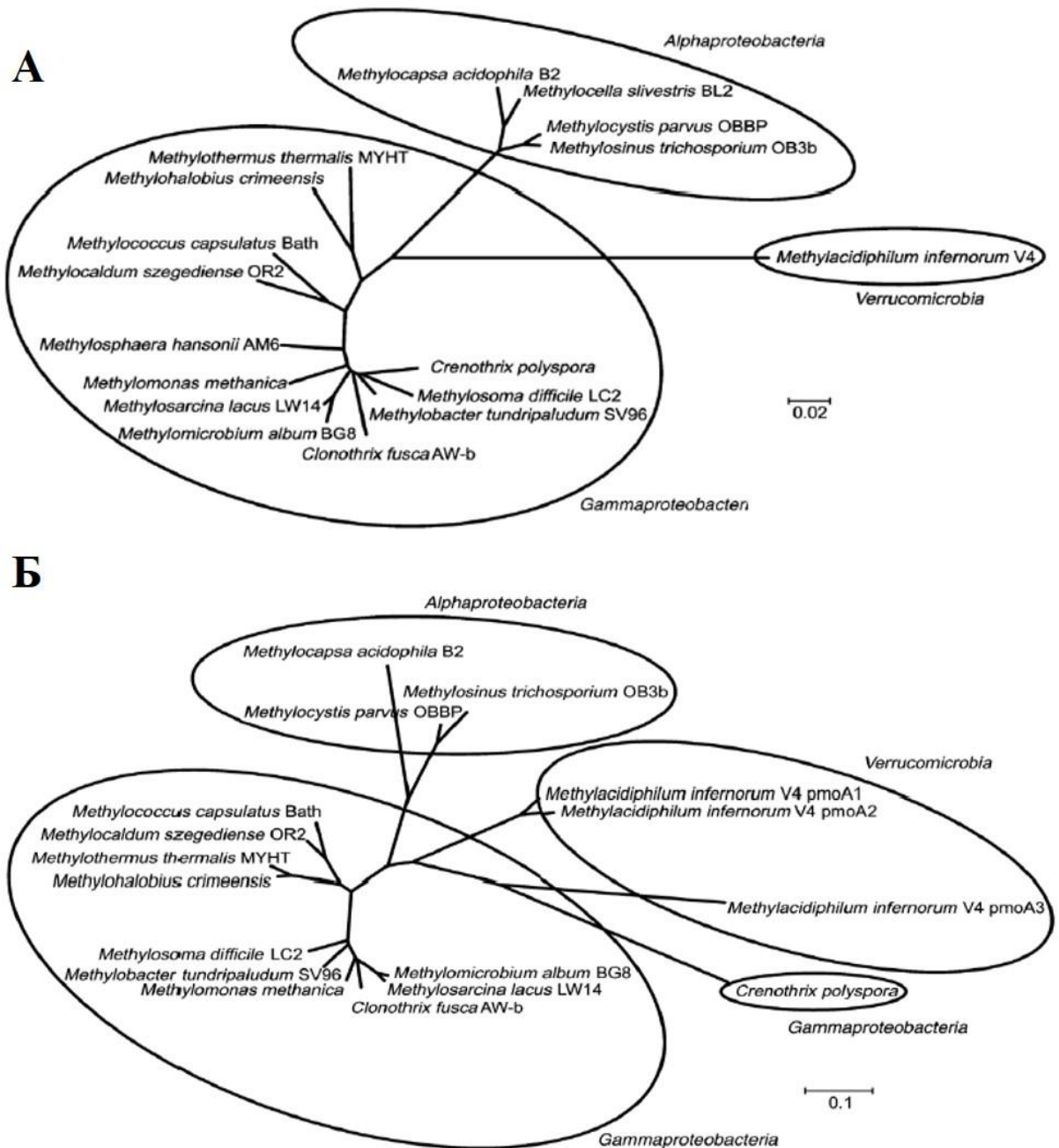


Рисунок 3 – Филогенетические дендрогаммы, построенные на основе сравнения генов 16S рНК (А) и генов *pmoA* (Б) метанотрофных бактерий. Цитировано по Semrau *et al.*, 2010.

## 2.2. Растворимая метанмонооксигеназа

рММО представляет собой хорошо охарактеризованный трехкомпонентный фермент, состоящий из гидроксилазы (активный центр MmoH), редуктазы (MmoR) и регуляторного белка (MmoB) (Chatwood *et al.*, 2004). В течение многих лет кинетика и спектроскопия рММО была в фокусе работ многих исследователей, что привело к относительно полному пониманию механизма работы фермента. Компоненты гидроксилазы кодируются опероном *mtoXYZ* и состоит из трех субъединиц с

молекулярными массами приблизительно 54 кДа ( $\alpha$ -субъединица), 42 кДа ( $\beta$ -субъединица) и 22 кДа ( $\gamma$ -субъединица), образуя молекулярную структуру субъединицы  $(\alpha\beta\gamma)_2$  (Park and Lee, 2013). Спектроскопическими и рентгеноструктурными исследованиями установлено, что полипептид гидроксилазы массой 54 кДа содержит двухядерный каталитический центр железа с кислородными мостиками в качестве сайта катализа  $\text{CH}_4$  (Elango *et al.*, 1997; Tucci and Rosenzweig, 2024). Рентгеноструктурная кристаллография гидроксилаз из *Ms. capsulatus* и *Ms. trichosporium* показала, что гидроксилаза представляет собой преимущественно  $\alpha$ -спиральную структуру, в которой двухядерные центры железа расположены внутри  $\alpha$ -субъединиц в гидрофобном кармане, что почти наверняка имеет решающее значение для связывания субстратов (Dalton, 2005).

Редуктазный компонент передает электроны в активный центр MmoH, является NADH-зависимым и состоит из одного полипептида с молекулярной массой 40 кДа, содержащего кофакторы FAD и Fe-S (Fox *et al.*, 1989).

Регуляторный белок (MmoB) – не имеет простетических групп. Структурный анализ, сделанный при помощи ядерного магнитного резонанса (ЯМР), показал, что он имеет основную  $\alpha/\beta$  структуру с высококомобильными областями на N- и C-концах (Chang *et al.*, 1999). Связывание MmoB с MmoH изменяет электронную структуру и снижает восстановительный потенциал ди-Fe центра (Lee *et al.*, 2013). Кратко механизм работы рММО представлен на Рисунке 4.

В состоянии покоя фермента центр ди-Fe находится в трехвалентном состоянии ( $\text{Fe}_2^{\text{III}} - \text{H}^{\text{ox}}$ ) (Woodland *et al.*, 1986) и должен быть восстановлен до двухвалентной формы ( $\text{Fe}_2^{\text{II}} - \text{H}^{\text{red}}$ ), чтобы позволить  $\text{O}_2$  с ним связываться. Два электрона, необходимые для этого восстановления, поступают из NAD(P)H через MmoR, который действует как трансфераза, позволяя использовать двухэлектронное окисление NAD(P)H для подачи отдельных электронов в ди-Fe центр гидроксилазы. Затем  $\text{O}_2$  связывается с гидроксилазой через соединение **O**, но не присоединяется ковалентно к биядерному центру железа. В соединении **P\*** центр биядерного железа может находиться в ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) или смешанно-валентном ( $\text{Fe}^{\text{II}} \text{Fe}^{\text{III}}$ ) состоянии (Brazeau & Lipscomb 2000). На этой стадии  $\text{O}_2$ , вероятно, ковалентно связан с биядерным железным центром в форме непротонированной мостиковой пероксогруппы. Превращение соединения **P\*** в **P** требует протонирования пероксидов перед разрывом связи O–O, который происходит при распаде соединения **P**. Затем **P** превращается в соединение **Q**, кинетически компетентную форму ди-Fe центра,

который насыщает кислородом метан и другие субстраты. В отсутствие субстрата он поразительно стабилен ( $t_{1/2} \approx 14$  с при  $4^\circ\text{C}$ ) для такого мощного окислителя в водном растворе. Соединение **T** — вид, с которым связан продукт реакции — наблюдалось при исследовании фермента *Ms. trichosporium* с использованием хромогенного субстрата нитробензола (Lee *et al.*, 1993).

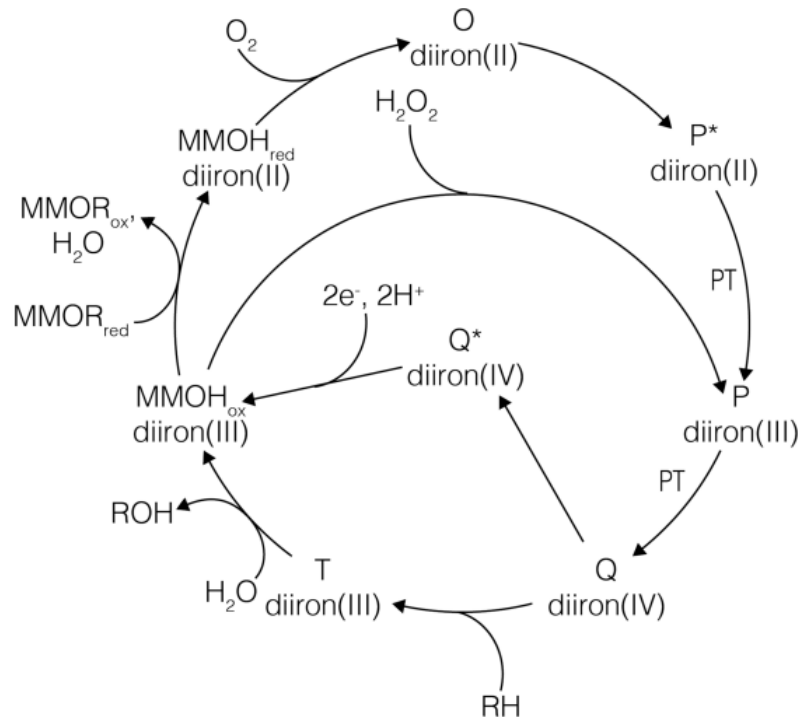


Рисунок 4 – Каталитический цикл рММО. Обозначения: PT – перенос протона, RH – субстрат, ROH – гидроксированный продукт. Цитировано по Lawton and Rosenzweig, 2016.

### 2.3. Окисление метанола

Следующим этапом конверсии метана является окисление полученного в предыдущей реакции метанола до формальдегида ферментом метанолдегидрогеназой (МДГ), которая локализуется в периплазматическом пространстве. Существует две изоформы данного фермента: MxaFI-МДГ и XoxF-МДГ. Оба фермента содержат пирролохинолинхинон (PQQ) в своем каталитическом центре, который выполняет функцию посредника в передаче электронов от окисления метанола на цитохром (Skovran *et al.*, 2019). Данные изоформы широко распространены среди метанотрофных бактерий, и, зачастую, присутствуют сразу оба фермента.

МхаFI-МДГ, гетеротетрамерная форма ( $\alpha_2\beta_2$ ), состоящая из двух больших ( $\alpha$ , МхаF) и двух малых ( $\beta$ , МхаI) субъединиц, была детально изучена на примере грамотрицательных метилотрофных бактерий. Большие субъединицы МхаF связывают PQQ и ионы кальция в качестве кофактора, по одному на каждую, роль же малых субъединиц, плотно прилегающих к двум другим, пока не ясна (Keltjens, 2014). Фермент имеет высокую специфичность к субстрату – спиртам C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> и наибольшую активность проявляет в щелочной среде (Anthony and Williams, 2003).

Анализ последовательностей геномов метанотрофов позволили предположить существование изофермента МДГ, ХохF-МДГ (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008b), который не имеет малой субъединицы и демонстрирует менее чем 50% идентичности последовательности с МхаF. Тем не менее, все аминокислоты, идентифицированные в МхаF как важные лиганды для связывания PQQ- и Ca<sup>2+</sup>, а также для катализа, консервативны в ХохF-МДГ. Данная изоформа филогенетически разнообразна, можно выделить как минимум пять клад (Chistoserdova, 2011). Гены, кодирующие эти белки, также могут быть обнаружены в геномах микроорганизмов, у которых до сих пор не обнаружена способность к конверсии метанола. Функция белков ХохF долгое время была неизвестна. В модельных организмах ХохF практически не экспрессировалась во время роста в лабораторных условиях (Chistoserdova and Lidstrom, 1997). Однако гены *XoxF* широко экспрессируются в естественных средах обитания, особенно у микроорганизмов, ассоциированных с корневыми системами растений (Vorholt, 2012). Ключом к пониманию функциональности этого фермента стала делеция гена *MxaF* у *Methylobacterium extorquens*, что привело к утрате способности этого метилотрофа к росту в среде с метанолом, однако, добавление редкоземельных элементов (РЗЭ), таких как лантан (La<sup>3+</sup>) и церий (Ce<sup>3+</sup>) привело к восстановлению способности утилизировать субстрат (Nakagawa *et al.*, 2012). Добавление РЗЭ (Ce<sup>3+</sup>) приводило к активации гена *XoxF* и у других бактерий. Присутствие лантаноида в качестве кофактора может придавать ХохF-МДГ каталитическую эффективность ( $k_{cat}/K_m$ ) в окислении метанола, превосходящую их кальций-содержащие аналоги МхаFI, окисляя метанол сразу до формиата, минуя стадию формальдегида. Кроме того, присутствие этих тяжёлых металлов полностью подавляет экспрессию МхаFI-МДГ (Keltjens, 2014). Исследование данного фермента показало очень высокую степень сродства к метанолу, а также

наибольшую активность в нейтральном значении pH и неспособность более тяжелых лантаноидов, кроме  $\text{La}^{3+}$  и  $\text{Ce}^{3+}$ , исполнять роль кофактора (Vu *et al.*, 2016).

#### 2.4. Окисление формальдегида

Быстрое окисление формальдегида (НСОН) является важным этапом в ассимиляции метана, из-за реактивности к аминогруппам белков и основаниям нуклеиновых кислот данное вещество является крайне токсичным, поэтому у метанотрофов должны существовать механизмы его эффективной детоксикации. Окисление НСОН до  $\text{CO}_2$  происходит в цитоплазме клеток и позволяет получить большую часть восстановительных эквивалентов (Chistoserdova, 2011). Кроме того, НСОН является главным одноуглеродным соединением, первично вовлекаемым в ассимиляционные пути, такие как РМФ и сериновый (Троценко и др., 2010).

Как говорилось ранее, метанотрофы обладают несколькими путями ассимиляции формальдегида. Ферменты, которые способны это осуществлять, делятся на две группы:  $\text{NAD(P)}^+$ -специфичные и связанные с цитохромами.  $\text{NAD(P)}^+$ -специфичные – различаются в зависимости от кофакторов: тетрагидрофолаты (ТГФ), тетрагидрометаноптерин (ТГМП) или тиоспирты (Trotsenko and Murrel, 2008).

Окисление формальдегида у метанотрофов класса *Gamma*proteobacteria представлено рибулозомонофосфатным циклом до образования углекислоты, без участия формальдегиддегидрогеназ и формиатдегидрогеназ (Рисунок 5).

Диссимиляционный РМФ-цикл начинается с альдольной конденсации с участием гексулозофосфатсинтазы (ГФС), в результате чего формальдегид и рибулозо-5-фосфат преобразуются в 3-гексело-6-фосфат. Дальнейшие реакции катализируются следующими ферментами: 3-гексуло-6-фосфатизомеразой, глюкозо-6-фосфатизомеразой, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой, 6-фосфоглюконатдегидрогеназой. В результате цикла из 1 молекулы НСООН образуется 1 молекула  $\text{CO}_2$  и 2 молекулы  $\text{NAD(F)H}_2$ , при этом восстанавливается рибулозо-5-фосфат.

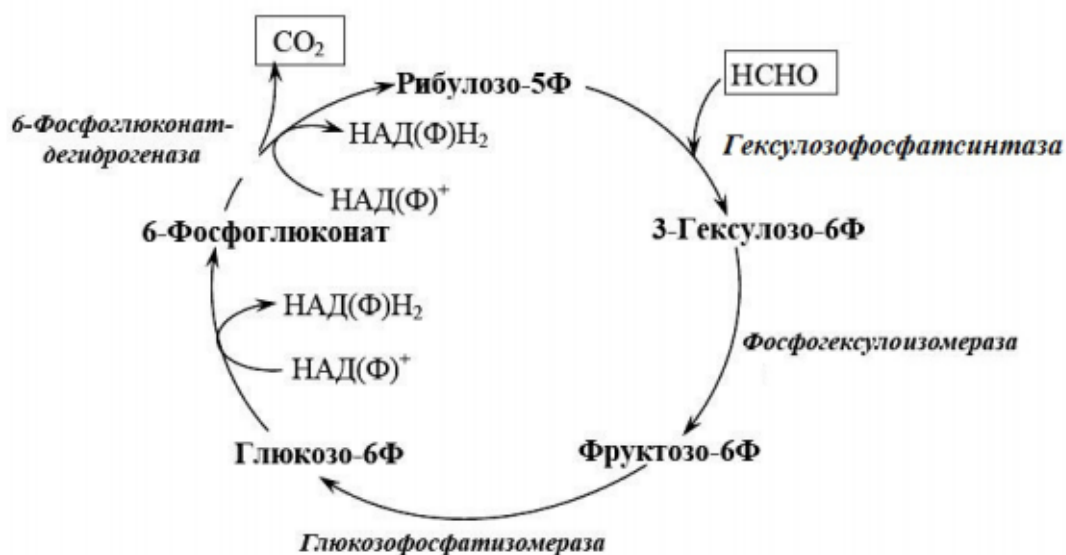


Рисунок 5 – Диссимиляционный РМФ-цикл окисления формальдегида. Цитировано по Троценко и др., 2010.

У метанотрофов также представлены птеринзависимые пути окисления формальдегида – тетрагидрофолат (ТГФ)- и тетрагидрометаноптериновый (ТГМП)-пути (Рисунок 6).

Реакция конденсации ТГФ с  $C_1$ -соединениями имеет повсеместное распространение среди организмов, поскольку является важной частью образования пуринов. У метанотрофных организмов реакции данного пути происходят в следующем порядке:  $N^5$ -метил-;  $N^5$ ,  $N^{10}$ -метилен-;  $N^5$ ,  $N^{10}$ -метенил-;  $N^{10}$ -формил-тетрагидрофолат; формиат ( $HCOOH$ ),  $CO_2$ . Данные реакции катализируются  $NAD^+$ -зависимой метилен-ТГФ-дегидрогеназой (MtdA), метенил-ТГФ-циклогидролазой (Fch),  $N^{10}$ -формил-ТГФ-синтазой (FtfL) и формиатдегидрогеназой (Fdh) и являются полностью обратимыми. Интересно, что на данный момент обнаруживается 4 типа формиатдегидрогеназ: W-содержащие, цитохром-связанные и два Mo-содержащих (Chistoserdova *et al.*, 2007).

Тетрагидрометаноптерин-зависимый путь впервые был обнаружен у сульфатредуцирующих и метаногенных архей, в метаболизме которых он выполняет ключевую роль. Этот путь реализуется практически у всех метанотрофных бактерий и предполагается, что гены, кодирующие ферменты пути, были получены горизонтальным переносом от архей (Vorholt, 2002).



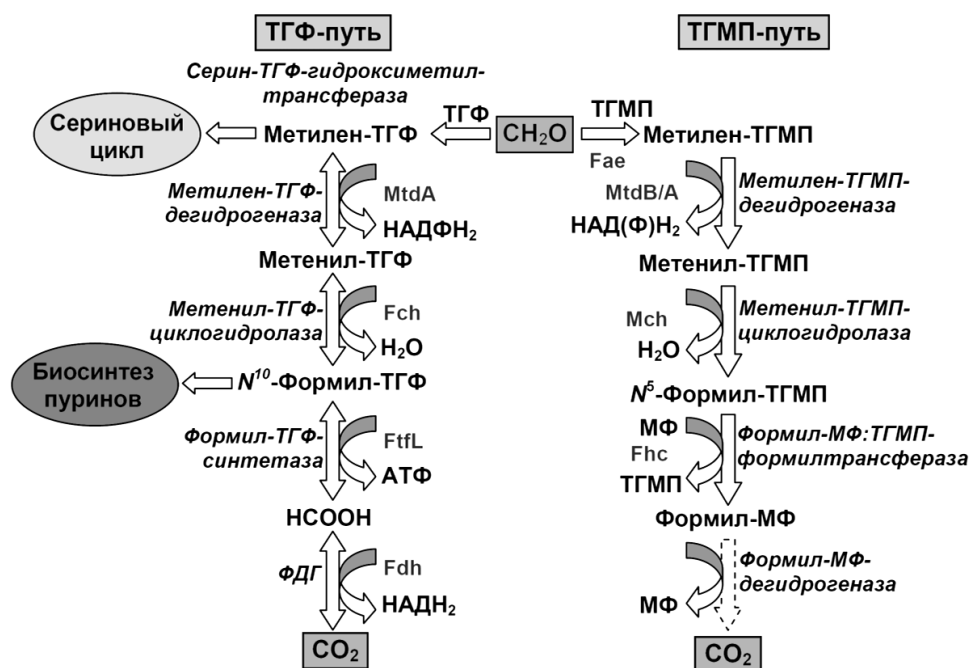


Рисунок 6 – Тетрагидрофолатный (ТГФ) и тетрагидрометаноптеринового (ТГМП) пути ассимиляции формальдегида. ФДГ – формиатдегидрогеназа, МФ – метанофуран. Цитировано с изменениями по Vorholt *et al.*, 1998.

Реакции пути начинаются с конденсации формальдегида с ТГМП, которую инициирует формальдегидактивирующий фермент (Fae), и образованием N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-метилден-ТГМП. Далее продукт окисляется NAD(P)<sup>+</sup>-зависимой метилден-ТГМП-дегидрогеназой (MtdB/A) до N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-метенил-ТГМП. Далее метенил-ТГМП-циклогидролаза (Mch) гидролизует его с превращением в N<sup>5</sup>-формил-ТГМП. Затем формилтрансферазный/дегидрогеназный комплекс (Fhc) преобразует продукт предыдущей реакции до формиата, с промежуточным звеном – формил-метанраном. Полученный в ходе формиат может быть утилизирован одной из двух NAD<sup>+</sup>-зависимых формиатдегидрогеназ (ФДГ): вольфрам-зависимой, либо молибден-зависимой. Только одна реакция – N<sup>5</sup>-формил-ТГМП ↔ формил-МФ, является обратимой во всей цепи превращений ТГМП-пути (Троценко *и др.*, 2010). В результате образуется 1NAD(F)H<sub>2</sub>.

Оба этих пути выполняют роль детоксикации формальдегида. Также важно отметить, что у метанотрофов ферменты ТГФ-пути, по сравнению с ферментами ТГМП-пути, являются малоактивными, несмотря на «прямоту» протекаемых реакций формальдегид – углекислый газ, что говорит о том, что ТГМП-путь – это основной механизм окисления НСООН, либо конечный продукт может быть преобразован в метилден-ТГФ в ходе его обратимых реакций, как субстрат серинового пути. Из этого

можно предположить, что ТГФ-путь выполняет преимущественно процессы трансметилирования (Vorholt, 2002). Доказательством этого являются эксперименты с *Methylobacterium extorquens* AM1, у которого большая часть НСООН окислялась до СО<sub>2</sub> через ТГМП-механизм («длинный путь»), «прямой путь» активизировался лишь при избытке субстрата. Таким образом, пока неактивен ассимиляционный путь, клетка успешно утилизирует токсичный продукт окисления метанола диссимиляционным путем до СО<sub>2</sub> с образованием восстановительных эквивалентов (Троценко и др., 2010).

Интересным является и то, что для филума *Verrucomicrobiota* показано отсутствие генов *Fch* и *MtdA*, что компенсируется присутствием гена *fold*, кодирующим схожую по функциям метилен-ТГФ-дегидрогеназу/метенил-ТГФ-циклогидролазу.

## 2.5. Пути ассимиляции С<sub>1</sub>-соединений у метанотрофных бактерий

Ассимиляция одноуглеродных соединений у метанотрофов представлена их преобразованием в триозофосфат (С<sub>3</sub>) тремя вариантами (Рисунок 7):

1. Рибулозомонофосфатный цикл;
2. Сериновый цикл;
3. Рибулозобисфосфатный цикл.

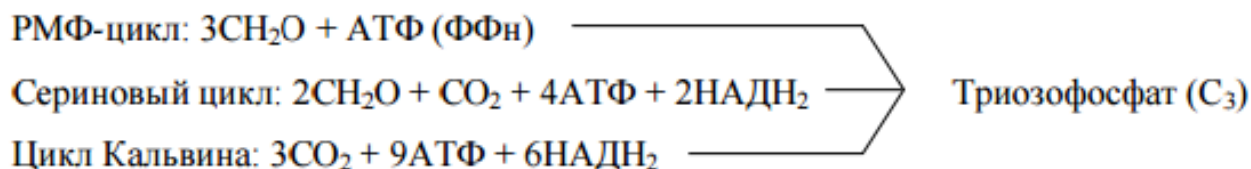


Рисунок 7 – Энергетические потребности первичных путей С<sub>1</sub>-ассимиляции. Цитировано по Троценко и др., 2010.

### Рибулозомонофосфатный цикл (РМФ).

Как говорилось ранее, рибулозомонофосфатный цикл (Рисунок 8) осуществляется метанотрофными бактериями I типа, принадлежащими к классу *Gamma proteobacteria*. Цикл инициируется синтазой 3-гексулозофосфата (ГФС) в реакции альдольной конденсации формальдегида с рибулозо-5-фосфатом, с образованием 3-гексулозо-6-фосфата, дальнейшее превращение которого заключается в образовании фруктозо-6-

фосфата по воздействию фермента гексулозофосфатизомеразы (ФГИ). Ферменты начала пути РМФ, ГФС и ФГИ, характерны только для метанотрофов I типа и соответствуют слитому гену *hps-phi*, что, по-видимому, связано с высокой нестабильностью промежуточного вещества.

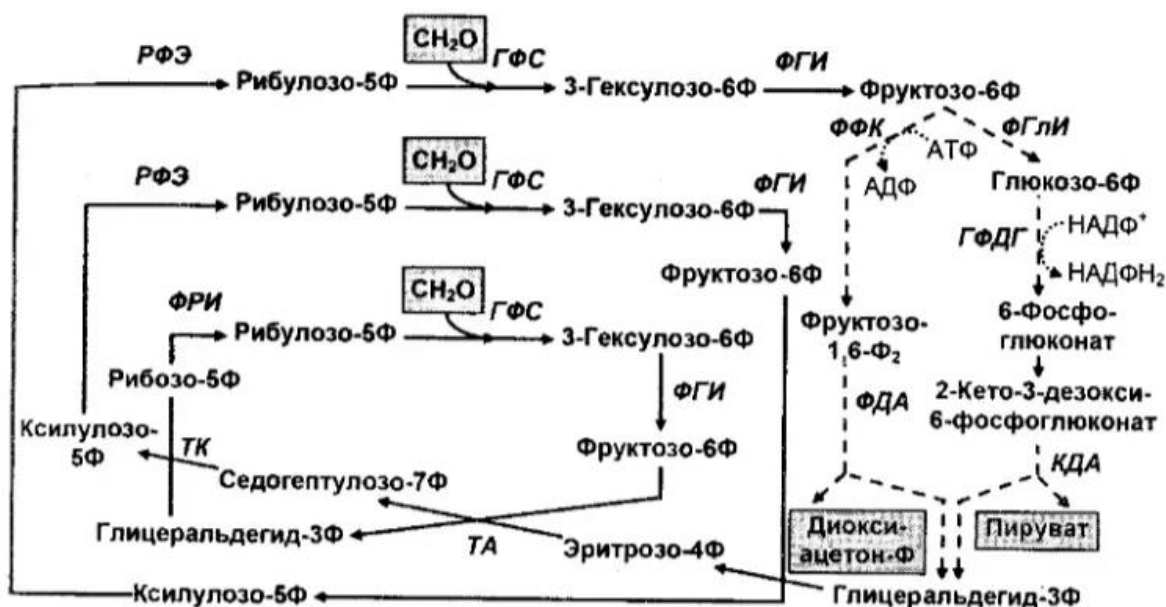


Рисунок 8 – Рибулозимонофосфатный цикл фиксации формальдегида. РФЭ – рибозофосфатэпимераза, ГФС – гексулозофосфатсинтаза, ФГИ – гексулозофосфатизомеразы, ФФК – пиррофосфатзависимая фосфофруктокиназа, ФГЛИ – фосфоглюкоизомеразы, ГФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ФДА – фруктозо-1,6-бисфосфатальдолыза, ТА – трансальдолыза, ТК – транскетолыза, ФРИ – рибозофосфатизомеразы, КДА – 2-кето-3-дезоксифосфоглюконатальдолыза. Цитировано по Троценко и др, 2010.

С образованием фруктозо-6-фосфата реакции РМФ разделяются на пути конструктивного метаболизма  $C_1$ -соединений клетки, с образованием 3-глицеральдегидфосфата (ГАФ) и пирувата (ПВК), и на пути восстановления рибулозо-5-фосфата. В первом случае реакции идут с образованием промежуточного продукта 2-кето-3-дезоксиглюконата по пути КДФГ.

РМФ цикл условно разделен на три этапа: 1) «фиксация», описанный ранее; 2) «расщепление» с образованием двух молекул триоз, в котором выделяют пути Энтнера-Дудорова (ЭД), Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (ЭМП) и фосфокетолазного пути; 3) «перестройка» – происходит регенерация первичного акцептора в серии трансальдолазных (ТА)/транскетолазных (ТК) реакций.

### Сериновый цикл.

Сериновый путь является циклической цепью реакций и характерен для метанотрофных бактерий II типа, или *Alphaproteobacteria*. Примечательно, что промежуточными продуктами реакций серинового цикла являются органические кислоты и аминокислоты (Рисунок 9). Суммарно 1 молекула 3-ФГК образуется из 2 молекул HCOH и 1 молекулы CO<sub>2</sub>. Цикл представляет собой конденсацию формальдегида на глицине при участии серин-оксиметилтрансферазы, с образованием серина. Далее серин передает свою аминогруппу на глиоксилат посредством фермента серин-глиоксилат аминотрансферазы, с образованием гидроксипирувата, который под воздействием гидроксипируватредуктазы преобразуется в глицерат. Далее он фосфорилируется до фосфоглицерата (3-ФГК). Часть ФГК используется для биосинтеза веществ клетки, часть, при участии енолазы, превращается в фосфоенолпируват (ФЕП). Последний при помощи карбоксилирования CO<sub>2</sub> фосфоенолпируваткарбоксилазой преобразуется до оксалоацетата и дальнейшим его превращением через малат в ацетил-КоА и глиоксилат, необходимых в глиоксилатном шунте для восстановления глицина.

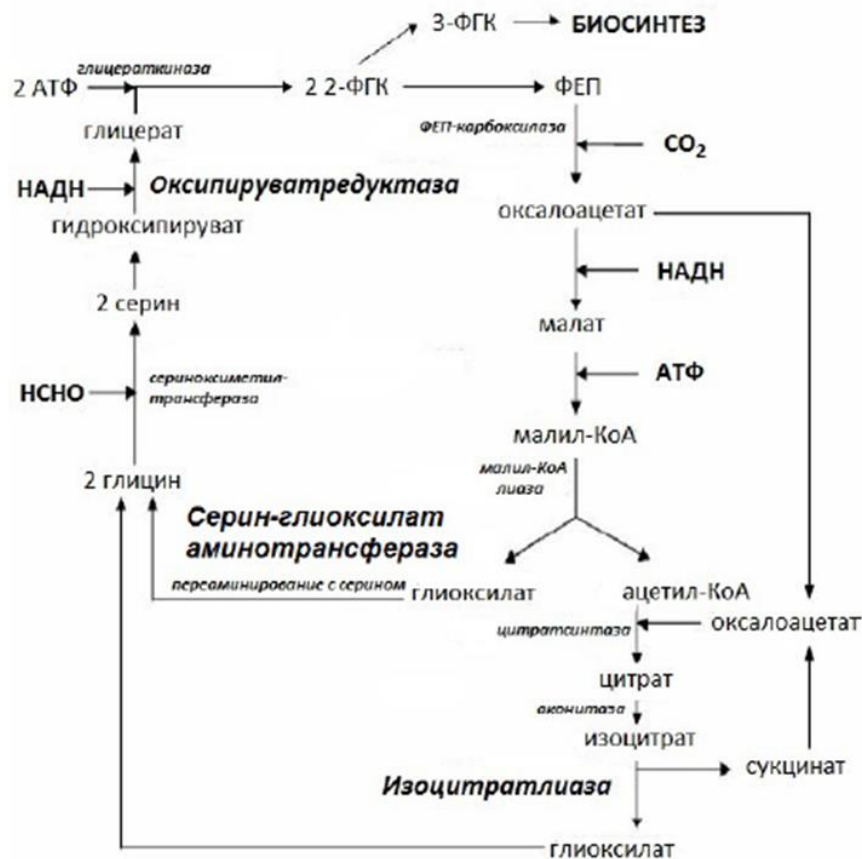


Рисунок 9 – Исоцитратлиазоположительный вариант (ицл<sup>+</sup>) серинового цикла. Цитировано по Троценко и др., 2010.

Регенерация глицина, первичного акцептора формальдегида, с использованием фермента изоцитратлиазы – не единственный способ (изоцитратлиазоположительный вариант). Обнаружен также этилмалонатный путь (изоцитратлиазонегативный вариант) восстановления через ацетоацетил-КоА и поли- $\beta$ -гидроксibuтират (ПГБ) – промежуточный продукт биосинтеза. Поскольку этилмалонил-КоА пути включает различные метаболические пути, требующие глиоксилатный цикл, включая реакции серинового пути, ЦТК и биосинтеза ПГБ – основного запасного материала многих прокариот, катализирующие их ферменты –  $\beta$ -кетотиолаза, ацетоацетил-КоА редуктаза – являются общими для перечисленных путей.

### **Рибулозобисфосфатный цикл (РБФ).**

Рибулозобисфосфатный цикл представлен автотрофной ассимиляцией углекислого газа метанотрофными бактериями филумов *Verrucomicrobiota* и NC10. Процесс менее энергетически выгоден по сравнению с другими вариантами, поскольку требует значительных трат АТФ и восстановительных эквивалентов, которые образуются в процессе окисления  $C_1$ -соединений до  $CO_2$  этими микроорганизмами. Однако, этот путь ассимиляции характерен и для некоторых метанотрофов филума *Pseudomonadota*, к примеру, рода *Methylococcus*.

Углекислота фиксируется реакцией карбоксилирования с рибулозо-1,5-бисфосфатом ферментом, близким с растительным и цианобактериальным, рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазой/оксигеназой (РубисКо), с образованием 3-фосфоглицерата (3-ФГК). Далее происходит восстановление 3-ФГК до 3-фосфоглицеральдегида (ГАФ) ферментами 3-фосфоглицераткиназой и ГАФ-дегидрогеназой. Последний идет как на нужды центрального метаболизма, так и на регенерацию рибулозо-1,5-бисфосфата посредством ферментов трансальдолазы, транскетолазы, седогептулозо-1,7-фосфотазы и др., замыкая цикл.

### ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

Аэробные метанотрофные бактерии населяют широкий спектр переувлажненных мест обитания, в которых доступен метан и кислород, участвуя в глобальном цикле углерода планеты. Способы обнаружения и идентификации этих бактерий являются важной частью микробиологических и экологических исследований (Murrell *et al.*, 1992).

Классическим методом идентификации представителей группы аэробных метанотрофных бактерий является выделение их в чистые культуры с последующей характеристикой физиологии, биохимии и генетики. Однако, выделение этих микроорганизмов в чистые культуры представляет собой долгий, рутинный, методически сложный процесс, занимающий до нескольких лет работы. Кроме того, отсутствует какая-либо универсальность в условиях и методах культивирования данных организмов, ввиду широкого спектра их ростовых потребностей (Дедыш, 2006). Следовательно, это вызывает потребность в их идентификации в микробном сообществе непосредственно *in situ*. Этого можно достичь непосредственной экстракцией ДНК/РНК из природных образцов для анализа содержания филогенетических и функциональных генов этой группы с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и соответствующих праймеров. Этот косвенный метод позволяет выявить тех метанотрофов, которых пока не удалось культивировать в искусственных лабораторных условиях (Graef *et al.*, 2011). Общеизвестным филогенетическим геном для идентификации бактерий признан ген 16S рРНК. Кроме него, есть возможность идентификации данной группы при помощи консервативных функциональных генов, таких как гены метанмонооксигеназ и метанолдегидрогеназ (McDonald *et al.*, 2008).

Методы, основанные на генах 16S рРНК и функциональных генах (*pmoA*, *mmoX*, – мембранная и растворимая формы метанмонооксигеназы, соответственно, и *mxaF* – метанолдегидрогеназа), являются основополагающими, поскольку их свойствами являются высокая специфичность и консервативность последовательности. Кроме того, крайне важным представляется наличие обширной базы данных этих генов. Наибольшая база данных собрана для гена 16S рРНК, поэтому его последовательность самая часто используемая, кроме того, разработаны праймеры, способные к детекции метанотрофных бактерий в пределах отдельных родов (Holmes *et al.*, 1995, Costello *et al.*, 1999) и классов

(для метанотрофов I и II типов) (Chen *et al.*, 2007). Однако, несмотря на большую базу данных и возможность определения таксономической принадлежности, ген 16S рРНК имеет большой недостаток в выявлении неизвестных групп метанотрофов в сообществе. Основные методы молекулярной биологии для их идентификации представлены на рисунке 10.



Рисунок 10 – Возможные методы молекулярной идентификации метанотрофных бактерий. Цитировано по Дедыш, 2006.

Для большего охвата всех представленных метанооксиляющих бактерий используются разработанные праймеры для функциональных генов, центральное место среди которых занимает ген *pmoA* – кодирующий одну из субъединиц мММО. Однако, использование этого гена не является универсальным для всех известных метанооксиляющих бактерий; исключением являются представители родов *Methyloferula* и *Methylocella*, обладающие только растворимой изоформой данного фермента. Праймеры A189f/A682r обеспечивают наиболее широкий охват мММО-содержащих метанотрофов (Holmes *et al.*, 1995). Как было сказано ранее (см. раздел 1.2.1), топология

филогенетического древа метанотрофных бактерий на основе 16S рРНК соответствует топологии древа, построенного на основании сравнительного анализа генов *pmoA*, что делает ген *pmoA* универсальным функциональным маркером этих бактерий. Минусом использования пары праймеров A189f/A682r является комплементарность и к филогенетически родственному гену *amoA* (кодирующему аммиакмонооксигеназу) (Holmes *et al.*, 1995). Тем не менее, использование пары A189f/mb661 для ре-амплификации полученных ПЦР продуктов может помочь повысить чувствительность подхода для выявления метанотрофов, поскольку она не детектирует *amoA* ген (Horz *et al.*, 2005).

Другой целью молекулярной идентификации метанотрофов являются гены растворимой ММО – *mmoXYZB*, разработанные на основе анализа соответствующих последовательностей из *Methylococcus capsulatus* Bath и *Methylosinus trichosporium* OB3b (McDonald *et al.*, 1995; Murrell *et al.*, 1998). Таким образом, были получены праймеры для гена *mmoX*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу рММО. Несмотря на такой недостаток, как ограниченное разнообразие метанотрофных бактерий, обладающих данным геном, праймеры могут помочь в поиске микроорганизмов, у которых присутствует только рММО.

Еще одной мишенью для молекулярной детекции, исторически первой, представляется ген *mxaF*, кодирующий большую субъединицу классической метанолдегидрогеназы MxaFI (McDonald *et al.*, 1995; Murrell *et al.*, 1998). Однако в настоящее время эти праймеры не используются для детекции аэробных метанотрофных бактерий. Это связано с отсутствием специфичности, поскольку они детектируют всех грамотрицательных метилотрофных бактерий. Гены *mxaF* метанотрофов и метилотрофов часто образуют общие кластеры, что затрудняет идентификацию организмов.



## ГЛАВА 4. РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ МЕТАНОТРОФОВ

Метанотрофные бактерии, способные использовать метан как единственный источник углерода и энергии, представляют значительный интерес для биотехнологии. Практический интерес к этой группе бактерий обусловлен их способностью служить продуцентами кормового белка, а также синтезировать полигидроксибутират (ПГБ), экзополисахариды (ЭПС), метанол, аминокислоты, такие как глутамат, аланин и эктоин, биодизель/липиды и каротиноиды (Xin *et al.*, 2004; Троценко и Хмеленина, 2008; Ye and Kelly, 2012; Park and Lee, 2013; Fei *et al.*, 2014; Tucci and Rosenzweig, 2024).

Однако эффективное использование этих организмов требует разработки надежных методов генетической модификации, так как подобные технологии неоднократно подтверждали свою эффективность для увеличения объема и качества требуемого продукта.

Первые попытки генетических модификаций метанотрофных бактерий были выполнены с использованием абиотических факторов мутагенеза, таких как ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, химические агенты. Подобным спонтанным мутагенезом удалось получить штаммы метанотрофных бактерий, резистентных к некоторым антибиотикам (Harwood *et al.*, 1972; Williams *et al.*, 1977). Эти методы, однако, оказались крайне неэффективны из-за высокой активности систем репарации ДНК у метанотрофов. В отличие от гетеротрофных бактерий, глубокий скрининг полученных модифицированных штаммов для анализа результатов также затруднен в случае метанотрофов.

До недавнего времени внесение точечных хромосомных мутаций в геном метанотрофных бактерий было недоступно, что связано с недостаточной изученностью их метаболических путей, сложностей культивирования, отсутствием референсных полногеномных данных, а также ограниченным арсеналом универсальных инструментов для генетической инженерии этих микроорганизмов. Совокупность этих факторов существенно затрудняла разработку высокоэффективных биотехнологических процессов конверсии метана в ценные химические соединения (Jeong *et al.*, 2023). Проблему составлял и тот факт, что из-за высокой плотности ВЦМ и/или S-слоев клеток метанотрофных бактерий неэффективна или невозможна оценка экспрессии с использованием репортерных генов, таких как LacZ, GFP и др. Однако, с течением

времени были накоплены знания относительно метаболизма, оптимальных условий трансформации, новых инструментов и методов редактирования, что привело к выявлению мишеней геномного редактирования. Открытия последних десятилетий позволили приблизиться к конструированию штаммов с новыми возможностями и биотехнологически ценными характеристиками (Хмеленина *и др.*, 2022).

#### **4.1. Двойная гомологичная рекомбинация на основе суицидального вектора**

В настоящее время самым распространенным и эффективным методом для направленной делеции гена в геномах метанотрофных бактерий является двойная гомологичная рекомбинация. В основе этого метода лежит способность к замене участка бактериальной хромосомы с целевым геном на гомологичную последовательность, содержащую вместо гена кассету устойчивости к селективному антибиотику. Кассету встраивают в участок между фланкирующими последовательностями («плечами») гена-мишени в суицидальном плазмидном векторе. Далее вектор трансформируют в целевой организм, где и происходит рекомбинация. Подобная манипуляция может быть применена к любому метанотрофу, для которого доступна полногеномная последовательность. К апробированным объектам относятся такие хорошо изученные метанотрофные бактерии, как *Methylovivimicrobium alcaliphilum* 20Z (Henard *et al.*, 2018; Henard *et al.*, 2019; But *et al.*, 2020), *Methylococcus capsulatus* Bath и MIR (Henard *et al.*, 2021; But *et al.*, 2024), *Methylosinus trichosporium* OB3b (Stafford *et al.*, 2003), *Methylomonas* sp. DH-1 (Nguyen *et al.*, 2019).

Недостатком этого метода является необходимость использования нескольких кассет устойчивости к антибиотикам в экспериментах со множественными делециями, что не всегда доступно.

#### **4.2. Безмаркерные мутации метанотрофных бактерий**

Система Cre-lox — это проверенная и широко используемая технология сайт-специфической рекомбиназы, которая была адаптирована из бактериофага P1 для использования в генной инженерии. Внесение хромосомных модификаций без маркеров позволяет вводить множественные мутации в геном бактерий, такие как делеции, вставки, транслокации и инверсии (Li *et al.*, 2020). Для подобных целей используют метод аллельного обмена с вектором, несущим кассету устойчивости к антибиотику,

фланкированной *loxP*-сайтом (локус кроссинговера). Кроме того, необходим репликон, определяющий группу несовместимости P (IncP) и наличие белков Cre (циклизационная рекомбиназа бактериофага P1) (Sternbergand, Hamilton, 1981). Перечисленные инструменты, которые были использованы для успешной мутации метанотрофных бактерий, могут находиться на разных плаزمидах, таких как pCM184 или pCM351 с *loxP*-сайтом и pCM157 или pCM158 с IncP- и Cre-сайтами (Marx, Lidstrom, 2002). Внесение модификации происходит в два этапа: (1) при трансформации целевого организма вектором, несущим маркер, происходит двойная гомологичная рекомбинация с хромосомной ДНК по фланкирующим последовательностям гена-мишени, как описано выше. Метанотроф с делецией в гене-мишени приобретает устойчивость к росту на селективном антибиотике. (2) Целевой штамм трансформируют вектором, несущим последовательность Cre-рекомбиназы. Далее культуру подвергают множественным пересевам без антибиотика. Рекомбиназа распознает участки *loxP*, ограничивающие всю конструкцию внутри хромосомы, и вырезает ее.

Недостатком описанной системы является необходимость скрининга с целью идентификации дикого и модифицированного типов, поскольку может произойти как двойная гомологичная рекомбинация с внесением делеции гена-мишени, так и встраивание всей плазмиды по одному плечу с сохранением целевого гена в хромосоме объекта и приобретением устойчивости к селективному антибиотику, что, к сожалению, происходит чаще. Для решения этой проблемы был разработан улучшенный метод редактирования геномов с использованием контрselectивных маркеров. Такими успешными маркерами являются ген *sacB* и варианты *pheS*-генов.

Ген *sacB* кодирует левансахаразу, катализирующую превращение сахарозы в леван, токсичный метаболит для грамотрицательных бактерий, приводящий к их лизису (Recorbet *et al.*, 1993, Хмеленина *и др.*, 2022). Процедура редактирования проходит в два этапа: первый – встраивание плазмиды в хромосому по гомологичным плечам, второй – селекция на сахарозе. В результате, как описано выше, будет получено два типа – восстановленного дикого и с делецией целевого гена. Селекцию клеток восстановленного дикого типа проводят на основе их неспособности к росту на среде, содержащей сахарозу. Ген *sacB* вектора приведет к лизису таких клеток. Этим методом был получен модифицированный штамм *Methylovium microbium alcaliphilum* 20Z, с делециями в генах сахарозасинтазы и гликогенсинтаз (But *et al.*, 2020), штаммы *Mt. alcaliphilum*, способные

синтезировать 2,3-бутандиол (Nguyen *et al.*, 2018) и путресцин (Nguyen, Lee, 2019). Этот подход был также использован при конструировании пути биосинтеза каротиноида астаксантина у *Methylomonas* sp. 16a (Ye *et al.*, 2007).

Модификация гена *pheS*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу фенилаланил-тРНК-синтетазы, позволила получить вариант PheS<sup>AG</sup>, который может включать в белки *p*-хлорфенилаланин, вызывая гибель клеток. Принцип работы этого метода идентичен предыдущему. С использованием этого метода был получен ряд модифицированных штаммов метанотрофных бактерий с более высокой эффективностью, чем с использованием *sacB*-гена (Ishikawa *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021).

Также стоит упомянуть об использовании сайт-специфичной системы рекомбинации Flp-FRT, полученной из *Saccharomyces cerevisiae*, которая является мощным и эффективным инструментом внесения безмаркерных модификаций в хромосомы бактерий (Schweizer, 2003; Li *et al.*, 2020). Высокая специфичность системы Flp-FRT делает её пригодной для манипуляций с геномом метанотрофных бактерий при необходимости интеграции экзогенных генов без использования маркеров. Система состоит из рекомбиназы (Flp) и сайтов-мишеней рекомбиназы Flp (FRT, 48 п.о.). Сайт-мишень FRT состоит из трех практически идентичных частей по 13 п.о. (*a*, *b*, *c*) и ядра из 8 п.о. между *a* и *b* с уникальным сайтом рестрикции *XbaI*, при этом участок *b* и *c* инвертированы относительно участка *a*. Работа системы Flp-FRT может отличаться в зависимости от расположения сайтов-мишеней: (1) если они инвертированы относительно друг друга, то рекомбиназа вызовет инверсию «внутреннего содержимого»; (2) если они находятся в прямой ориентации – то будет происходить делеция промежуточного участка (Schweizer, 2003). С использованием системы Flp-FRT успешно были получены модифицированные штаммы *Methylomicrobium buryatense* 5GB1C с делецией в гене *mxaY* (Chu *et al.*, 2016), а также множественные делеции в генах *coxF*, *mxaF*, *mxaI* (Chu, Lidstrom, 2016).

### 4.3. CRISPR/Cas9-опосредованный мутагенез метанотрофов

CRISPR/Cas — это система адаптивного иммунитета бактерий. В её основе — особые участки бактериальной ДНК, короткие палиндромные кластерные повторы (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR) (Rumah *et al.*, 2022). Между идентичными повторами располагаются отличающиеся друг от друга фрагменты

ДНК — спейсеры, многие из которых соответствуют участкам геномов вирусов, паразитирующих на данной бактерии. При попадании вируса в бактериальную клетку он обнаруживается с помощью специализированных Cas-белков, связанных с CRISPR РНК. Если фрагмент вируса «записан» в спейсере CRISPR РНК, Cas-белки разрезают вирусную ДНК и уничтожают её, защищая клетку от инфекции.

Эту систему смогли адаптировать и превратить в инструмент, позволяющий с высокой специфичностью редактировать геномы. В частности, используют эндонуклеазу Cas9, способную вносить двухцепочечный разрыв в молекулу ДНК, которая восстанавливается с использованием шаблонов восстановления (гомологично-направленная репарация HDR) или с использованием подверженных ошибкам клеточных механизмов без шаблонов (негомологичное соединение концов NHEJ) (Rumah *et al.*, 2022). Инструментом «нацеливания» служит «single guide» РНК (sgRNA), содержащая протоспейсер из 20 п.н., комплементарный целевой последовательности, прилегающей к PAM (protospacer-adjacent motif) мотиву 5'-NGG-3'.

Система CRISPR/Cas широко используется для генной инженерии самых разных организмов, однако, применительно к метанотрофным бактериям данный метод существенно менее эффективен ввиду активности систем контроля экспрессии специализированных Cas-белков. Эта система редко используется для метанотрофов и требует более детального изучения для использования в мутагенезе этих бактерий (McCarty *et al.*, 2020).

Одним из немногочисленных примеров успешной хромосомной модификации метанотрофных бактерий с использованием системы CRISPR/Cas является внесение точечной мутации в ген гидроксилазного компонента рММО у *Ms. capsulatus* Bath – ген *tmoX* был инактивирован введением стоп-кодона в открытую рамку считывания (Tapscott *et al.*, 2019). Для внесения мутации была использована двухплазмидная система – Cas9<sup>D10A</sup> (никирующая эндонуклеаза, вносящая одноцепочечный разрыв ДНК), находящаяся под контролем ангидротетрациклинового промотора ( $P_{tet}$ ) и sgRNA под промотором  $P_{mxa}$  (промотор гена *MxaFI* метанолдегидрогеназы). Активируемый промотор для Cas9<sup>D10A</sup> был выбран из-за предположительной токсичности этого белка для организма-хозяина. Эффективность данного подхода составила лишь 2%, то есть была крайне низка по сравнению с другими методами. Это может быть связано либо с низкой активностью выбранных промоторов, либо низкой эффективностью гомологичной

рекомбинации. Таким образом, для разработки эффективных инструментов генной инженерии с использованием систем CRISPR/Cas необходимы исследования индуцируемых систем экспрессии генов метанотрофных бактерий (McCarty *et al.*, 2020).

Адаптация данного метода применительно к аэробным метанотрофным бактериям является важной задачей, над решением которой работает ряд научных коллективов. Так, еще одним успешным примером внесения хромосомных мутаций в геном метанотрофных бактерий как I (*Mc. capsulatus* Bath), так и II (*Methylocystis parvus* OBVP) типов является исследование с использованием промоторов, не требующих активатора, а также тестированием транспозона Tn5 для идентификации «несущественных» генов (Rumah *et al.*, 2022). Активность выбранных промоторов была проанализирована с использованием репортерного гена, кодирующего eYFP, как для целевых организмов, так и для штамма-донора *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir. Было показано, что для экспрессии Cas-белков и «направляющей» РНК у разных типов метанотрофов подходят разные промоторы. Для метанотрофов I типа – это  $P_{phaC}$  для Cas9 (промотор полигидроксибутиратсинтазы) и  $P_{mxaF}$  для sgRNA, а для представителей II типа – это  $P_{mdh}$  для Cas9 (промотор гена ХохF метанолдегидрогеназы) и  $P_{als}$  для sgRNA (промотор ацетолактатсинтазы). Выбор заключается в использовании промоторов средней силы для Cas9 и сильных промоторов для гидовой РНК. Кроме анализа влияния силы промоторов были исследованы такие характеристики, как концентрация антибиотиков, длина гомологичных участков, продолжительность конъюгации, вариации последовательностей РАМ и протоспейсеров sgRNA, а также выбор генов-мишеней. Использование транспозона Tn5 позволило выявить наиболее подходящие для редактирования цели, избегая попыток редактирования генов, которые важны для выживания клеток. Использование такого подхода позволяет сосредоточиться на удалении или модификации генов и снизить риск неудачи. В зависимости от условий и выбора целевого гена авторам этой работы удалось добиться от 17 до 70% эффективности делеции генов для метанотрофов I типа и от 30 до 90% для метанотрофов II типа. Внесение репортерного гена eYFP также оказалось успешным – 25 и 60% эффективности для метанотрофов I и II типов, соответственно (Rumah *et al.*, 2022).

Такой значительный прогресс в применении данной системы может в будущем значительно облегчить работу с геномным редактированием этих микроорганизмов.

#### 4.4. Методы трансформации метанотрофных бактерий

Главным инструментом внесения модификаций в геном аэробных метанотрофных бактерий являются плазмидные векторы. Существует два способа трансформации этих микроорганизмов – это конъюгация и электропорация (Хмеленина *и др.*, 2022).

Первый подход – это перенос плазмидного вектора посредством конъюгации от донора, в качестве которого выступает штамм *E. coli* S17-1, благодаря использованию системы рестрикции–модификации (R-M) (Yan *et al.*, 2016; Ro, Rosenzweig, 2018). Подобный механизм играет важную роль переноса генетического материала в метанотрофные бактерии (Puri *et al.*, 2015). Метод заключается в трансформации целевым вектором донорного штамма *E. coli* S17-1 и его совместном культивировании с целевой метанотрофной культурой-реципиентом на смешанной среде на чашках Петри в эксикаторах с метаном в газовой фазе. Далее смешанная культура переносится на чашки с агаризованной средой для метанотрофов с селективным маркером, что позволяет осуществить отбор колоний.

Второй возможный подход – прямой перенос генетического материала, который успешно применяется для переноса ДНК в бактериальные клетки, но требует долгой оптимизации условий для успешной манипуляции. Однако, он не так трудоемок и времязатратен, как конъюгативный перенос, хотя и менее эффективен. Данный метод более пригоден для метанотрофов, обладающих обеими формами ММО, поскольку рММО требует для своей работы низкой концентрации ионов меди в среде (<10 мкМ), что снижает эффективность трансформации. Поэтому перед манипуляцией культуру, даже обладающую только мММО, выращивают несколько поколений в среде с пониженным содержанием  $\text{Cu}^{2+}$  для снижения плотности ВЦМ в клетках (Semrau *et. at.*, 1995; Semrau *et. at.*, 2010; Nur *et al.*, 2017; Ro, Rosenzweig, 2018; Nguyen *et al.*, 2019). Помимо содержания ионов меди в среде, значимыми факторами являются концентрации вносимой ДНК, антибиотика, субстрата, время восстановления и параметры самой электропорации, которые подбираются для каждой культуры (Hu *et al.*, 2021). Подбор оптимальных условий электропорации для отдельных метанотрофных бактерий является важным шагом к расширению применимости этого метода введения генетического материала. Этот подход упрощает и ускоряет внесение модификаций, поскольку не требует использования промежуточного агента. Так, был описан метод оптимизации электропорации с внесением линейного фрагмента ДНК, полученного с помощью ПЦР.

Этим методом была достигнута геномная модификация одного из модельных объектов – *Methylomicrobium buryatense* 5GB1 (Hu *et al.*, 2021). Подобный относительно новый подход с использованием линейных фрагментов ДНК на основе ПЦР-метода позволяет упростить и ускорить создание конструкций внесения мутаций. Метод основан на все той же двойной гомологичной рекомбинации с использованием Cre-*lox*-систем. Встроенная кассета устойчивости между плечами после встраивания в хромосому целевого объекта удаляется Cre-рекомбиназой по *lox*-сайтам, позволяя осуществлять безмаркерную мутацию (Ro, Rosenzweig, 2018; Lee *et al.*, 2021b).

Таким образом, современные методы генетической инженерии позволяют во многом преодолеть традиционные ограничения в работе с метанотрофами. Комбинация CRISPR/Cas с системами сайт-специфичной рекомбинации (Flp-FRT, Cre-*lox*) открывает возможности для многократных модификаций. Однако, ряд вызовов не теряют своей актуальности; в их числе низкая эффективность трансформации у некоторых штаммов и необходимость оптимизации промоторов. Дальнейшие исследования должны быть направлены на разработку универсальных платформ для редактирования метанотрофов.



## ГЛАВА 5. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

### 5.1. Метанотрофы как продуценты

Последние несколько десятилетий ознаменованы возрастанием интереса к технологии биологических процессов с использованием метанотрофии. Метан является привлекательным сырьем для биотехнологий производства продуктов с добавленной стоимостью. Природный газ характеризуется отсутствием нежелательных, ингибирующих микроорганизмы примесей, и позволяет получать высокий выход биомассы, не требующей дополнительной очистки (Волова, 1999). В противовес значительному прогрессу в области промышленного использования хорошо изученных микроорганизмов, таких как *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae*, успехи использования метанотрофных бактерий пока немногочисленны.

Биотехнологические производства на основе природного газа являются перспективными, поскольку данный субстрат относят к углеродному сырью нового поколения, так как он является непригодным, относительно дешевым, возобновляемым и широко встречающимся в природе (Kalyuzhnaya *et al.*, 2015). Парниковый газ метан имеет значительно более высокий потенциал влияния на глобальное потепление, который составляет в 84 раза больше, чем у CO<sub>2</sub> за 20-летний период, кроме того, его выбросы в последние десятилетия неуклонно возрастают (Haque *et al.*, 2020; Tucci and Rosenzweig, 2024). Выбросы метана являются результатом его образования в природных экосистемах и антропогенной деятельности (Conrad, 2009; Haque *et al.*, 2020). Около 60% выбросов метана являются антропогенными и связаны с производством и использованием ископаемого топлива, животноводством, выращиванием риса, свалками и сточными водами (Tucci and Rosenzweig, 2024). Следовательно, развитие технологии преобразования метана является перспективным для снижения темпов глобального потепления и развития экономически выгодных производств замкнутого цикла (Akberdin *et al.*, 2018, Le, Lee, 2023).

Разнообразие продуцируемых веществ зависит от типа метанотрофных бактерий, их ферментов и метаболических путей, регулирующих синтез промежуточных продуктов центральных метаболических путей (Fei *et al.*, 2014). Продуктами биоконверсии метана потенциально могут являться белки, биополимеры, каротиноиды, полупроницаемые

мембраны, липиды, метанол, органические кислоты, эктоин, витамин B12, сахара или медьсвязывающие белки, такие как метанобактин (Bothe *et al.*, 2002; Reshetnikov *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2007; Pieja *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2008; Balasubramanian and Rosenzweig, 2008; But *et al.*, 2015). Биотехнологическое применение метанотрофных бактерий также может рассматриваться в контексте природоохранных технологий для биоремедиации загрязненных экосистем (Троценко, Торгонская, 2012; Choi *et al.*, 2021) и в качестве биофильтров для снижения выбросов метана из антропогенных источников (Nikiema *et al.*, 2007; Girard *et al.*, 2012).

За последнее время были достигнуты значительные успехи в разработке инструментария для редактирования геномов метанотрофных бактерий, таких как плазмидные системы (Puri *et al.*, 2015) и индуцируемые промоторы (Henard *et al.*, 2016), что увеличивает возможности целевых стратегий метаболической инженерии. Этот аспект очень важен, поскольку каталитическая активность природных метанотрофных бактерий имеет низкую продуктивность и конверсионную способность. Немаловажен и факт увеличения числа доступных чистых культур (новых штаммов и видов) метанотрофов, обладающих высокими скоростями роста при повышенных температурах – это увеличивает разнообразие пула метанотрофов, пригодных для биотехнологических целей (Gilman *et al.*, 2015). Новые объекты и инструменты, вместе с быстро растущим пониманием метанотрофного метаболизма открывают возможность реализовать ряд рациональных стратегий метаболической инженерии по улучшению использования биокатализа метана.

Помимо ограничений биологической природы, существует и проблема технологического характера. Процесс выращивания метанотрофных бактерий осложняется высокой потребностью культуры в кислороде, которая превышает потребность в метане минимум в 2-3 раза. Однако, ввиду взрывоопасности смеси кислород-метан, культивирование проводят в условиях лимита по кислороду и избытка метана, что является неоптимальным для роста метанотрофов (Gilman *et al.*, 2017). Также, ввиду избытка метана необходима система рециклинга этого газа и увеличение давления в системе с использованием чистого кислорода для улучшения экономики процесса. В таких условиях биокатализа утилизация метана возрастает до 95% (Волова, 1999).

Таким образом, рентабельность и реализация биотехнологических производств на основе метанотрофии зависит от технологических новшеств и биологической

интенсификации внутриклеточных процессов средствами метаболической инженерии. Решение этих задач позволит использовать биологические процессы для конвертации C<sub>1</sub>-соединений в широкий спектр продуктов со значительными экономическими, экологическими и социальными преимуществами. Кроме того, геномное редактирование метанотрофов открывает путь к созданию эффективных биокатализаторов для конверсии метана в биоразлагаемые пластики, биотопливо и фармацевтические продукты. Однако для масштабирования технологий необходимы дальнейшие исследования в области метаболического моделирования и оптимизации генетических инструментов.

## **5.2. Производство кормового белка на основе метана**

К 2050 году миру потребуется производить 1.25 млрд тонн мяса и молочных продуктов в год, чтобы удовлетворить глобальный спрос на белок животного происхождения при нынешних уровнях потребления. Однако, неуклонно возрастающий спрос на белок не может быть восполнен одним лишь увеличением производства мяса из-за низкой конверсии используемых сейчас кормов. Необходим альтернативный источник преобразования углерода в аминокислоты, при этом имеющий возобновляемый ресурс без ограничения или со значительным сокращением потребления земельных и водных ресурсов на единицу получаемого продукта, вне зависимости от климатических условий (Nizovtseva *et al.*, 2024). Так, на производство 1 кг мяса требуется ~6 кг растительного белка (Ritala *et al.*, 2017). Белок одноклеточных (SCP – Single Cell Protein), то есть белок, синтезируемый клетками микроорганизмов, является перспективным вариантом решения грядущей проблемы, благодаря высокому содержанию белка, высокой усвояемости, хорошо сбалансированному содержанию аминокислот (Wang *et al.*, 2022). Микробный белок был предложен в качестве альтернативы продуктам животного происхождения для удовлетворения растущего мирового спроса (Ritala *et al.*, 2017). Большая часть интереса к SCP сосредоточена на увеличении продукции животноводческих хозяйств и рыбных ферм за счет использования микроорганизмов для повышения содержания белка в используемых кормах (Ritala *et al.*, 2017). В настоящее время это особенно актуально для России, где дефицит отечественных кормов и зависимость от импорта остаются ключевыми препятствиями для развития отрасли аквакультуры. 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 современных высокоэффективных технологий производства кормов и наличие широкой линейки штаммов-продуцентов кормового белка. При производстве SCP обычно используют смешанные популяции микроорганизмов, а не чистые культуры, поскольку клетки-спутники потребляют побочные продукты метаболизма целевого организма, которые ингибируют его активный рост. Использование подобных ассоциаций показало более высокие ростовые характеристики (Троценко, Торгонская, 2012).

Проблемой нехватки белка стали заниматься еще в 70х годах прошлого века; одним из способов решения данной проблемы стали рассматривать возможность микробного синтеза белка метанотрофными бактериями. В 80-х годах в СССР началось масштабное производство «гаприна» – белка из природного газа на основе термотолерантного штамма *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 (патент SU770200A1). К сожалению, с распадом Советского Союза, прекратило свое существование и это производство.

Аналогичное производство кормового белка было налажено норвежской компанией Norferm AS под торговой маркой «BioProtein», которая с 1995 года получила разрешение ЕС на использование своего продукта для подкормки свиней, телят и лосося (Bernhoft *et al.*, 2022). Применяемая компанией технология подразумевает совместное культивирование аэробной метанотрофной бактерии *Methylococcus capsulatus* Bath с гетеротрофными бактериями-спутниками, доля биомассы которых в получаемом продукте не превышает 10%. Гетеротрофные бактерии-спутники были представлены видами *Alcaligenes acidovorans* DB3 (6-8%), *Bacillus firmus* DB5 (~1%) и *Bacillus brevis* DB4 (~1%) (Троценко, Торгонская, 2012). В 2014 году компанию приобрела Calysta Energy Inc. (США), биотехнологическая фирма, также занимающаяся разработкой промышленных процессов биоконверсии метана в белок.

Биотехнологические процессы, предполагающие биосинтез микробного белка, обладают значительными преимуществами перед альтернативными производствами. Во-первых, микробный биосинтез предполагает использование микроорганизмов, имеющих высокую удельную скорость роста. Второе преимущество заключается в получении высококачественного белка, составляющего большую долю продукта. Третьим преимуществом является сниженная трудоемкость по сравнению с химическим синтезом или получением агротехнического продукта. В-четвертых, производство требует минимальных территориальных ресурсов и расхода воды. В-пятых, используемые для

культивирования метанотрофных бактерий среды имеют малозатратный состав и включают в себя только минеральные элементы, такие как соединения азота, фосфора, калия, магния, микроэлементы и, естественно, метан. Синтезируемая биомасса имеет следующий состав (%): протеин – до 75; липиды – до 5; нуклеиновые кислоты – 10; минеральные компоненты – до 10 (Григорян, Горская, 1970). Получаемый белок по содержанию и соотношению аминокислот близок к рыбной муке и превосходит по показателям соевый шрот (Ritala et al., 2017; Pikaar et al., 2018; Wang et al., 2022). Кроме того, существенным недостатком производства рыбной муки является сильное влияние на экологию и биоразнообразие этого ресурса, не говоря уже о высокой стоимости продукта (Wang et al., 2022). Производства белка на основе метана могут использовать на порядки меньше воды и суши, чем традиционные источники белка, такие как животноводческие хозяйства и агропромышленные производства. Например, Feedkind™ использует примерно в 100 раз меньше воды и занимает в 1000 раз меньше территории на тонну продукта по сравнению с производством соевых бобов (Cumberlege et al., 2016). Так, постройка сразу нескольких биореакторов с совместным использованием инженерных сетей может позволить довести производственные мощности до порядка 100 000 тонн белка в год (Crumbley and Gonzalez, 2018). Таким образом, достоинство такой технологии заключается в компактности, эффективности, высокой скорости получения продукта, независимости от климата и минимальном влиянии на окружающую среду (Nizovtseva et al., 2024).

Биотехнология на основе метанотрофных бактерий является одной из наиболее передовых и доступных технологий производства SCP и уже в наше время находится на грани крупномасштабной коммерциализации (García Martínez et al. 2022) (Рисунок 11). Этому способствуют и недавние исследования, доказавшие высокую усвояемость метанотрофного белка рыбами, в частности, радужной форелью, *Oncorhynchus mykiss* (Rajesh et al., 2022). Кроме высокого содержания белка, в микробной биомассе содержится значительное количество витаминов группы В (особенно В1, В2, В3, В7, В8 и В12), макро- и микроэлементов и незаменимых жирных кислот (García Martínez et al. 2022).

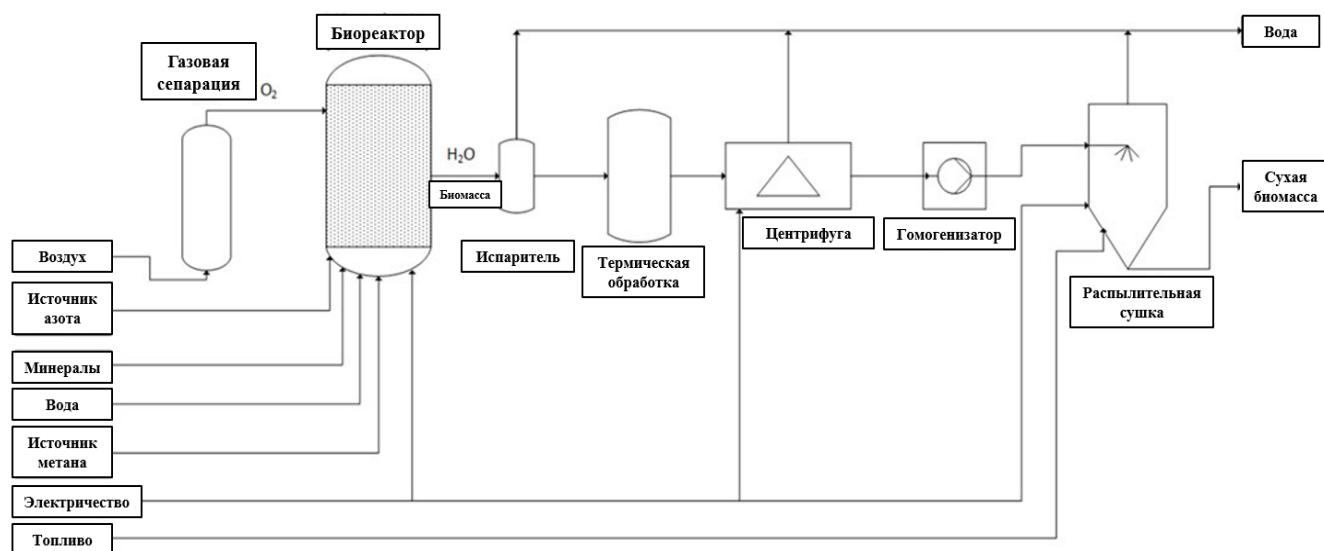


Рисунок 11 – Схематическая технология процесса производства белка на основе метана. Цитировано с изменениями по García Martínez *et al.* 2022.

Таким образом, биотехнологии открывают широкие возможности использования метана как сырья для производства ценных продуктов. Метанотрофные бактерии представляют значительный биотехнологический потенциал для конверсии парникового газа в продукты с добавленной стоимостью, включая кормовой белок, биополимеры, липиды и каротиноиды, что способствует решению глобальных проблем дефицита белка и сокращению антропогенных выбросов метана. Актуальность исследования обусловлена необходимостью преодоления существующих ограничений, таких как зависимость от пресной воды, низкая эффективность синтеза биологически активных соединений в природных штаммах и технологические сложности культивирования. Развитие методов генетического редактирования, включая системы CRISPR/Cas, двойной гомологичной рекомбинации и сайт-специфической рекомбинации (*Cre-lox*, *Flp-FRT*), позволяет создавать штаммы с оптимизированными метаболическими путями, повышенной продуктивностью и устойчивостью к экстремальным условиям, что имеет решающее значение для масштабирования биотехнологических процессов. Интеграция метаболической инженерии, геномного анализа и технологических инноваций открывает перспективы для коммерциализации устойчивых отраслей, которые снижают нагрузку на природные ресурсы и облегчают переход к ресурсосберегающему устойчивому развитию и «производствам замкнутого цикла» (Nizovtseva *et al.*, 2024).

Одним из наиболее перспективных направлений является производство белка из метана. Этот белок может быть использован в качестве ценного компонента кормов в аквахозяйствах, птицеводческих и животноводческих хозяйствах, что может составить существенный вклад в решение проблемы дефицита кормового белка. Введенный в России ГОСТ Р № 71301-2024 на белковую кормовую добавку на основе метанооксиляющих бактерий (Гаприн) предполагает применение штаммов *Ms. capsulatus*, что является важным шагом в реализации подобных технологий. Уже сегодня пилотные проекты демонстрируют эффективность таких добавок: испытания на аквакультурах подтверждают их безопасность, высокую питательную ценность и усвояемость, сопоставимую с традиционными белковыми источниками, такими как рыбная мука и соевый белок/шрот (Wang *et al.*, 2022).

Однако, до сих пор биотехнология преобразования метана в микробный белок предполагала использование быстрорастущих пресноводных гаммапротеобактериальных метанотрофов рода *Methylococcus*, не способного к синтезу каротиноидов – важной биологически активной добавке. Поэтому востребованной задачей остается поиск перспективных метанотрофов, способных синтезировать каротиноиды с высокой скоростью роста и высоким содержанием белка в клетках. Такими качествами обладают представители рода *Methylomonas*, биотехнологически перспективное разнообразие которых также ограничено. Кроме того, многие регионы мира имеют ограниченные ресурсы пресной воды, поэтому поиск метанотрофов, способных к быстрому росту в морской или соленой воде, представляет большой интерес для дальнейшего развития этой биотехнологии.

Успехи масштабирования процессов, подкрепленные растущими инвестициями в «зеленые» технологии, указывают на то, что промышленное производство бактериального белка на основе метана уже в ближайшие десятилетия могут стать основой для устойчивого развития сельского хозяйства будущего, сократив тем самым зависимость от экстенсивного землепользования и нагрузку на окружающую среду. Это не только экономически выгодная альтернатива, но и важный элемент стратегии декарбонизации, приближающее человечество к замкнутой биоэкономике будущего.

## ГЛАВА 6. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 6.1. Получение накопительных культур метанотрофных бактерий

Для получения накопительных метанооксиляющих культур были использованы образцы природных и антропогенных местообитаний с высокой концентрацией  $\text{CH}_4$ , таких как осадки пресноводных и соленых водоемов, активный ил очистных сооружений и покрывающие почвы полигонов твердых бытовых отходов (Таблица 3).

Таблица 3 – Образцы, использованные в работе для получения накопительных культур метанотрофных бактерий.

№ п/п	Место и дата отбора образцов	Координаты точки отбора	Тип образца
1	Активный ил сточных вод, г. Москва, 11.2020	N 55.656485, E 37.693804	активный ил осадков сточных вод
2	Активный ил сточных вод, г. Иркутск, 02.2021	N 52.264590, E 104.335498	активный ил осадков сточных вод
3	Полигон ТБО, г. Ханты-Мансийск, 08.2020	N 61.050523, E 69.372410	верхний слой почвы с полигона
4	Полигон ТБО, г. Ханты-Мансийск, 08.2020	N 61.050523, E 69.372307	верхний слой почвы с полигона
5	Река Черная, Республика Крым, 09.2020	N 44.597461 E 33.607156	речной осадок
6	Река Ходзь, Краснодарский край, 10.2020	N 44.423635, E 40.736948	речной осадок
7	Пруд Мещерский, г. Москва, 08.2020	N 55.673881, E 37.410641	донные отложения
8	озеро Эльтон, Волгоградская область, 08.2022	N 49.2085, E 46.68024	донные отложения

Навески образцов массой 5 г предварительно подвергали процедуре экстракции клеток, которую проводили с использованием гомогенизатора BagMixer 100 “MiniMix” (Interscience) и стерильных пакетов BagFilter®. Навеску помещали в одно из отделений



пакета, добавляли 10 мл стерильной дистиллированной воды и обрабатывали в гомогенизаторе в течение 5 минут. Суспензию (5 мл), обогащенную микробными клетками, отбирали из другого отделения и вносили в 100 мл среды во флаконы объемом 500 мл для культивирования.

Состав среды для получения накопительных культур определялся характеристиками биотопа, из которого был получен образец. Для выделения пресноводных метанотрофов использовали жидкую среду dNMS (dilute Nitrate Mineral Salts) следующего состава (г л<sup>-1</sup>): KNO<sub>3</sub> – 0.2; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0.2; CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O – 0.04; 1 % (об./об.) 200 мМ фосфатного буфера (pH 6.3) и 0.1 % (об./об.) раствора микроэлементов для метанотрофов (Гальченко, 2001) следующего состава (г л<sup>-1</sup>): ЭДТА – 5, FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 2, ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0.1, MnCl<sub>2</sub>×4H<sub>2</sub>O – 0.03, CoCl<sub>2</sub>×H<sub>2</sub>O – 0.2, 10 CuCl<sub>2</sub>×5H<sub>2</sub>O – 0.1, NiCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O – 0.02, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> – 0.03; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0.3. Содержание метана в газовой фазе доводили до 30 об. %.

Для выделения галофильных метанотрофов использовали среду MOR, содержащую (г л<sup>-1</sup>): NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 0.6; KCl – 0.5; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>×10H<sub>2</sub>O – 2.85; NaCl – 17; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0.018; NaHCO<sub>3</sub> – 0.15; CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O – 0.77; MgCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O – 7.47; 1 % (об./об.) 200 мМ фосфатного буфера (pH 6.8-7) и 0.2 % (об./об.) раствора микроэлементов для метанотрофов вышеуказанного состава (Гальченко, 2001). Общая соленость среды составляла около 30‰. В газовую фазу инкубационных флаконов вводили метан (20-30 об. %).

Культивирование проводили в шейкер-инкубаторах Biosan ES-20/60 (Латвия) при 150 об./мин. в диапазоне температур от 30 до 50°C. Развитие метанотрофов в культурах прослеживали с помощью фазово-контрастной микроскопии на микроскопе Zeiss AxioPlan 2 (Йена, Германия).

## **6.2. Получение и идентификация чистых культур метанотрофов**

Для получения изолятов метанотрофных бактерий использовали комбинацию двух подходов культивирования: 1) посева суспензий накопительных культур на агаризованные варианты соответствующих сред с последующим отбором колоний и 2) очистки полученных изолятов с помощью многократных серий предельных разведений на жидких средах.

Первый подход заключался в последовательном истощающем расщеплении суспензий на чашки Петри с соответствующей минеральной средой. Инкубацию в эксикаторах с ~20-30 об. % метана проводили при температурах от 30 до 42°C. Выросшие колонии анализировали при помощи фазово-контрастной микроскопии. Пересевы продолжали до получения морфологически идентичных клеток, морфологически схожих с таковыми у охарактеризованных метанотрофов.

Во втором случае, использовали многократные серийные разведения (до  $10^{-12}$ ), которые осуществляли во флаконах объемом 60 мл с 5 мл соответствующей среды. Подход заключался в последовательном разведении суспензии выросшей культуры объемом 0.5 мл, после чего флаконы герметично закрывали, доводили метан до ~30 об. % в газовой фазе и инкубировали на качалке (150 об./мин.) при температурах 30, 35, 42, 45 и 50°C в течении 2-3 дней. Флакон с наибольшим разведением с визуально видимым ростом отбирали для фазово-контрастной микроскопии и последующих предельных разведений. Пересевы продолжали до получения морфологически идентичных метанотрофных клеток.

Для молекулярной идентификации полученного пула чистых культур метанотрофов с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили экстракцию ДНК при помощи стандартного протокола с использованием СТАВ и фенол-хлороформа (Wilson, 2001). Для постановки ПЦР использовали стандартные бактериальные праймеры на ген 16S рРНК: 9F (5'- GAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3') и 1492R (5'- ACGGYTACCTTGTACGACTT - 3') (Weisburg et al., 1991), а также праймеры для амплификации функционального гена *pmoA*: A189F (5'- GGNGACTGGGACTTCTGG-3') и A682R (5'- GAASGCNGAGAAGAASGC -3') (Holmes et al., 1995). Проверку амплифицированных фрагментов ДНК проводили при помощи электрофореза в 1.2% агарозном геле, с окрашиванием бромистым этидием и визуализацией продуктов ПЦР с помощью УФ-трансиллюминатора. Очистку ПЦР-продуктов производили при помощи набора «Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System» (Promega, США). Секвенирование ПЦР-амплифицированных фрагментов генов выполняли на основе ЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН. Сравнение полученных последовательностей с таковыми в базе данных GenBank осуществляли с использованием программы Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 6.3. Оценка ростовых характеристик изолятов

Анализ ростовых характеристик проводили только для изолятов метанотрофов, способных к быстрому росту. Перед началом эксперимента культуры многократно пересеивали раз в 2-3 дня при соответствующих температурах, при которых они были получены (30, 35, 42°C). Оценку удельных скоростей роста изолятов проводили путем прослеживания динамики их роста на качалке (150 об./мин.) на средах dNMS и MOR в трех проворностях в диапазоне температур от 4 до 50-55°C с шагом 5 градусов. Анализ оптимальных значений pH роста проводили также в трех повторностях. Вариации pH от 5.0 до 8.0 были достигнуты путем смешивания 0,1M растворов NaOH, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Рост оценивали путем измерения оптической плотности культур на спектрофотометре Eppendorf Biophotometr AG (Германия) при длине волны 600 нм. Расчет удельной скорости роста ( $\mu$ , ч<sup>-1</sup>) проводили в экспоненциальной фазе роста культур по формуле:  $\mu = (\ln(OD_2) - \ln(OD_1)) / (t_2 - t_1)$ , где OD<sub>1</sub> и OD<sub>2</sub> – значения оптической плотности культуры в начале и конце экспоненциальной фазы роста, t<sub>1</sub> и t<sub>2</sub> – соответствующие им временные точки. Культуры, показавшие наибольшие скорости роста, были отобраны для дальнейшей работы.

Диапазон потенциальных ростовых субстратов исследовали путем внесения в среду следующих источников углерода в концентрации 0.05% (вес/об.): этанол, пропионат, формиат, глюкоза, фруктоза, галактоза, ацетат, пируват, малат, сукцинат, цитрат, казеин, дрожжевой экстракт. Способность штамма к росту на метаноле тестировали на средах, содержащих 0.01–6% (об./об.) метанола. Источники азота тестировали путем замены KNO<sub>3</sub> в dNMS на следующие соединения в концентрации 0.01% (вес/об.): сульфат аммония, нитрит натрия, формамид, глицин, глутамин, аланин, пептон, казамин, мочевины, дрожжевой экстракт. Проверку способности к фиксации атмосферного азота проводили на жидкой минеральной среде без источника азота во флаконах с пониженным содержанием O<sub>2</sub> в газовой фазе (2 об. %). Потребность в NaCl и диапазон ростовых концентраций определяли на среде с NaCl (0.01 - 13% масс./об.).

### 6.4. Анализ геномов изолятов метанотрофов

Набор NEBNext ultra II DNA Library kit использовали для подготовки библиотек к секвенированию, согласно рекомендациям производителя (New England BioLabs, Великобритания). Определение нуклеотидных последовательностей геномов

метанотрофов проводили при помощи использования платформ фирм Illumina и Oxford Nanopore. Гибридная сборка коротких и длинных прочтений была выполнена с помощью программы Unicycler (Wick *et al.*, 2017). Аннотацию нуклеотидной последовательности генома выполняли с помощью программы Prokka (Seemann, 2014). Особенности метаболизма анализировали на основе результатов автоматической аннотации с дополнительной проверкой в ручном режиме с помощью базы данных NCBI и инструмента Blast, принимая 35% идентичности и 50% покрытия аминокислотной последовательности в качестве отсечки для установления предполагаемой функции рассматриваемой белок-кодирующей последовательности.

### **6.5. Описание новых видов аэробных метанотрофов**

Таксономическое описание новых видов родов *Methylobionas* и *Methylomarinum* проводили путем определения структурно-морфологических, физиологических и генотипических характеристик в соответствии с правилами Международного комитета по систематике бактерий. Типовые штаммы новых видов депонировали в международных коллекциях микроорганизмов.

### **6.6. Редактирование генома *Ms. capsulatus* MIR.**

В качестве объекта работ по метаболической оптимизации был использован новый изолят метанотрофных бактерий вида *Ms. capsulatus*, штамм MIR. Задачей этого блока исследований был нокаут генов синтеза гликогена, *glgA1* и *glgA2*, кодирующих две изоформы гликогенсинтаз, для предотвращения стока углерода и энергии на синтез запасных веществ. Схема синтеза гликогена представлена на Рисунке 12.



Ночные накопительные культуры штамма MIR на жидкой минеральной среде «П» высевали на агаризованный вариант этой среды, имеющей следующий состав (г л<sup>-1</sup>): KNO<sub>3</sub> – 1; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0.2; CaCl<sub>2</sub> – 0.02; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×12H<sub>2</sub>O – 1.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,7; с добавлением микроэлементов 0.1 % (об./об.) (Гальченко, 2001). В агаризованную среду добавляли три маркерных антибиотика в трех различных концентрациях (мкг мл<sup>-1</sup>): гентамицин (Дальхимфарм, Россия) – 10, 25 и 40; спектиномицин (Sigma-Aldrich, Германия) – 100, 200 и 300; канамицин (Sigma-Aldrich, Германия) – 50, 100 и 150. Положительный контроль представлял собой три чашки Петри со средой «П» без антибиотиков. Чашки инкубировали в эксикаторах с ~30 об. % метана в газовой фазе в течение двух недель. Далее чашки анализировали на наличие колоний и, следовательно, на природную резистентность к антибиотикам.

### 6.6.2. Подбор векторных систем

Для внесения требуемых модификаций в геном целевой метанотрофной бактерии осуществляли проверку работоспособности известных векторов для *Mc. capsulatus* MIR. В работе были протестированы три IncP-основанные плазмиды, реплицируемые у метанотрофных бактерий (Ali, Murrell, 2009), несущие различные гены резистентности к антибиотикам – канамицину (pAWP78), гентамицину (pSB2), спектиномицину (pSB3).

Внесение каждого из векторов осуществляли конъюгативным переносом от донорного штамма *Escherichia coli* S17-1 к реципиенту *Mc. capsulatus* MIR описанным ниже способом. Каждую из трех плазмид трансформировали в клетки донора, после чего выращивали их на селективной среде LB с соответствующим кассете устойчивости антибиотиком – канамицином (50 мкг мл<sup>-1</sup>), гентамицином (4 мкг мл<sup>-1</sup>) или спектиномицином (100 мкг мл<sup>-1</sup>). Полученные колонии, выросшие на селективной среде, отбирали и наращивали в тех же условиях в течение ночи при 37°C. Параллельно с этим на чашках Петри со средой «П» наращивали клетки дикого типа – реципиента. Конъюгацию проводили смешиванием биомасс клеток *E. coli* S17-1 и *Mc. capsulatus* MIR на среде «П» с 3% (об./об.) среды LB, с последующей инкубацией в эксикаторе с метаном в газовой фазе в течение двух дней при 37°C. Затем смешанную культуру последовательно высевали на две чашки Петри с агаризованной средой «П» с соответствующим плазмиде антибиотиком и культивировали в эксикаторе при 42°C с

метаном в газовой фазе в течение недели. Полученные колонии повторно рассеивали на агаризованную среду с антибиотиком (Рисунок 13).

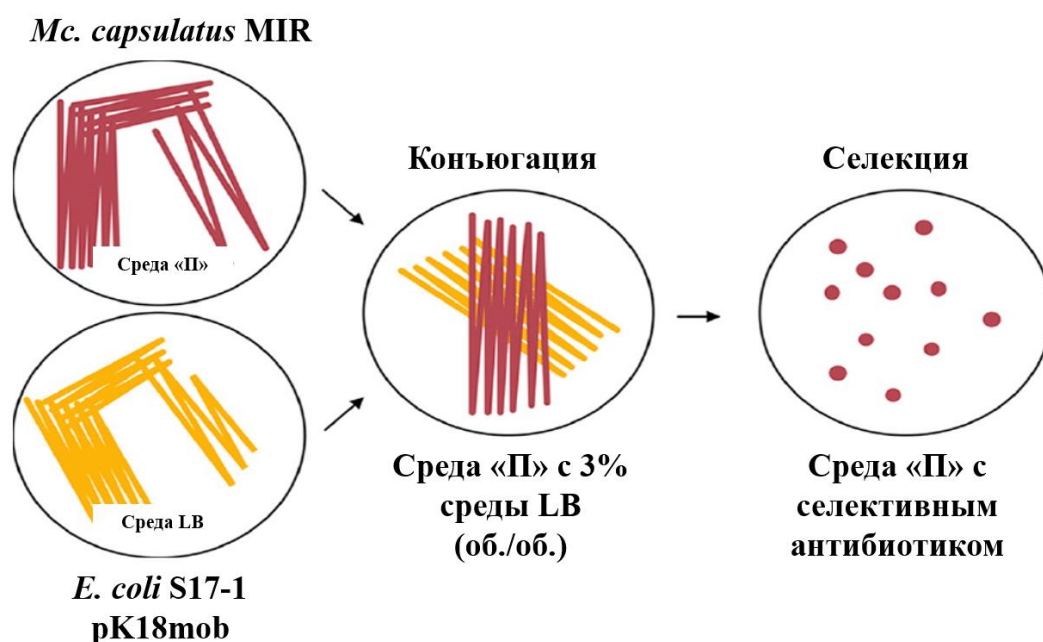


Рисунок 13 – Схема процедуры двойной гомологичной рекомбинации. Цитировано с изменениями по Tapscott *et al.*, 2019.

Для проверки репликации в клетках плазмид производили выделение тотальной ДНК из колоний метанотрофа, образовавшихся на селективных средах. Выделение ДНК осуществляли следующим способом: небольшое количество биомассы ресуспендировали в 100 мкл ТЕ-буфера, вносили 2-3 мг лизоцима с последующей инкубацией при 37°C в течение 30 минут. После чего вносили 5 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия (SDS) и инкубировали 15 минут при 65°C, затем добавляли 20 мкл 5М NaCl и 15 мкл 10% раствора цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ) в 0.7М NaCl, перемешивали и снова инкубировали 15 минут при 65°C. Полученный раствор обрабатывали смесью фенол-хлороформ (1:1) и центрифугировали 10 минут при 14000 об./мин. Верхнюю водную фазу переносили в чистую пробирку и добавляли 250 мкл изопропанола, выдерживали при комнатной температуре 15-30 минут и центрифугировали 15 минут при 14000 об./мин. Супернатант сливали, осадок промывали 80% раствором этанола, высушивали и растворяли в 10-50 мкл ТЕ-буфера. Полученные образцы, содержащие тотальную ДНК, использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР со специфическими к

исследуемой плазмиде праймерами (Таблица 4), комплементарными генам антибиотикоустойчивости.

Таблица 4 – Праймеры, использованные для тестирования генов устойчивости к канамицину (Km), гентамицину (Gm) и спектиномицину (Sp) в полученных рекомбинантных штаммах *Methylococcus capsulatus*

Праймер	Последовательность (5'-3')	Мишень
Gm-F	GCTTACGTTCTGCCAGGTTTGAG	Gm <sup>R</sup> -кассета вектора pSB2
Gm-R	CTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGC	
Sp-F	CATCATGAACAATAAAACTGTCTGC	Sp <sup>R</sup> -кассета вектора pSB3
Sp-R	GCAGCATAACSTTTTCCGT	
Km-F	CGCGTCTACGAACTGCCGAT	Km <sup>R</sup> -кассета вектора pAWP78
Km-R	TCCGACTCGTCCAACATCAATACAA	

### 6.6.3. Нокаут генов синтеза гликогена *glgA1* и *glgA2*

Делецию генов гликогенсинтаз у *Methylococcus capsulatus* MIR проводили с использованием штаммов-посредников: (1) *Escherichia coli* Top10 – использовали для высокоэффективного клонирования и размножения плазмидной ДНК; (2) *Escherichia coli* S17-1 – конъюгативный штамм, применяли для переноса плазмидной ДНК в клетки метанотрофа.

Для получения штаммов  $\Delta glgA1$  и  $\Delta glgA2$  (Рисунок 14) использовали фрагменты ДНК, фланкирующие последовательности этих генов длиной ~700 п.н.

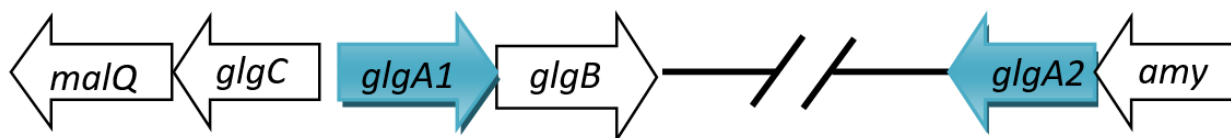


Рисунок 14 – Кластеры генов, ответственных за метаболизм гликогена у штамма *Mc. capsulatus* MIR: *glgA1*, *glgA2* – гены гликогенсинтаз; *glgB* – ген фермента ветвления гликогена; *glgC* – ген АДФ-глюкопирофосфорилазы; *malQ* – ген 4- $\alpha$ -глюкантрансферазы; *amyA* – гены  $\alpha$ -амилазы.

Фланкирующие последовательности генов *glgA1* и *glgA2* были амплифицированы из генома целевого организма праймерами, указанными в Таблице 5.



Таблица 5 – Праймеры, используемые для амплификации фланкирующих последовательностей генов гликогенсинтаз (*glgA1* и *glgA2*)

Праймер	Последовательность (5'-3')	Мишень
<b>MIR-<i>glg1</i>-up-F</b>	АТАТСТАГААССГГСАТТАССАТСАСГА	Участок ДНК, фланкирующий ген <i>glgA1</i> с 5' конца
<b>MIR-<i>glg1</i>-up-R</b>	СААГСАТГСАГГАГТГГССГСАССГТГСГА	
<b>MIR-<i>glg1</i>-dw-F</b>	СААГСАТГСГСТГСТССАТССГССГАС	Участок ДНК, фланкирующий ген <i>glgA1</i> с 3' конца
<b>MIR-<i>glg1</i>-dw-R</b>	ТСАААГСТТГССААГГАГАТСТГААТТА	
<b>MIR-<i>glg2</i>-up-F</b>	АГТГААТТССАССАССАССАССАССАССА	Участок ДНК, фланкирующий ген <i>glgA2</i> с 5' конца
<b>MIR-<i>glg2</i>-up-R</b>	ТСАГГАТССАССАССАССАССАССАССА	
<b>MIR-<i>glg2</i>-dw-F</b>	СААГСАТГССГСТАССАТТАТССТГГА	Участок ДНК, фланкирующий ген <i>glgA2</i> с 3' конца
<b>MIR-<i>glg2</i>-dw-R</b>	СТТААГСТТТГАСССТГССГСТГТССГТГ	

Полученные амплификацией фрагменты были очищены и введены в вектор pK18mob (Schäfer *et al.*, 1994) между сайтами *XbaI*, *SphI* и *SphI*, *HindIII* (фланкирующие фрагменты *glgA1*) или сайтами *EcoRI*, *Acc65I* и *XbaI*, *HindIII* (фланкирующие фрагменты *glgA2*). Между фланкирующими фрагментами по сайту рестрикции *BamHI* в плазмиде клонировали кассету устойчивости к маркерному селективному антибиотику – гентамицину или спектиномицину. Выбор вектора определял его суицидальный характер в клетках метанотрофных бактерий (Рисунок 15).

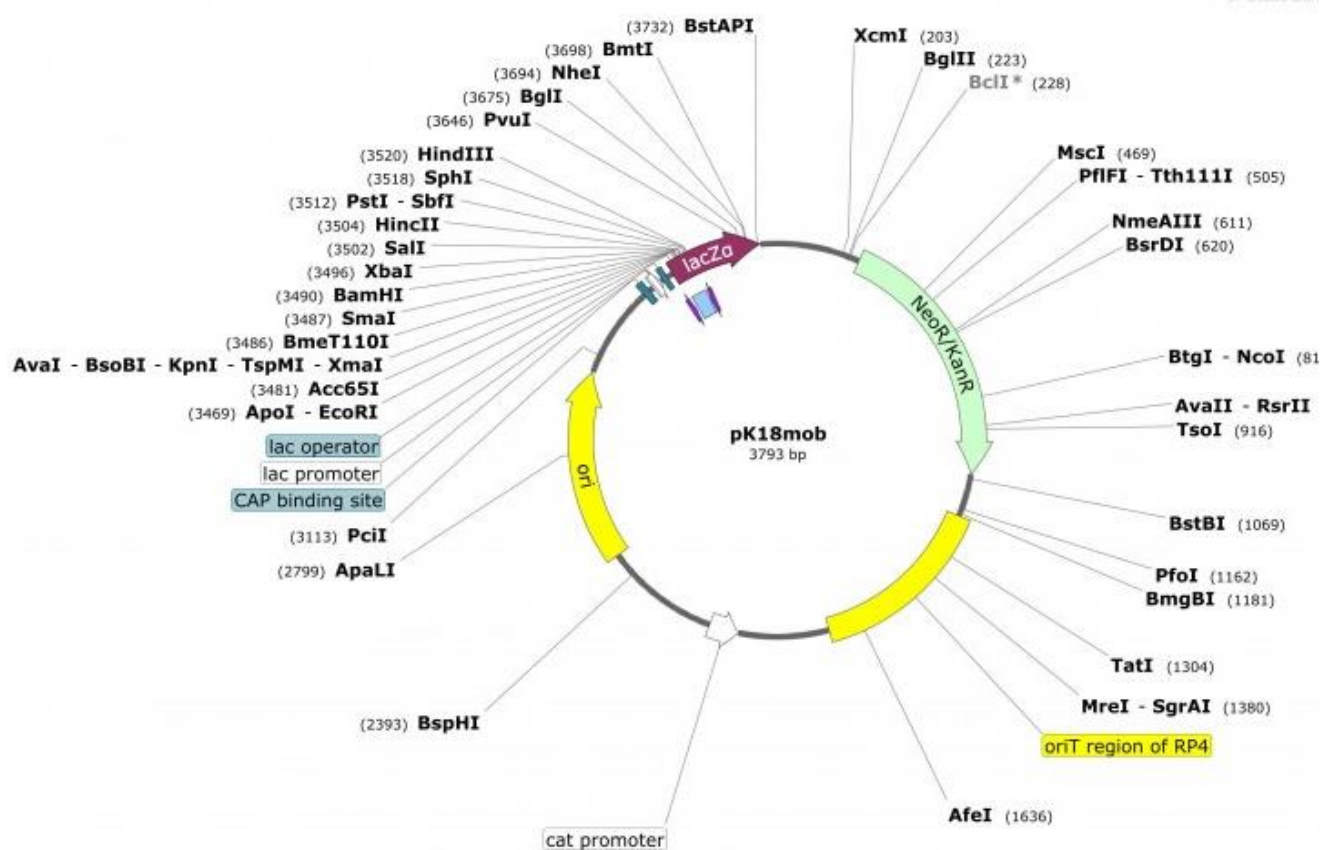


Рисунок 15 – Карта суицидального вектора pK18mob, использованного для двойной гомологичной рекомбинации.

Полученные векторы были перенесены с помощью конъюгации в клетки *Ms. capsulatus* MIR штаммом *E. coli* S17-1 вышеописанным способом (см. пункт 6.2). Отобранные клоны, устойчивые к селективному антибиотику и чувствительные к канамицину, дополнительно анализировали ПЦР-методом. В случае делеции одного из двух генов гликогенсинтаз проводили повторную процедуру для получения двойной делеции *glgA1glgA2*. Для достижения данной цели производили перекрестную конъюгацию: плазмиду pK18mob-*glgA1*-Gm трансформировали в штамм с делецией гена *glgA2*, а плазмиду pK18mob-*glgA2*-Sp – в штамм с делецией гена *glgA1*.

Поскольку вышеперечисленные манипуляции не позволили получить штамм с одновременной делецией обоих генов гликогенсинтаз, старшим научным сотрудником ФИЦ ПНЦБИ РАН лаборатории радиоактивных изотопов С.Ю. Бутом был сконструирован вектор, обеспечивающий индуцибельную экспрессию гена гликогенсинтазы. Этого удалось добиться путем амплификации гена *glgA2* из геномной ДНК *Methylovivimicrobium alcaliphilum* 20Z с последующим его клонированием между

сайтами *EcoRI* и *VamHI* вектора pCAN01 ( $Km^R$ ) с индуцибельным ангидротетрациклином промотором ( $P_{tetA}$ ). Полученный вектор вводили в клетки  $\Delta glgA1$  путем конъюгации, как описано выше (см. пункт 6.2). Клетки штамма  $\Delta glgA1$ , содержащие этот вектор, использовали для делеции гена *glgA2* с использованием плазмиды pK18mob-*glgA2*-Sp. Среды для конъюгации, а также селективные среды дополнительно содержали ангидротетрациклин в концентрации 500 нг мл<sup>-1</sup>. Клоны отбирали по устойчивости к гентамицину, спектиномицину и канамицину, а генотип проверяли с помощью ПЦР. Полученный штамм с делециями в генах *glgA1* и *glgA2* очищали от плазмиды pCAN01-*glgA2* путем серийных разведений и выращивания в среде без антибиотика канамицина с последующим высеванием на агаризованную среду для отбора колоний, чувствительных к канамицину. Колонии дополнительно проверяли на отсутствие плазмид ПЦР-методом с использованием праймеров для гена *glgA2* *Mt. alcaliphilum* 20Z.

## **6.7. Культивирование наиболее перспективных изолятов в биореакторе**

### **6.7.1. Культивирование метанотрофов из пресноводных экосистем**

Для более полной оценки продукционных и ростовых характеристик полученные изоляты метанотрофов и модифицированные штаммы культивировали в опытном 1,5 л биореакторе (GPC BIO, Франция) с рабочим объемом 1 л. Для отслеживания динамики роста ( $OD_{600}$ ) использовали спектрофотометр Spectroquant Prove 300, Merck, Германия.

Перед началом эксперимента проводили подготовку инокулята объемом 500 мл. Для этого, после многократных пересевов в течение двух недель, ночную культуру исследуемого метанотрофа объемом 10 мл рассеивали в пять флаконов объемом 500 мл с 90 мл среды dAMS следующего состава (мг л<sup>-1</sup>):  $(NH_4)_2SO_4$  – 200; KCl – 125;  $MgSO_4$  – 125, к которой был добавлен 0.1 % (об./об.) раствор микроэлементов следующего состава (г л<sup>-1</sup>): EDTA – 5;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 2;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 0.1;  $MnCl_2 \times 4H_2O$  – 0.03;  $CoCl_2 \times 6H_2O$  – 0.2;  $CuSO_4 \times 5H_2O$  – 0.1;  $NiCl_2 \times 6H_2O$  – 0.02;  $Na_2MoO_4$  – 0.03 и 1% (об./об.) 200 мМ раствора фосфатного буфера (pH 6.3).

Далее ночную культуру объемом 500 мл осаждали центрифугированием в стерильных 50 мл флаконах при 6000 g в течение 8 мин. Осажденную биомассу последовательно ресуспендировали в 15-20 мл стерильной среды dAMS.

Непосредственно перед засевом производили подготовку биореактора к запуску, включавшую стерилизацию оборудования и стартовой среды объемом 1 л, а также калибровку датчиков pH и  $pO_2$ . Среда, используемая в биореакторе, имела следующий состав ( $mg\ l^{-1}$ ):  $(NH_4)_2SO_4$  – 200; KCl – 125;  $MgSO_4$  – 125, с добавлением 0.1 % (об./об.) раствора микроэлементов следующего состава ( $g\ l^{-1}$ ): EDTA – 5;  $CuSO_4 \times 5H_2O$  – 4.4;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 2.8;  $MnSO_4 \times 5H_2O$  – 2.8;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 4.2;  $CoSO_4 \times 6H_2O$  – 0.58;  $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$  – 0.69;  $H_3BO_3$  – 0.6;  $NiSO_4 \times 6H_2O$  – 0.52; pH –  $\sim 3.5$ . Далее проводили титрование среды 0.5% раствором  $NH_4OH$ , который также служил дополнительным источником азота, до достижения значения pH = 6.3. Устанавливали следующие значения параметров биореактора: pH – 6.3; обороты мешалки – 1000 об./мин.; температура – 35–45°C (в зависимости от объекта исследования); начальный расход газовой смеси в соотношении 1:1, а именно  $6000\ cm^3\ ч^{-1}$  природного газа и  $6000\ cm^3\ ч^{-1}$  кислорода-воздуха. После начала логарифмической фазы роста культуры и снижения концентрации растворенного  $O_2$  в среде биореактора подачу кислорода-воздуха увеличивали до  $18000\ cm^3\ ч^{-1}$ , доводя соотношение воздух:метан до 3:1. Все газы поступали в биореактор через стерильную мембрану 0.22 мкм. Измерения  $OD_{600}$  на спектрофотометре проводили раз в два часа. После достижения  $OD_{600}=12-14$  переходили с накопительного на проточный режим, с постепенным увеличением протока с 60 до 250  $ml\ ч^{-1}$ , в зависимости от хода культивирования, не допуская вымывания культуры. Уровень pH контролировали автоматическим титрованием среды 0.5% раствором  $NH_4OH$ .

Культивирование с момента перехода с накопительного в проточный режим являлось нестерильным для формирования естественного пула бактерий-спутников, необходимых для утилизации метаболитов, экскретируемых метанотрофом.

### **6.7.2. Культивирование галофильных метанотрофов**

Культивирование галотолерантных изолятов проводили по схеме, описанной выше, но с использованием среды следующего состава ( $mg\ l^{-1}$ ):  $(NH_4)_2SO_4$  – 600; KCl – 500;  $MgCl_2 \times 6H_2O$  – 7470;  $Na_2SO_4$  – 2850; NaCl – 17000;  $CaCl_2$  – 770;  $H_3BO_3$  – 18;  $NaH_2PO_4$  – 250, с добавлением 0.1 % (об./об.) раствора микроэлементов следующего состава ( $g\ l^{-1}$ ): EDTA – 5;  $CuSO_4 \times 5H_2O$  – 4.4;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 2.8;  $MnSO_4 \times 5H_2O$  – 2.8;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 4.2;  $CoSO_4 \times 6H_2O$  – 0.58;  $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$  – 0.69;  $H_3BO_3$  – 0.6;  $NiSO_4 \times 6H_2O$  – 0.52; pH  $\sim 4.5$ . Проводили титрование этой среды 0.5% раствором  $NH_4OH$ , который служил

дополнительным источником азота, до достижения значения  $pH = 6.5$ . Установка значений параметров биореатора:  $pH = 6.5$ ; обороты мешалки – 700 об./мин.; температура –  $30^{\circ}C$ ; начальный расход газовой смеси в соотношении 1:1, а именно  $6000 \text{ см}^3 \text{ ч}^{-1}$  природного газа и  $6000 \text{ см}^3 \text{ ч}^{-1}$  кислорода-воздуха.

### **6.7.3. Анализ биомассы культур, полученной в ходе накопительного и непрерывного режимов культивирования**

В ходе двух режимов культивирования в биореакторе, накопительного и непрерывного, производили одинаковые манипуляции. Для анализов содержания белка в сухой биомассе и абсолютного сухого веса (АСВ) образцы отбирали либо во время достижения стационарной фазы роста ( $OD_{600}$  14-15) в накопительном режиме, либо в ходе непрерывного роста в протоке ( $OD_{600}$  14-15) культивирования.

Для анализа АСВ отбирали культуру объемом 50 мл, клетки осаждали центрифугированием (центрифуга Eppendorf 5804, Германия) при  $12000g$  10 минут, замораживали при  $-76^{\circ}C$ , а затем лиофилизировали в течение ночи. Сухую биомассу взвешивали на аналитических весах с пересчетом веса на литр культуральной жидкости ( $\text{мг л}^{-1}$ ).

Для анализа содержания белка в биомассе культуру объемом 1 л осаждали центрифугированием при  $12000g$  10 минут, после чего осадок замораживали при  $-76^{\circ}C$  в течение двух часов и лиофильно высушивали. Концентрацию белка в лиофилизированной биомассе определяли по методу Кьельдаля (АОАС, 1990) с помощью анализатора Кьельдаля (FOSS, Швеция).

Мониторинг состава формирующегося сообщества при нестерильном проточном режиме культивирования осуществляли с использованием фазово-контрастной микроскопии на микроскопе AxioPlan 2 (“Zeiss”, Йена, Германия).

Анализ содержания гликогена – запасного питательного вещества – в лиофилизированной биомассе клеток целевых организмов проводили при помощи метода с антроновым реактивом (But *et al.*, 2020). Реактив включает в себя 40 мл 70%  $H_2SO_4$  и 60 мг антронового реактива. Процедура анализа заключается в следующем: 10 мг лиофилизированной биомассы исследуемого образца растворяли в 30% (масс./об.) NaOH объемом 0.5 мл с последующей инкубацией при  $100^{\circ}C$  в течение 30 минут. Затем образцы охлаждали во льду и добавляли 1 мл 96% этанола. Далее образцы инкубировали при  $-20^{\circ}C$

в течение часа, после чего центрифугировали при 14.5 тыс. об./мин. 10 минут, супернатант удаляли, осадок высушивали и растворяли в 0.5 мл дистиллированной воды. Затем доводили рН образцов до ~3 соляной кислотой и снова инкубировали при -20°C в течение часа с последующим центрифугированием при тех же условиях. Надосадочную жидкость сливали, осадок высушивали и растворяли в 1 мл дистиллированной воды.

Для количественного определения 100 мкл образца смешивали с 1 мл реагента и инкубировали 15 минут при 100°C. Оптическую плотность измеряли при длине волны 620 нм (Genesys 50, Thermoscientific, США). Для расчета концентрации гликогена использовали калибровочную кривую, построенную для стандартов глюкозы и поправочного коэффициента 0.9.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### ГЛАВА 7. ПОИСК НОВЫХ БЫСТРОРАСТУЩИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *METHYLOCOCCUS*

Род *Methylococcus* включает в себя аэробных метанотрофов с клетками кокковидной морфологии, обладающими мембранной и растворимой формами метанмонооксигеназы, а также способностью к росту при повышенных температурах. *Methylococcus capsulatus* Bath является наиболее изученным представителем данного рода, так как был использован в качестве модельного организма в ряде классических работ по исследованию биологии и метаболизма метанотрофных бактерий. Виды *Methylococcus* признаны обладателями высокого биотехнологического потенциала, поскольку исходная технология получения бактериального белка из метана была реализована с использованием этих термотолерантных метанотрофов. Ввиду их высокой биотехнологической значимости, важным является поиск новых видов и штаммов представителей рода *Methylococcus*. До начала настоящих исследований род был представлен лишь двумя культивируемыми видами – *Mc. capsulatus* и *Mc. geothermalis*, для которых были доступны полногеномные последовательности только двух штаммов – *Mc. capsulatus* Bath и *Mc. geothermalis* IM1<sup>T</sup>.

#### 7.1. Новые изоляты и их идентификация

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 Mc7 (Таблица 6). Все изоляты были представлены неподвижными грамтрицательными кокками и диплококками (Рисунок 16). Размеры клеток большинства штаммов составляли около 1.12-1.14 мкм, за исключением штамма Mc7, который обладал более крупными клетками – до 1.6 мкм.

Таблица 6 – Источники выделения и некоторые характеристики новых изолятов рода *Methylococcus*, полученных в настоящей работе

Штамм	Источник выделения	Размер клеток, $\mu\text{m}$	Диапазон Т, °С (оптимум)	Диапазон рН (оптимум)	Скорость роста: периодическая культура / биореактор, $\text{ч}^{-1}$
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

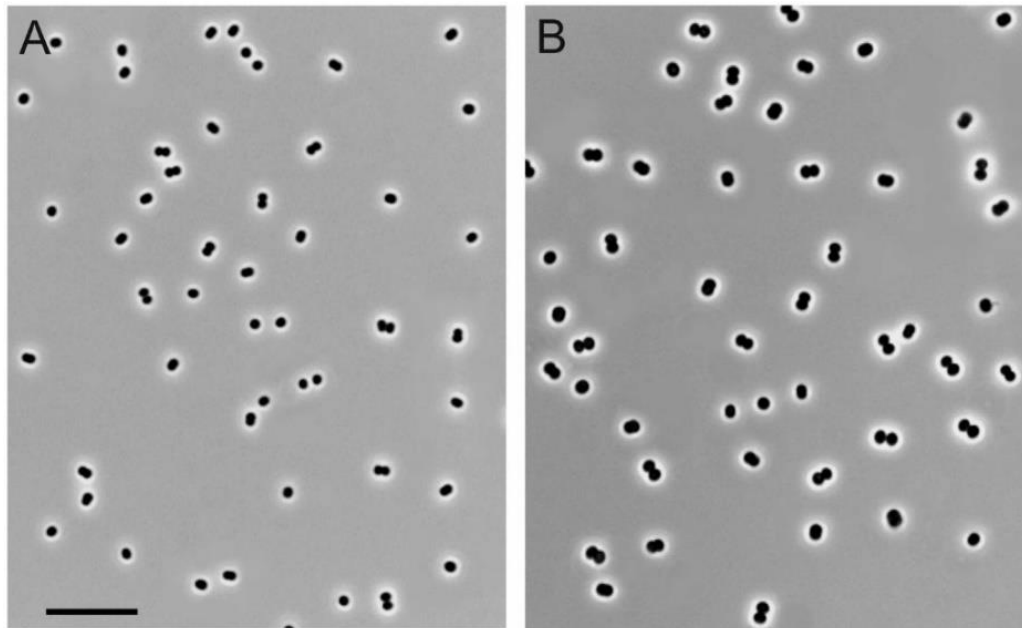


Рисунок 16 – Морфология клеток штаммов KN2 (А) и Mc7 (В), выращенных в жидкой минеральной среде NMS с метаном в газовой фазе. Маркер 10 мкм. Цитировано по Oshkin *et al.*, 2021.



Идентификация изолятов с помощью анализа последовательности гена 16S рРНК подтвердила их принадлежность к роду *Methylococcus*. Изоляты из активного ила очистных сооружений Москвы и Иркутска – MIR, IO1, KN2 – обнаружили наибольшее сходство с *Mc. capulatus* Bath (99.93-99.97% сходства последовательностей генов 16S рРНК). Для штамма ВН, полученного из донных осадков безымянного озера Краснодарского края, это сходство было несколько ниже – 99.02%. Штамм Mc7, полученный из образца покрывающей почвы ТБО Ханты-Мансийского автономного округа, продемонстрировал наиболее высокое сходство последовательности гена 16S рРНК (98.56%) с таковой у *Mc. geothermalis* IM1<sup>T</sup>.

Полные нуклеотидные последовательности геномов новых изолятов были получены с использованием гибридного подхода. Секвенирование на платформе Oxford Nanopore дало 192-278 тыс. прочтений общей длиной 1.05-1.59 млрд. п.о. При секвенировании на платформе Illumina MiSeq было получено в общей сложности 415-3477 тыс. прочтений со средней длиной 250 п.о.

Размеры генома варьировали от 3.2 млн. п.о. у штамма ВН до 4.0 млн. п.о. у штамма Mc7. Содержание пар Г+Ц в ДНК было схожим во всех исследованных геномах и составило 63.3-63.6%. Каждый геном содержал две копии рРНК-оперона, две копии мММО и одну копию рММО. Количество белок-кодирующих генов варьировало от 2912 до 3752. Плазмиды обнаружены не были. Наименьшее количество (17) инсерционных (IS) элементов было обнаружено у штамма KN2, в то время как значительно большее количество IS-элементов (78) наблюдалось у штамма Mc7. Последовательности геномов были депонированы в GenBank под номерами: CP079095 (Mc7); CP079096 (ВН); CP079097 (KN2); CP079098 (IO1); CP097161 (MIR). Характеристики геномов новых изолятов представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Характеристики геномов изолятов, полученных в настоящей работе, в сравнении с таковыми у *M. capsulatus* Bath и *M. geothermalis* IM1<sup>T</sup>

Штаммы	MIR	KN2	ВН	IO1	Mc7	Bath	IM1 <sup>T</sup>
Размер генома, млн. п.о.	3.2	3.6	3.2	3.3	4.0	3.3	3.4
Состав Г+Ц пар, %	63.50	63.49	63.52	63.49	63.44	63.60	63.25
Число белок- кодирующих генов	2872	3289	2912	3008	3752	3043	3091
тРНК	47	48	50	50	48	49	48
5S, 16S, 23S	2, 2, 2	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	2
рММО	1	1	1	1	1	1	1

Значения сходства нуклеотидных последовательностей (average nucleotide identity, ANI), рассчитанные для изолятов IO, KN2, MIR, ВН 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 штаммов Mc7 и *M. geothermalis* IM1<sup>T</sup> составила 88.56%. Таким образом, штамм Mc7 потенциально может представлять новый вид рода *Methylococcus* (Oshkin *et al.*, 2021).

## 7.2. Исследование физиологии и ростовых характеристик изолятов рода *Methylococcus*

В качестве ростовых субстратов все изоляты использовали метан, как источник углерода и энергии. Метан являлся предпочтительным субстратом для всех полученных штаммов. Кроме того, штаммы KN2, MIR и ВН были способны к росту на метаноле, как единственном источнике углерода, в течение 5-6 пересевов. Наиболее широкий диапазон используемых концентраций метанола продемонстрировали штаммы KN2 и MIR – до 3 и 3.5%, соответственно.

Исследования ростового диапазона pH показали сходные значения для всех штаммов - от 5.0 до 7.5, при этом наиболее широким диапазоном pH обладал штамм KN2 – от 4.6 до 8.5. В качестве источников азота все изоляты могли использовать ионы аммония и нитрат-ионы. Кроме того, KN2 и ВН могли использовать глутамин, а IO1

показал рост с пептоном как источником азота. Все культуры показали бóльшую толерантность к хлориду натрия в среде, по сравнению с наиболее исследованным штаммом *Ms. capsulatus* Bath (0.5% вес/об.), при этом наибольшую устойчивость обнаружил штамм MIR, показавший способность к росту при 1.5% (вес/об.) NaCl в среде.

Особое внимание было уделено анализу удельных скоростей роста изолятов (Рисунке 17). Анализ проводили в сравнении с *Ms. capsulatus* Bath в диапазоне температур от 25 до 55°C. При повышенных температурах (от 40 до 50°C) новые изоляты показали высокие скорости роста от 0.18 до 0.32 ч<sup>-1</sup>, что сопоставимо с таковыми у промышленных штаммов метанотрофов. Штаммы IO1 и KN2 показали бóльшую термотолерантность с оптимумом роста при 48-50°C. Наиболее низкий температурный оптимум при 40°C продемонстрировал изолят, выделенный из почвы Западной Сибири – штамм Mc7. Наибольшая скорость роста была зарегистрирована для штамма MIR – 0.32 ч<sup>-1</sup>, а также для KN2 и Mc7 – 0.22 ч<sup>-1</sup> и 0.23 ч<sup>-1</sup>, соответственно.

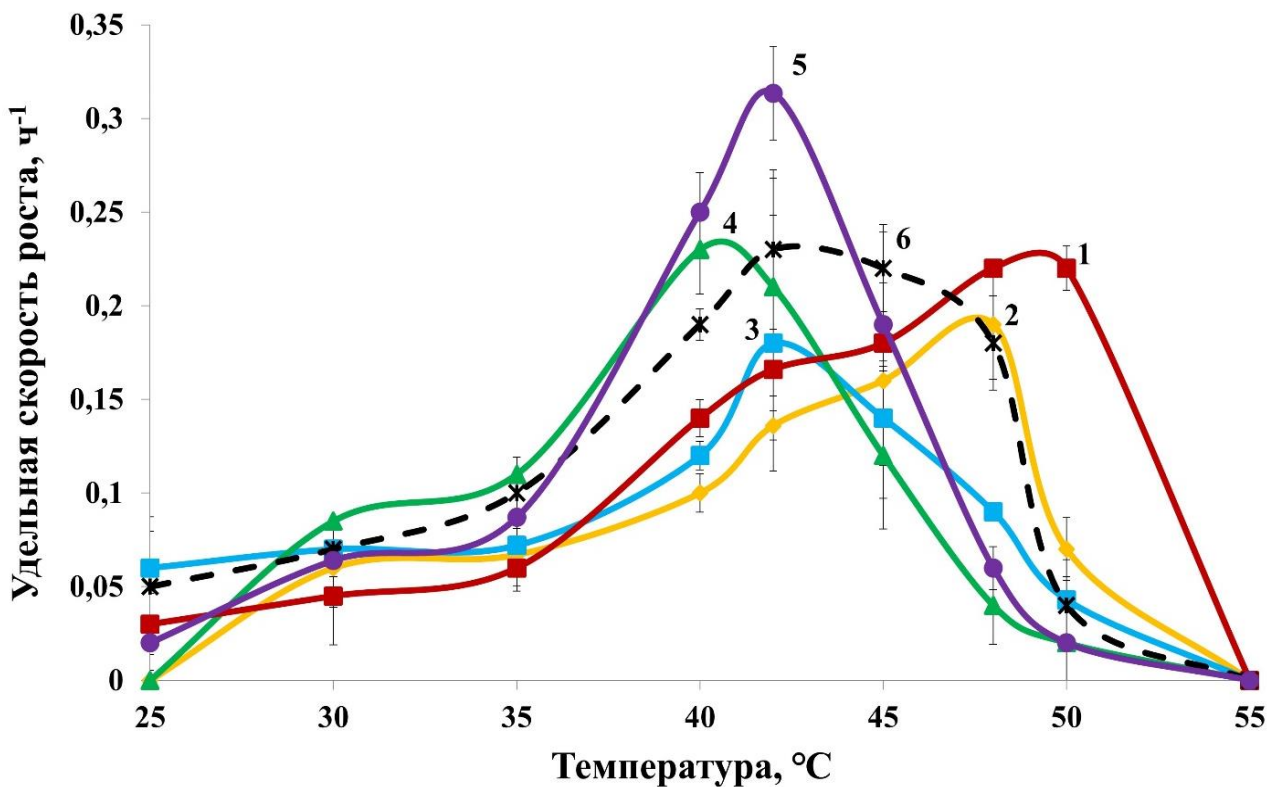


Рисунок 17 – Удельные скорости роста новых изолятов на метане в зависимости от температуры. В качестве эталонного организма использовали *Ms. capsulatus* Bath. Обозначения кривых: (1) штамм KN2; (2) штамм IO1; (3) штамм BH; (4) штамм Mc7; (5) штамм MIR; (6) *Ms. capsulatus* Bath. Цитировано с изменениями по Oshkin *et al.*, 2021.

Таким образом, были получены и охарактеризованы 4 новых термотолерантных штамма вида *Ms. capsulatus* – IO1, KN2, MIR, ВН, обладающие высокими ростовыми характеристиками, а также штамм Мс7 – потенциально представляющий новый вид рода *Methylococcus*.

## ГЛАВА 8. ПОЛУЧЕНИЕ БЫСТРОРАСТУЩИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *METHYLOMONAS*

Помимо представителей рода *Methylococcus* биотехнологически значимыми метанотрофами считаются представители рода *Methylomonas*, способные к синтезу каротиноидов. Этот род представлен подвижными палочковидными клетками, являющимися облигатными метанотрофами, использующими метан в качестве единственного источника углерода и энергии. Каротиноиды представляют собой пигменты, обладающие антиоксидантной активностью. Ряд изолятов этого рода был получен и охарактеризован в настоящей работе.

### 8.1. Идентификация изолятов рода *Methylomonas*

Выделенные в чистые культуры метанорофные бактерии рода *Methylomonas* были получены из образцов донных отложений различных пресноводных водоемов (Таблица 8). Аликвоты образцов донных отложений использовали в качестве инокулята для получения накопительных культур метанотрофных бактерий.

Таблица 8 – Источники выделения и некоторые характеристики полученных штаммов *Methylomonas*

Штамм	Место отбора проб	Ближайший родственник	Цвет колонии	Размер клетки, мкм	Диапазон температур (опт), °С	Скорость роста, ч <sup>-1</sup>
<b>MP1<sup>T</sup></b>	Безымянное озеро, Краснодарский край, Россия (N 44.42°; E 39.18 °)	<i>Mm. koyamae</i> Fw12E-Y <sup>T</sup>	Красный	1.1/2.1	8–45 (35)	0.33
<b>MY1</b>			Желтый	1.5/1.9	8–37 (30)	0.29
<b>MV1</b>			Розовый	0.7/2.2	4–38 (30)	0.25
<b>MO1</b>	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
<b>MW1<sup>T</sup></b>	Река Хоста, Краснодарский край, Россия (N 43.53°; E 39.97°)	<i>Mm. methanica</i> S1 <sup>T</sup>	Белый	0.9/1.5	10–35 (30)	0.13

Из образца ила безымянного пруда Краснодарского края было получено три штамма представителей рода *Methylomonas*, при этом для всех из них ближайшим таксономически охарактеризованным родственником являлся *Mm. koyamae* Fw12E-Y<sup>T</sup> с уровнем сходства последовательностей гена 16S рРНК 97.91% (штамм **MV1**), 100% (штамм **MY1**) и 97.16% (штамм **MP1<sup>T</sup>**). Последовательность гена 16S рРНК штамма **MO1**, выделенного из донных отложений Мещерского пруда Москвы, обнаруживала 99.67% сходства с «*Mm. denitrificans*» FJG1 и 97.32% с *Mm. methanica* MC09. Штамм **MW1<sup>T</sup>** был выделен из донных отложений горной реки Хоста, Краснодарский край, и демонстрировал 97.29% сходства последовательностей генов 16S рРНК с *Mm. methanica* S1<sup>T</sup>.

Геномы изолятов, аналогично штаммам *Methylococcus*, были секвенированы с использованием гибридного подхода. Секвенирование Oxford Nanopore дало 211-258 тыс. прочтений общей длиной 1.2-1.4 млрд. п.о. Секвенирование на платформе Illumina MiSeq дало прочтений общей длиной 0.6-1.1 млрд. п.о. Размеры генома варьировали от 4.95 млн. п.о. у штамма **MY1** до 5.42 млн. п.о. у штамма **MV1**. Содержание Г+Ц-пар в ДНК варьировало от 51.44% до 56.16%. Штамм **MP1<sup>T</sup>** показал наличие четырех копий оперона рРНК, в то время как другие геномы *Methylomonas* содержали только три копии оперона рРНК. Это может объяснить высокую скорость роста штамма **MP1<sup>T</sup>**. Каждый геном содержал одну копию кластера генов, кодирующих мММО. Количество белок-кодирующих последовательностей варьировало от 4201 до 4735.

Значения ANI, рассчитанные для штаммов **MY1**, **MP1<sup>T</sup>**, **MV1** и *Mm. koyamae* JCM 16701<sup>T</sup>, составили 96.8%, 85.0% и 77.9% соответственно. Значения ANI, полученные при сравнении геномных последовательностей штаммов **MO1**, **MW1<sup>T</sup>** с таковой *Mm. fluvii* EbV<sup>T</sup> составили 89.0% и 79.4%, соответственно. Тот факт, что значения ANI для геномов штаммов **MP1<sup>T</sup>**, **MV1**, **MW1<sup>T</sup>**, **MO1** и ранее описанных видов ниже порогового – 95%, позволяет сделать заключение о том, что данные изоляты представляют собой новые виды рода *Methylomonas*.

## **8.2. Анализ физиологии и ростовых характеристик изолятов рода *Methylomonas*.**

Клетки новых изолятов были представлены короткими подвижными палочками, немного отличающимися формой, от почти овальной до вытянутой. Все штаммы

образовывали на чашках Петри слизистые круглые колонии диаметром 2-3 мм. При этом полученные штаммы различались цветом образуемых колоний, от белого до ярко-оранжевого и красного (Рисунок 18).

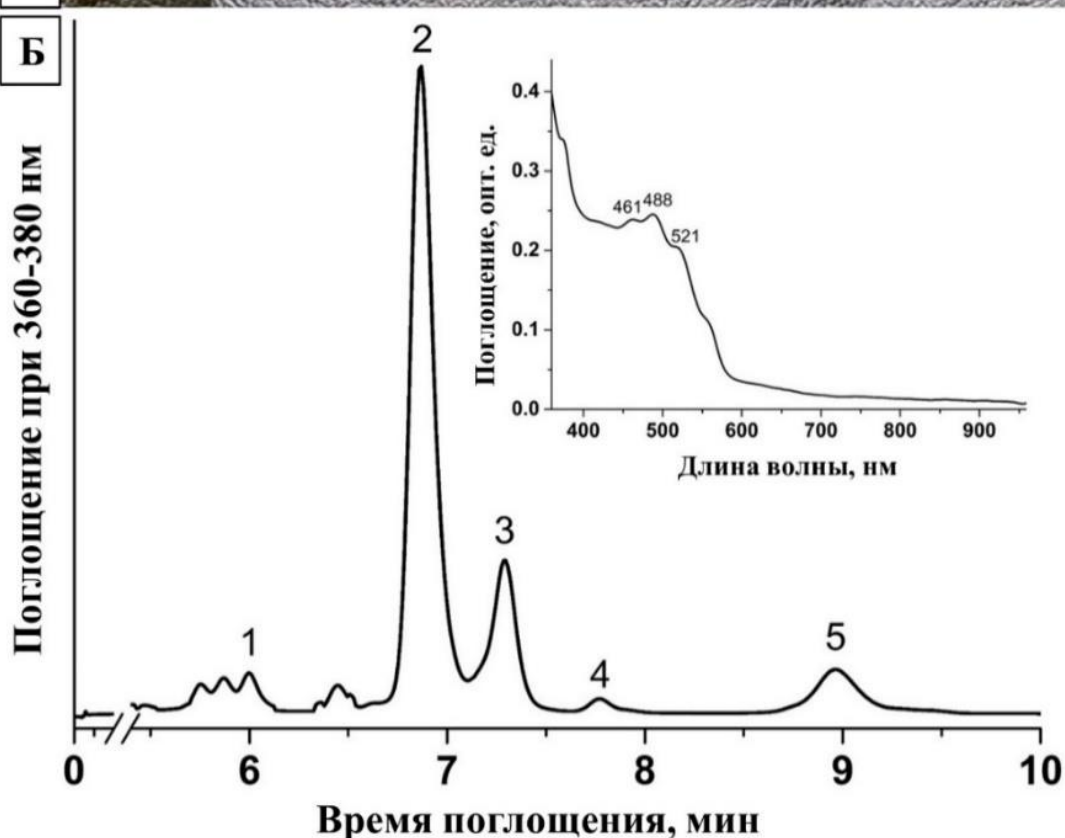


Рисунок 18 – Пигментация клеток новых изолятов рода *Methylobionas*. (А) Осажденная биомасса штаммов, слева направо: MW1<sup>T</sup>, MV1, MO, MY1 и MP1<sup>T</sup>. (Б) ВЭЖХ экстрагированных пигментов штамма MP1<sup>T</sup>. Номера пиков: **1** – 4'-апо-3,4-дидегидроликопин (C35); **2** – 4,4'-диаполикопин-4,4'-диовая кислота (C30); **3** – 1,1'-дигидрокси-3,4-дидегидроликопин (C40); **4** – 3,4,3',4' – тетрадегидроликопин (C40); **5** – 4,4'-диаполикопиновая кислота (C30). Вставка: спектр поглощения пигментного экстракта штамма MP1<sup>T</sup> в этаноле. Цитировано по Oshkin, Tikhonova, Suleimanov *et al.*, 2023.

Каротиноиды были выявлены в экстрактах пигментов всех штаммов, кроме MW1<sup>T</sup>, который является исключением из всех известных к настоящему времени представителей рода *Methylomonas*. Анализ генома штамма MW1<sup>T</sup> показал отсутствие характерных для большинства представителей рода *Methylomonas* генов 4,4'-диапофитоендесатуразы (*crtN*) и 4,4'-диаполикопиноксидазы (*crtP*), что объясняет неспособность штамма к синтезу каротиноидов (Сулейманов *и др.*, 2023). Во фракции пигментов остальных изолятов преобладали каротиноиды С30, в меньших количествах были обнаружены каротиноиды С40. Основным каротиноидом, обнаруженным у пигментированных изолятов, была 4,4'-дипликопин-4,4'-диоевая кислота (С30). Штаммы MY1, MO1 и MP1<sup>T</sup> также содержали 1,1'-дигидрокси-3,4-дидегидроликопин (С40) в качестве второго основного каротиноида (Oshkin *et al.*, 2023).

Оценку ростовых характеристик изолятов проводили в диапазоне температур от 4 до 45°C. Все штаммы демонстрировали оптимальный рост в диапазоне температур 30-35°C. Наиболее широкий ростовой диапазон температур (8-45°C) показал штамм MP1<sup>T</sup>, с максимальной скоростью роста 0.33 ч<sup>-1</sup> при 35°C. Высокую скорость роста показал также штамм MY1 – 0.29 ч<sup>-1</sup> при температуре 30°C. Наименьшая скорость роста была зарегистрирована для штамма MW1<sup>T</sup> и составила 0.13 ч<sup>-1</sup> (Таблица 8).

Для целей более детального описания были отобраны штаммы MP1<sup>T</sup> и MW1<sup>T</sup>. Штамм MP1<sup>T</sup> обладал самым высоким температурным оптимумом, а также высокой скоростью роста, сопоставимой с таковой у известных продуцентов, то есть являлся биотехнологически перспективным. Штамм MW1<sup>T</sup> был выбран по причине своей исключительности среди представителей рода *Methylomonas*, поскольку не обладал способностью синтезировать каротиноиды. Филогенетическое положение этих штаммов относительно таксономически описанных представителей рода *Methylomonas* показано на рисунке 19.



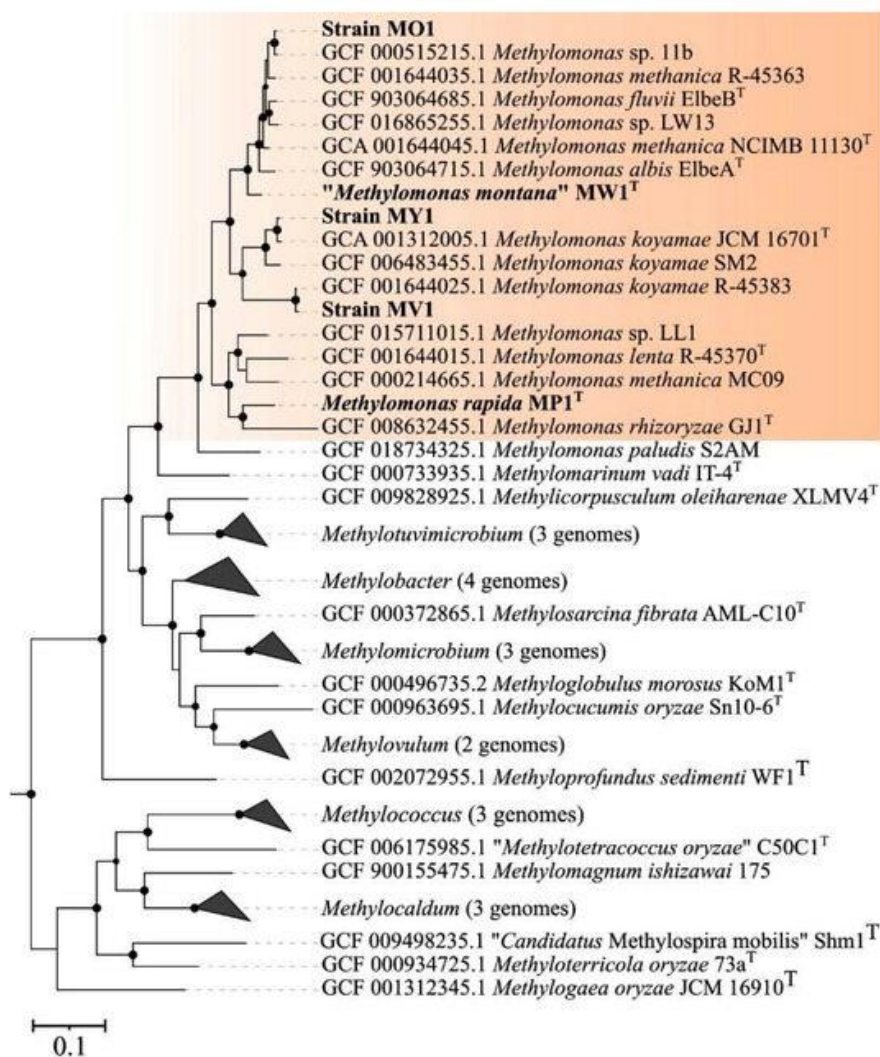


Рисунок 19 – Филогеномная дендрограмма, построенная по результатам сравнительного анализа 120 маркерных белков, кодируемых в геномах новых штаммов (выделены жирным шрифтом) и других метанотрофов *Gammaproteobacteria*. Клада рода *Methylobacterium* выделена оранжевым цветом. Маркер – 0.1 замена на аминокислотную позицию. Цитировано по Oshkin, Tikhonova, Suleimanov *et al.*, 2023.

## 8.3 Таксономическое описание новых видов рода *Methylobacterium*

### 8.3.1. Описание *Methylobacterium rapida* sp. nov.

#### Морфология, ультраструктура клеток и филогенетическое положение

Штамм MP1<sup>T</sup> образовывал на агаризованной среде dNMS слизистые разрастания красно-оранжевого цвета (Рисунок 20А). Отдельные округлые колонии размером 2-3 мм имели выпуклую форму, ровные края и гладкую поверхность. В жидкой среде культура росла в виде гомогенной суспензии красного цвета, не образуя поверхностных пленок или агрегатов и не выделяя пигмента в среду культивирования. Штамм MP1<sup>T</sup> был представлен

высокоподвижными палочковидными клетками размером  $1,10 \pm 0,03 \times 2,10 \pm 0,08$  мкм (Рисунок 20Б). Образование цепочек клеток отмечено не было. Электронная микроскопия ультратонких срезов клеток 1-2-дневных культур выявила типичное грамтрицательное строение клеточной стенки и наличие внутрицитоплазматических мембран (ICM), расположенных в виде стопок везикулярных дисков (Рисунки 20В-Г). Такое расположение ICM характерно для метанотрофов I типа.

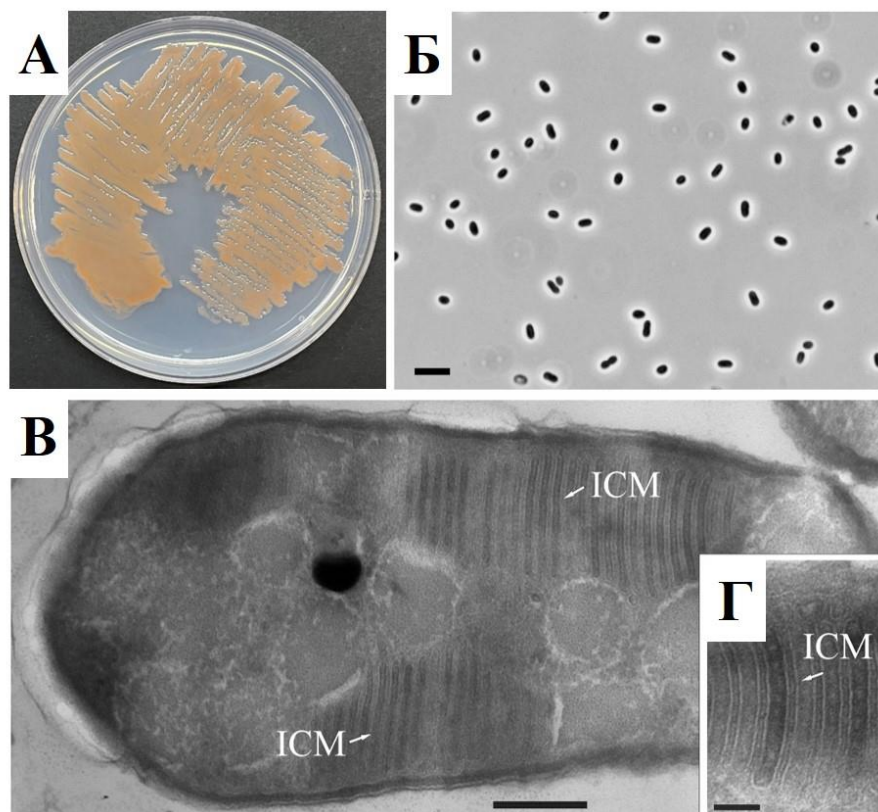


Рисунок 20 – Морфология и ультраструктура клеток изолята MP1<sup>T</sup>. (А) Рост штамма MP1<sup>T</sup> на агаризованной среде dNMS после недели инкубации в эксикаторах с 30% (об./об.) метана в газовой фазе. (Б) Фазово-контрастные микрофотографии клеток штамма MP1<sup>T</sup>. Маркер, 5 мкм. (В) Электронная микрофотография ультратонкого среза клетки. Маркер, 200 нм. (Г) Увеличенный фрагмент клетки с внутрицитоплазматическими мембранами (ICM). Маркер, 50 нм. Цитировано по Tikhonova, Suleimanov *et al.*, 2023.

Анализ последовательности гена 16S рРНК штамма MP1<sup>T</sup> показал его принадлежность к семейству *Methylococcaceae* класса *Gamma*proteobacteria, с ближайшим родством к таксономически описанному представителю – *Mm. koyamae* Fw12E-Y<sup>T</sup> (сходство последовательностей генов 16S рРНК 97.16%) (Рисунок 21). Сходство последовательности гена 16S рРНК штамма MP1<sup>T</sup> с таковыми у других

таксономически описанных представителей рода *Methylomonas* составило 95.45–97.16%, что указывало на его принадлежность к новому виду этого рода. Последовательность была депонирована в GenBank под номером ON819564.

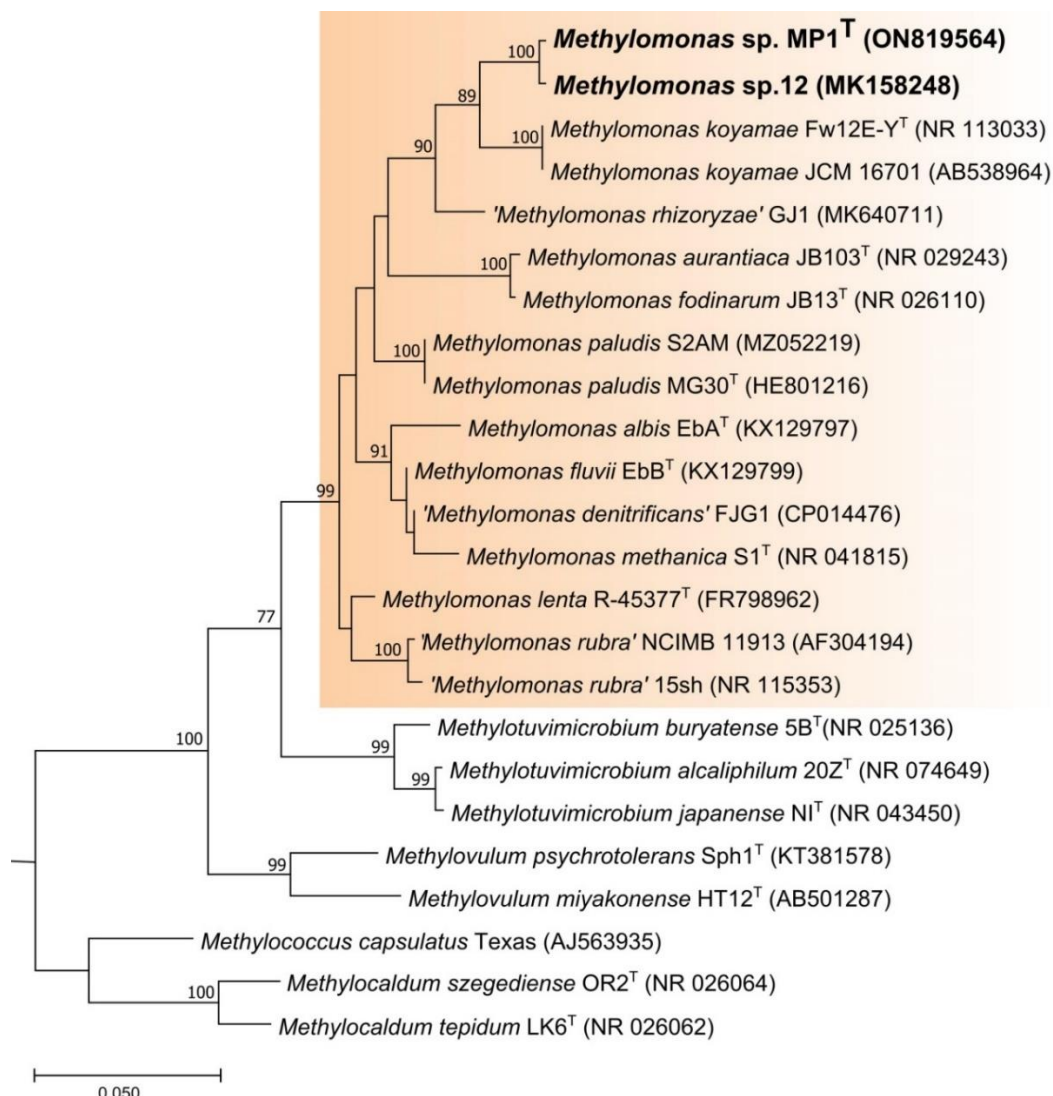


Рисунок 21 – Дендрограмма, построенная на основе результатов сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК штамма MP1<sup>T</sup>, таксономически описанных представителей рода *Methylomonas* и некоторых других метанотрофных бактерий семейства *Methylococcaceae*. Филогенетический кластер рода *Methylomonas* выделен оранжевым цветом. Маркер – 0.05 замен на нуклеотидную позицию. Цитировано по Tikhonova, Suleimanov *et al.*, 2023.

Последовательности гена 16S рРНК штамма MP1<sup>T</sup> и таксономически неохарактеризованного штамма 12 практически идентичны друг другу (сходство 99.59%) (Рисунок 21). Штамм 12 был выделен в 1970-х годах из безымянного пресноводного водоема в Пуцино Московской области и первоначально был идентифицирован как

представитель вида '*Methylomonas methanica*' (Гальченко и др., 1975). Эту бактерию интенсивно исследовали как потенциального продуцента белка одноклеточных (Gayazov *et al.*, 1985), а также использовали в качестве модельного организма в ряде биохимических исследований (Trotsenko and Shishkina, 1990; Beschastny *et al.*, 1992; Reshetnikov *et al.*, 2019).

Согласно филогенетическому анализу, штаммы MP1<sup>T</sup> и 12 формируют отдельную ветвь видового уровня, наиболее близкую к ветви вида *Methylomonas koyamae* (Рисунок 21).

### **Физиологические характеристики**

В качестве субстратов роста штамм MP1<sup>T</sup> использовал только метан и метанол. Рост на метаноле наблюдался в широком диапазоне концентраций, до 5% (об./об.). Наиболее активный рост с удельной скоростью 0.185 ч<sup>-1</sup> был зарегистрирован при 1.0% (об./об.) концентрации метанола в среде. После 5-6 генераций, однако, рост культуры на метаноле замедлялся и в дальнейшем прекращался, поэтому длительное культивирование штамма MP1<sup>T</sup> на метаноле было невозможным. На полиуглеродных соединениях (этанол, глюкоза, ацетат, пируват, малат, сукцинат и цитрат) роста не наблюдалось. В качестве источников азота штамм был способен использовать нитрат, нитрит, ионы аммония и мочевины.

Штамм MP1<sup>T</sup> рос в диапазоне pH от 5.5 до 7.8, с оптимумом при pH 6.3. Температурный диапазон роста составил 8-45°C, с оптимумом при 35°C. Содержание NaCl в среде до концентрации 0.5-1% (вес/об.) стимулировало рост культуры, при концентрациях NaCl выше 1% наблюдалось ингибирование роста, а в среде с содержанием NaCl выше 3% роста не происходило. Максимальная удельная скорость роста штамма MP1<sup>T</sup>, достигаемая в оптимальных условиях, составила 0.33 ч<sup>-1</sup>, что соответствует времени генерации 2.1 ч.

Анализ синтезируемых каротиноидов показал преобладание производных ликопина - 4,4'-диапликопин-4,4'-диовой кислоты, 1,1'-дигидрокси-3,4-дидегидроликопина и 4,4'-диапликопиновой кислоты.

### Анализ генома

Секвенирование генома штамма MP1<sup>T</sup> на платформе Oxford Nanopore дало 150 тыс. прочтений средней длиной 6.2 тыс. п.о. Секвенирование на платформе Illumina MiSeq позволило получить в общей сложности 1.3 млн. прочтений средней длиной 300 п.о. В результате сборки прочтений был получен кольцевой геном размером 4.6 млн. п.о., содержащий около 4.2 тыс. белок-кодирующих последовательностей. Содержание Г+Ц пар в ДНК штамма MP1<sup>T</sup> составило 52.8 %.

Сравнительный геномный анализ подтвердил принадлежность нового изолята к роду *Methylomonas*. Значения идентичности нуклеотидных последовательностей (ANI) геномов штамма MP1<sup>T</sup> и других описанных видов этого рода лежали в диапазоне от 82 до 85%, что позволило предположить принадлежность штамма MP1<sup>T</sup> к новому виду рода *Methylomonas*. В подтверждение этого были рассчитаны значения ДНК:ДНК гибридизации с другими видами рода с доступными последовательностями генома; они находились в диапазоне 19.6–22.9%.

Последовательность генома содержала 4 копии рРНК оперона, что является самым большим количеством для представителей рода *Methylomonas*, а также 50 генов тРНК. В геноме штамма MP1<sup>T</sup> обнаружена одна копия кластера генов *pmoCAB*, кодирующих мММО, при этом кластер генов, кодирующий рММО, отсутствовал. Также были выявлены гены, кодирующие два изофермента окисления метанола – MxaFI и HoxF, Ca- и La-зависимые метанолдегидрогеназы, соответственно.

Гены фиксации атмосферного азота, кодирующие как Mo-Fe-содержащую, так и V-Fe-содержащую изоформы нитрогеназы, присутствующие в большинстве доступных геномов представителей рода *Methylomonas*, отсутствовали в геноме штамма MP1<sup>T</sup>. В геноме были выявлены три локуса CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – кластерные короткие палиндромные повторы с регулярными интервалами) и набор CRISPR-ассоциированных (Cas) генов.

На основании приведенных выше характеристик штамм MP1<sup>T</sup> был классифицирован как представитель нового вида рода *Methylomonas*, *Methylomonas rapida* sp. nov. Штамм можно рассматривать как перспективного продуцента белка благодаря его способности к быстрому и продуктивному росту на природном газе (Tikhonova, Suleimanov *et al.*, 2023). Сравнение характеристик нового вида с таковыми у типовых штаммов других видов рода *Methylomonas* представлено в Таблице 9.

Таблица 9 – Основные характеристики, отличающие штамм MW1<sup>T</sup> и MP1<sup>T</sup> от других видов рода *Methylomonas*: 1 – *Mm. montana* MW1<sup>T</sup> (Сулейманов *и др.*, 2023); 2 – *Mm. rapida* MP1<sup>T</sup> (Tikhonova, Suleimanov *et al.*, 2023); 3 – *Mm. paludis* MG30<sup>T</sup> (Danilova *et al.*, 2013); 4 – *Mm. albis* EbA<sup>T</sup> (Bussmann *et al.*, 2021) 5 – *Mm. fluvii* EbB<sup>T</sup> (Bussmann *et al.*, 2021); 6 – *Mm. methanica* S1<sup>T</sup> (Bowman *et al.*, 1993); 7 – *Mm. fodinarum* UQM3268<sup>T</sup> (Bowman *et al.*, 1990); 8 – *Mm. aurantiaca* UQM3406<sup>T</sup> (Bowman *et al.*, 1990); 9 – *Mm. scandinavica* SR5<sup>T</sup> (Kalyuzhnaya *et al.*, 1999); 10 – *Mm. koyamae* Fw12E-Y<sup>T</sup> (Ogiso *et al.*, 2012); 11 – *Mm. lenta* R-45377<sup>T</sup> (Hoefman *et al.*, 2014). Цитировано по Сулейманов *и др.*, 2023.

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Размер, мкм	0.9×1.5	1.1×2.1	1.3×3	0.8×2.5	0.8×2.5	0.7×1.6	0.7×1.2	0.6×1.3	0.8×1.7	0.9×1.7	0.9×2.0
Пигментация колоний	Белая	Розовая	Кремовая	Кремовая	Розовая	Розовая	Оранжевая	Оранжевая	Розовая	Красная	Кремовая
Формирование цепочек	–	–	+	–	–	–	+	+	+	–	–
Подвижность	+	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+
Температура (оптимум)	8-37 (30)	8-45 (35)	8-30 (25)	1-30 (15)	1-30 (15)	10-37 (25)	10-35 (25)	15-40 (35)	5-30 (15)	10-40 (30)	15-28 (20)
Диапазон pH (оптимум)	5.5-7.5 (6.5)	5.5-7.3 (6.5)	3.8-7.3 (6.0)	6.0-9.0 (6.0)	5.5-9.0 (6.0)	5.5-9.0 (7.0)	5.5-9.0 (7.0)	5.0-9.0 (6.5)	5.0-9.5 (7.2)	5.5-7.0 (6.5)	6.3-7.8 (7.0)
Максимальное содержание NaCl, %	1	3	1	5	1.5	1.5	н.о.	н.о.	1	0	1
Рост на метаноле	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
pMMO	–	–	–	+	+	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	–	–
Фиксация N <sub>2</sub>	+	–	+	±	±	н.о.	+	+	н.о.	+	–
Содержание Г+Ц в ДНК (%)	52.4	52.8	48.5	51.1	51.5	52.0*	58.4*	56.5*	53.3*	57.1	47.0

н.о. – не определено; \*- по данным температуры плавления (T<sub>m</sub>).

### Диагноз нового вида – *Methylomonas rapida* sp. nov.

*Methylomonas rapida* sp. nov. (ra.pi'da. L. fem. adj. *rapida* – быстрая).

Колонии от темно-оранжевого до красного цвета. Клетки представляют собой высокоподвижные короткие палочки (шириной  $1,10 \pm 0,03$  мкм и длиной  $2,10 \pm 0,08$  мкм). Клетки имеют один полярный жгутик. Источниками углерода являются метан и метанол. Метанол поддерживает рост в широком диапазоне концентраций, до 5% (об./об.); наиболее активный рост происходит при концентрации метанола 3.0% (об./об.). На полиуглеродных соединениях роста не наблюдается. В качестве источников азота используются нитрат, нитрит, ионы аммония и мочевины. Рост происходит при pH 5.5-7.8 (оптимум pH 6.3) и при температуре от 8 до 45°C (оптимум 35°C). NaCl ингибирует рост при концентрации выше 1% (вес/об.). Основными синтезируемыми каротиноидами являются 4,4'-диап्लीкопин-4,4'-диовая кислота, 1,1'-дигидрокси-3,4-дидегидроликопин и 4,4'-диап्लीкопиновая кислота. Типовым штаммом вида является штамм MW1<sup>T</sup> (=VKM В-3663<sup>T</sup> = КСТС 92586<sup>T</sup>), выделенный из донных отложений безымянного озера Краснодарского края, Россия.

### 8.3.2. Описание *Methylomonas montana* sp. nov.

#### Морфология, ультраструктура клеток и филогенетическое положение

Штамм MW1<sup>T</sup> образовывал на агаризованной среде dNMS слизистые разрастания белого цвета (Рисунок 21А). Отдельные колонии диаметром 2-3 мм имели круглую выпуклую форму с ровными краями и гладкой поверхностью. В жидкой среде на качалке (150 об./мин) культура росла в виде гомогенной суспензии белого цвета. При инкубации в стационарных условиях наблюдалось образование поверхностных пленок и клеточных агрегатов. Клетки штамма MW1<sup>T</sup> имели морфологию, типичную для представителей рода *Methylomonas* – небольшие, короткие подвижные палочки, размером  $0.9 \pm 0.04 \times 1.5 \pm 0.2$  мкм (Рисунок 21Б). Электронная микроскопия ультратонких срезов клеток выявила типичное грамтрицательное строение клеточной стенки и наличие внутрицитоплазматических мембран, характерных для метанотрофов I типа (Рисунок 21В).

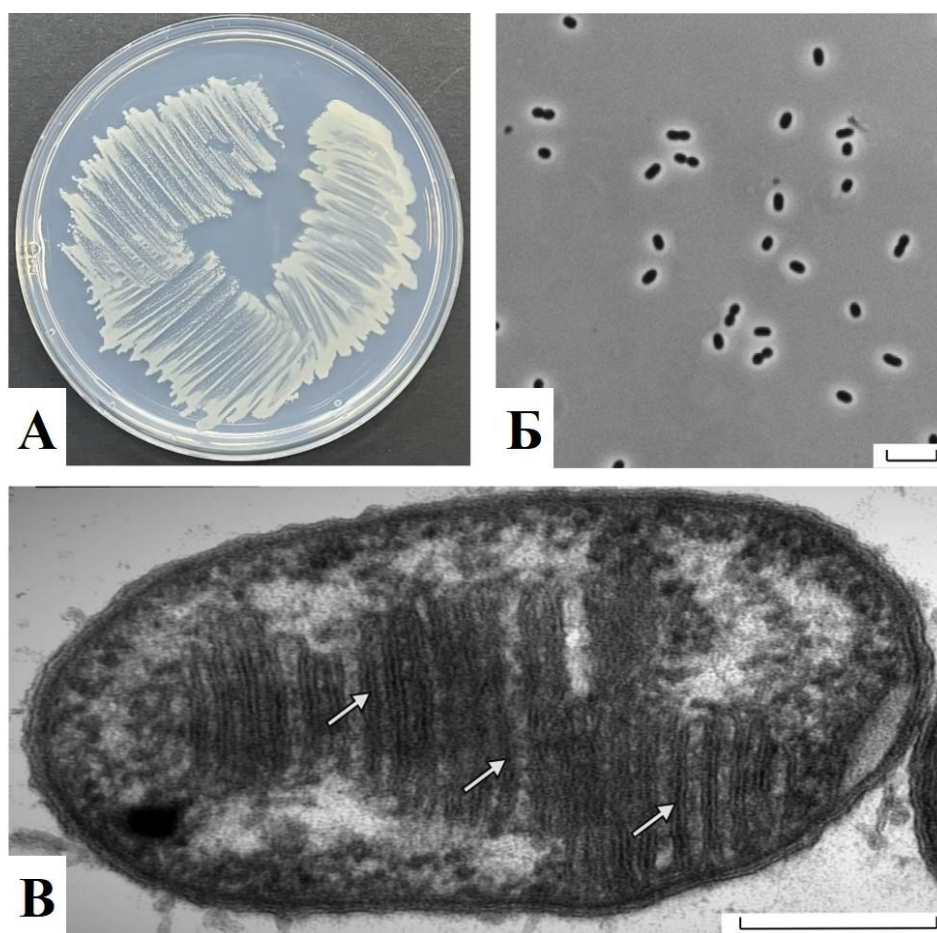


Рисунок 21 – Морфология и ультраструктура клеток штамма MW1<sup>T</sup>. (А) Рост штамма на агаризованной среде dNMS после недели инкубации в эксикаторах с 30% (об./об.) метана в газовой фазе. (Б) Фазово-контрастные микрофотографии клеток штамма MW1<sup>T</sup>. Маркер, 5 µм. (В) Электронная микрофотография ультратонкого среза клетки; маркер, 0.5 µм. Стопки внутрицитоплазматических мембран (ICM) указаны белыми стрелками. Цитировано по Сулейманов *и др.*, 2023.

Сравнительный анализ последовательности гена 16S рРНК штамма MW1<sup>T</sup> подтвердил его принадлежность к роду *Methylomonas* семейства *Methylococcaceae* класса *Gamma proteobacteria*, с ближайшим родственным типовым штаммом *Mm. fluvii* EbB<sup>T</sup> (выделен из осадков реки Эльба) со сходством последовательностей генов 16S рРНК 98.47%. С другими представителями рода *Methylomonas* сходство последовательностей генов 16S рРНК составило 95.48-98.47%, что позволило сделать предположение о принадлежности штамма MW1<sup>T</sup> к новому виду этого рода (Рисунок 22).



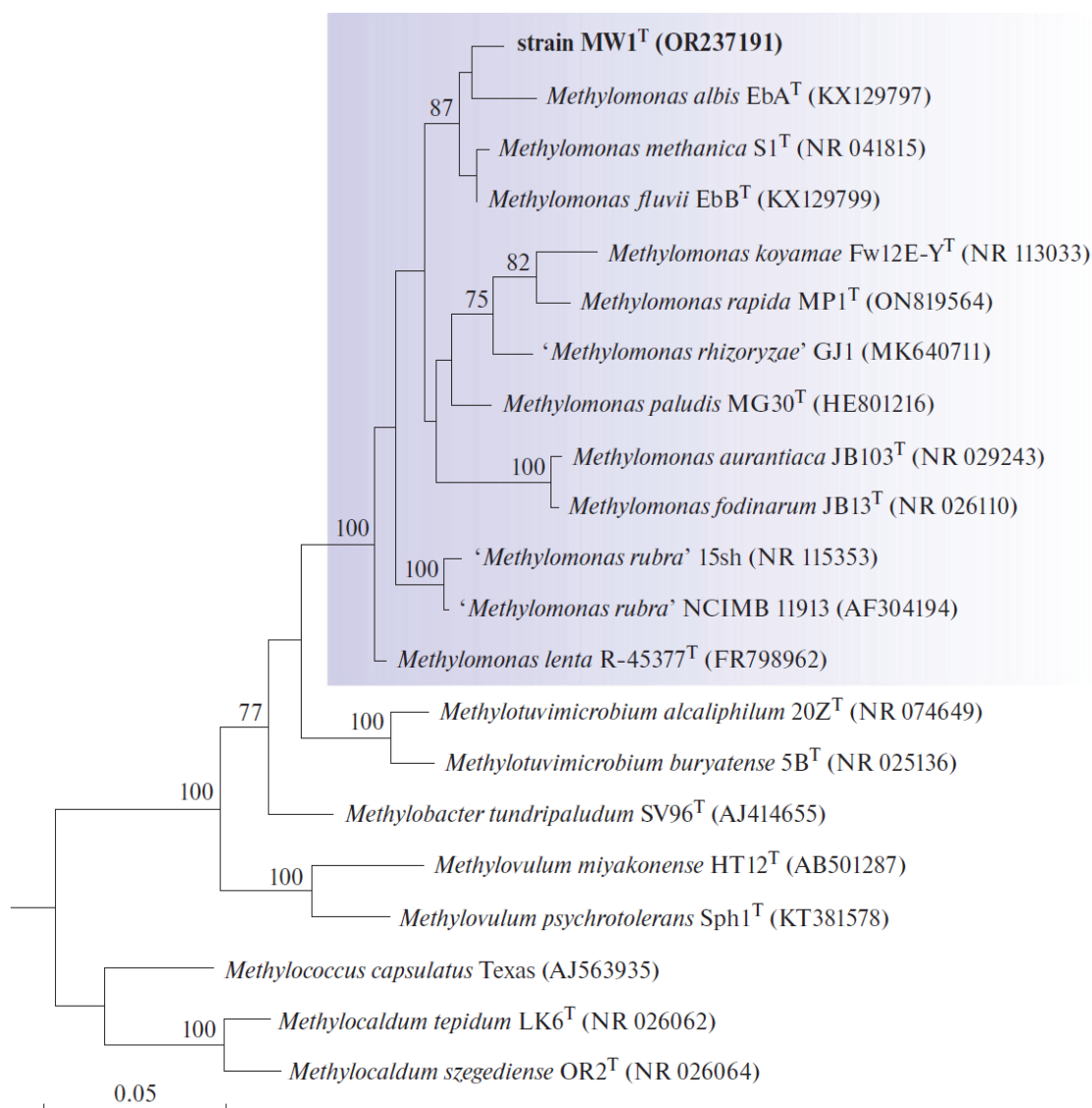


Рисунок 22 – Дендрограмма, построенная на основе результатов сравнительного анализа последовательностей генов 16S рРНК штамма MW1<sup>T</sup>, таксономически описанных представителей рода *Methylomonas* и некоторых других метанотрофных бактерий семейства *Methylococcaceae*. Филогенетический кластер рода *Methylomonas* выделен синим цветом. Маркер – 0.05 замен на нуклеотидную позицию. Цитировано по Сулейманов *и др.*, 2023.

### Физиологические характеристики

Единственными источниками углерода и энергии, используемыми штаммом MW1<sup>T</sup>, были метан и метанол. Последний поддерживал рост культуры в широком диапазоне концентраций – до 3% (об./об.). Источниками азота служили нитраты, ионы аммония, формамид, глутамин, серин, аланин, пептон, казаминовые кислоты, мочевины. В условиях низкой концентрации кислорода штамм MW1<sup>T</sup> был способен к фиксации атмосферного азота.

Штамм MW1<sup>T</sup> рос в диапазоне рН от 5.5 до 7.5, с оптимумом при 6.5. Температурный диапазон роста этой метанотрофной бактерии составлял 8-37°C, с оптимумом при 35°C. Концентрация хлорида натрия в среде более чем 1% (вес/об.) ингибировала рост. Анализ ростовых характеристик в оптимальных условиях показал удельную скорость роста 0.13 ч<sup>-1</sup>.

### Анализ генома

Полная последовательность генома штамма MW1<sup>T</sup> была получена с использованием гибридного подхода. Секвенирование на платформе Oxford Nanopore дало 266 тыс. прочтений общей длиной 1.63 млрд. п.о. При секвенировании на платформе Illumina MiSeq было получено в общей сложности 3.6 млн прочтений, общая длина которых составила 1.1 млрд. п.о. В результате сборки был получен один контиг длиной 4.6 млн. п.о. Количество кодирующих последовательностей в полученном геноме штамма MW1<sup>T</sup> составило около 4.2 тыс. Содержание Г+Ц в ДНК составило 52.4%.

Оценка уровня сходства нуклеотидных последовательностей (ANI) показала 79.4-82.1% сходства штамма MW1<sup>T</sup> с представителями других видов рода *Methylomonas*. ДНК:ДНК гибридизация генома штамма MW1<sup>T</sup> с таковыми у филогенетически близких видов рода *Methylomonas* выявила менее 25% сходства, с 24.7±2.4% уровнем сходства с наиболее близким организмом *Mm. fluvii* EbB<sup>T</sup>.

Геном содержал 3 копии рРНК и 47 копий гена тРНК, одну копию кластера мММО – *pmoCAB* и не кодировал генов рММО. Также в геноме присутствовали гены обеих изоформ метанолдегидрогеназ (МДГ) – MxaFI и XoxF. Способность к фиксации азота была подтверждена наличием кластера генов *nifDHK*, кодирующего Mo-Fe нитрогеназу. Отсутствие пигментации и неспособность синтезировать каротиноиды, что характерно для остальных описанных представителей рода *Methylomonas*, объяснялись отсутствием генов, кодирующих 4,4'-диапофитоендесатуразу (*crtN*) и 4,4-диаполикопиноксидазу (*crtP*).

Таким образом, в ходе сравнительного анализа вышеприведенных характеристик были показаны существенные отличия штамма MW1<sup>T</sup> от других описанных представителей рода *Methylomonas*. Филогенетически, изолят был наиболее близок к выделенным недавно из речных осадков *Mm. fluvii* EbB<sup>T</sup> и *Mm. albis* EbA<sup>T</sup> (Bussmann *et al.*, 2021), однако отличается от них подвижностью, повышенной термотолерантностью,

неспособностью синтезировать каротиноиды и расти при высоких концентрациях NaCl в среде.

Значительное различие нуклеотидной последовательности генома штамма MW1<sup>T</sup> и остальных представителей рода, а также ряд вышеперечисленных дифференцирующих характеристик позволили описать его как представителя нового вида рода *Methylomonas*, для которого было предложено видовое название *Methylomonas montana* (Сулейманов и др., 2023). Сравнение нового вида с ранее охарактеризованными видами рода *Methylomonas* представлено в Таблице 9.

**Диагноз нового вида – *Methylomonas montana* sp. nov.**

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

Одиночные, не образующие цепочек палочковидные подвижные клетки размером  $0.9\pm 0.04 \times 1.5\pm 0.2$  мкм. Расположение внутрицитоплазматических мембран в клетках характерно для метанотрофов I типа. 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 при 30-35°C и pH 6.3-7.0. Единственными 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, казामीновые кислоты, пептон и атмосферный азот. NaCl подавляет рост при концентрации в среде выше 1%. Типовым штаммом вида является штамм MW1<sup>T</sup> (=VKM В-3737<sup>T</sup> =UQM 41536<sup>T</sup>), выделенный из донных отложений реки Хоста, Краснодарский край, Россия.

## ГЛАВА 9. ПОИСК МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ, СПОСОБНЫХ К РОСТУ НА МОРСКОЙ ВОДЕ

Образцы донных осадков реки Чернавка в месте ее впадения в гиперсоленое озеро Эльтон (Таблица 3) были использованы для получения изолята метанотрофных бактерий, способных к росту на среде, сходной по составу с морской водой.

Аликвоты образцов донных отложений использовали в качестве инокулята для получения накопительных культур метанотрофных бактерий. Изолят, штамм Ch1-1<sup>T</sup>, был получен с помощью многочисленных серий предельных разведений культуры на жидкой среде MOR. Попытки высева культуры на агаризованный вариант этой среды не увенчались успехом.

Идентификация штамма Ch1-1<sup>T</sup> с помощью анализа последовательности гена 16S рРНК показала его принадлежность к роду *Methylo Marinum*. Изолят показал 97.09-97.24% сходства с таксономически описанными представителями *Mr. vadi*, штаммами IT-4<sup>T</sup> и T2-1, которые были ранее получены из морских местообитаний (Hirayama et al., 2013). Помимо таксономически описанных, новый изолят показал 99.45% сходства последовательности гена 16S рРНК с неохарактеризованным штаммом SSMP-1, полученным из наземного соленого грязевого источника (Fradet et al., 2016). Результаты этого анализа свидетельствовали о том, что штамм Ch1-1<sup>T</sup> принадлежит к новому, пока неопisanному, виду рода *Methylo Marinum*. Последовательность гена 16S рРНК штамма Ch1-1<sup>T</sup> была депонирована в ГенБанк под номером OR427371.

### 9.1 Физиологические и ростовые характеристики штамма Ch1-1<sup>T</sup>

Штамм Ch1-1<sup>T</sup> был представлен подвижными палочками размером  $0.85 \pm 0.05$  мкм в ширину и  $1.50 \pm 0.10$  мкм в длину (Рисунок 23А). В жидкой среде культура росла гомогенно, приобретая со временем лососево-розовую окраску (Рисунок 23Б), 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 23В), грамотрицательное строение клеточной стенки и стопки внутрицитоплазматических мембран I типа (Рисунок 23Г).

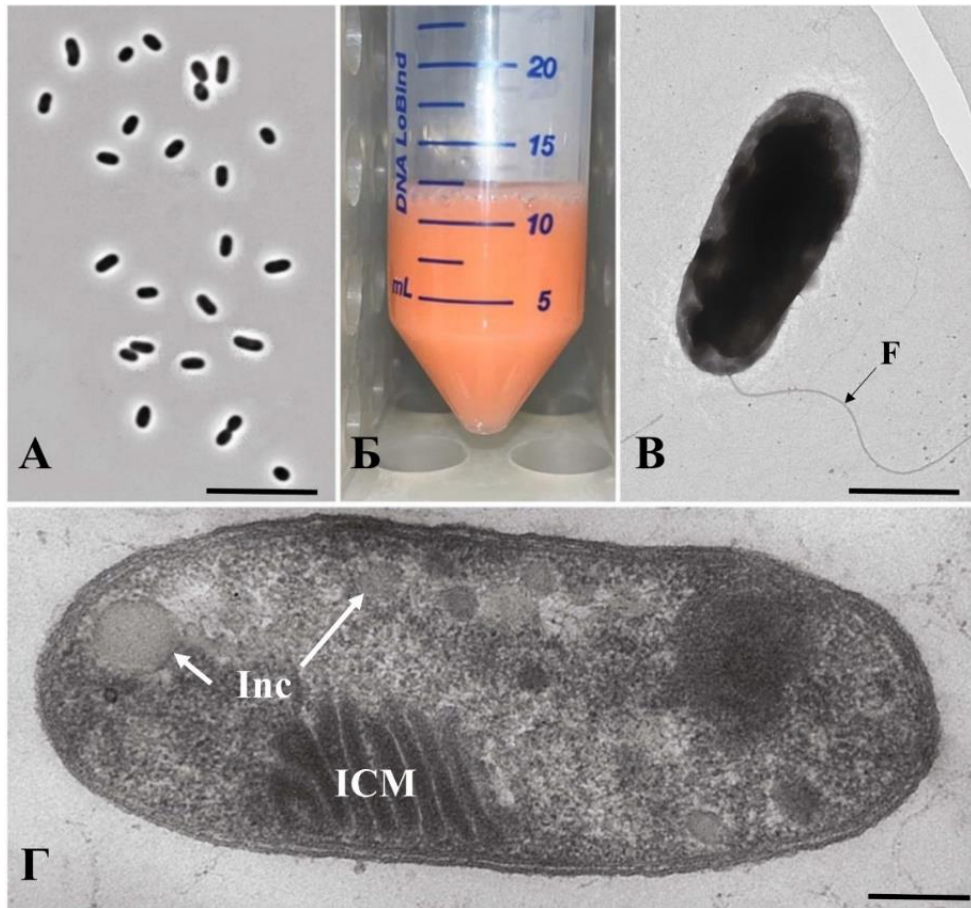


Рисунок 23 – Изолят рода *Methylo Marinum*, штамм Ch1-1<sup>T</sup>. (А) Фазово-контрастная микрофотография клеток штамма. Маркер, 10  $\mu\text{m}$ . (Б) Клеточная биомасса штамма, собранная центрифугированием. (В) Клетка штамма с одним полярным жгутиком, негативный контраст. Маркер, 1  $\mu\text{m}$ . (Г) Ультратонкий срез клетки. Маркер, 200 нм. Сокращения: F — жгутик; ICM — внутриклеточные мембраны; Inc – включения. Цитировано по Suleimanov *et al.*, 2024.

В качестве источников углерода штамм Ch1-1<sup>T</sup> использовал метан и метанол. Рост на метаноле наблюдался в широком диапазоне концентраций до 5% (об./об.), с оптимумом при концентрации метанола 0.25%. Однако после 2-3 генераций рост культуры на метаноле прекращался, поэтому длительное культивирование штамма Ch1-1<sup>T</sup> на метаноле было невозможным. На полиуглеродных соединениях, таких как этанол, глюкоза, ацетат, пируват, малат, сукцинат и цитрат, роста не происходило. В качестве источников азота штамм Ch1-1<sup>T</sup> использовал нитрат и соли аммония.

Штамм Ch1-1<sup>T</sup> 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 1.5-2%. Рост в отсутствие NaCl был невозможен. Максимальная удельная скорость роста культуры, достигаемая в оптимальных условиях, составила 0.29 ч<sup>-1</sup>.

## 9.2. Анализ генома штамма Ch1-1<sup>T</sup>

Полная нуклеотидная последовательность генома штамма Ch1-1<sup>T</sup> была получена с использованием секвенирования на платформе Oxford Nanopore. В общей сложности, было получено 123765 прочтений общей длиной 1.34 млрд. п.о. В результате сборки этих прочтений была получена последовательность генома размером 4.8 млн. п.о., содержащего 4305 белок-кодирующих последовательностей. Содержание пар Г+Ц в ДНК составило 50.81%. В геноме были выявлены семь локусов CRISPR.

Сравнительный геномный анализ подтвердил принадлежность нового изолята к роду *Methylomarinum*. Значение идентичности нуклеотидных последовательностей (ANI) геномов штамма Ch1-1<sup>T</sup> и описанного ранее *Mr. vadi* IT-4<sup>T</sup> составило 78.8%. Согласно принятым ныне стандартам в таксономии прокариот порог сходства геномов по ANI для разных видов бактерий установлен на уровне  $\approx 95-96\%$  (Chun *et al.*, 2018), что предполагает принадлежность изолята к новому виду рода *Methylomarinum*.

Филогенетическое положение штамма Ch1-1<sup>T</sup>, показанное на рисунке 24, было определено на основе сравнительного анализа 120 маркерных белков, кодируемых в геномах бактерий этой выборки. По результатам этого анализа штамм Ch1-1<sup>T</sup> образовал общий филогенетический кластер родового уровня с *Mr. vadi* IT-4<sup>T</sup> (Hirayama *et al.*, 2013), к которому также принадлежал метагеном метанооксиляющего эндосимбионта моллюска *Gigantopelta aegis* из гидротермального источника.

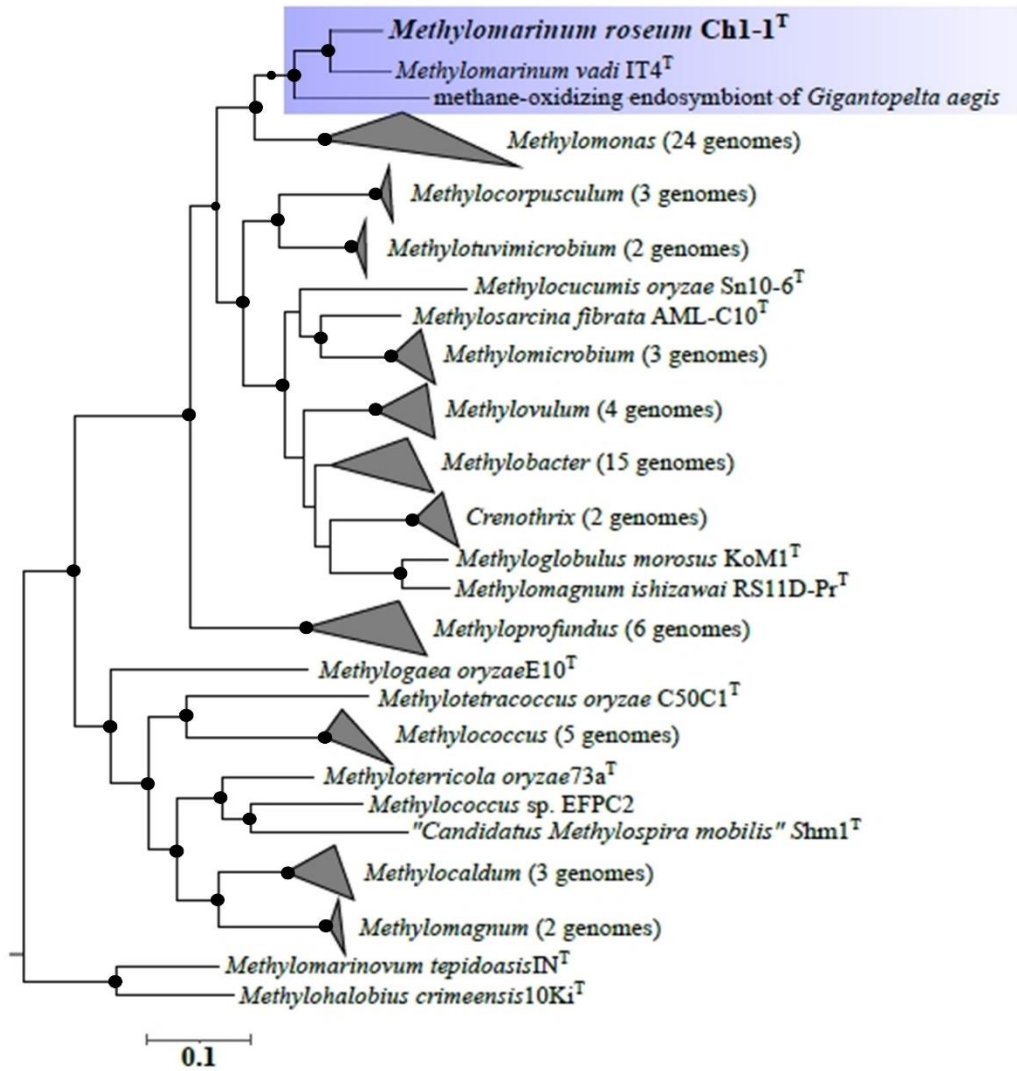


Рисунок 24 – Филогеномная дендрограмма, построенная по результатам сравнительного анализа 120 маркерных белков, кодируемых в геномах штамма Ch1-1<sup>T</sup> и других метанотрофных представителей *Gammaproteobacteria*. Корень составлен из 13 геномов представителей рода *Methylocystis*. Филогенетической кластер *Methylomarinum*-подобных метанотрофов выделен голубым цветом. Маркер – 0.1 замена на аминокислотную позицию. Цитировано по Suleimanov *et al.*, 2024.

Геном штамма Ch1-1<sup>T</sup> содержал три копии оперона рРНК и 46 генов тРНК, одну копию кластера генов мММО – *pmoCAB* и не кодировал генов рММО. Оперон *pxmABC*, часто присутствующий в геномах представителей класса *Gammaproteobacteria*, также отсутствовал. Функция ферментов, кодируемых этими генами, предположительно, заключается в окислении метана в условиях гипоксии (Tavormina *et al.*, 2011). В геноме присутствовал полный набор генов рибулозимонофосфатного пути, типичного для метанотрофов класса *Gammaproteobacteria* (Khmelenina *et al.*, 2018). Также геном содержал гены обеих изоформ метанолдегидрогеназ (МДГ) – MxaFI и XoxF. Были

идентифицированы гены путей превращений тетрагидрометанооптерина и тетрагидрофолата, а также окисления формиата.

В геноме обнаружены ключевые гены серинового пути ассимиляции формальдегида: *sga* и *gsk*, кодирующие серин-глиоксилатаминотрансферазу и глицерат-2-киназу, соответственно, а также ген, предположительно кодирующий гидроксипируватредуктазу (*hpr*). Примечательно, что в геноме обнаружен ген фосфоенолпируваткарбоксилазы (*ppc*, ФЕП-карбоксилаза), восполняющей С4-интермедиаты цикла Кребса. Этот фермент необходим для регенерации глиоксилата и полноценного функционирования серинового пути. В метанотрофках I типа ФЕП-карбоксилаза часто отсутствует, и сериновый цикл работает лишь частично.

В геноме обнаружен полный набор генов, вовлеченных в метаболизм D-фруктозо-6-фосфата (пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса и Энтнера-Дудорова). Все ферменты, необходимые для функционирования пентозофосфатного пути и цикла Кребса, также представлены в геноме. Штамм Ch1-1<sup>T</sup> обладал всеми генами, необходимыми для биосинтеза эктоина, гликогена и сахарозы.

Фиксировать азот штамм Ch1-1<sup>T</sup> неспособен из-за отсутствия как Mo-Fe, так и V-Fe нитрогеназ. Геном кодирует полный набор ферментов ассимиляционной нитратредукции, а также глутамин-синтетазу. Штамм Ch1-1<sup>T</sup> обладает потенциалом к диссимиляционной нитратредукции, о чем свидетельствует наличие генов *narGHI* и *nirBD*, и, следовательно, способен использовать нитрат в качестве альтернативного акцептора электронов (Stein, Klotz, 2011). Сравнение характеристик нового вида с таковыми у единственного типового штамма IT-4<sup>T</sup> рода *Methylomarinum* представлено в Таблице 10.



Таблица 10 – Характеристики, отличающие штамм Ch1-1<sup>T</sup> от *Mr. vadi* IT-4<sup>T</sup>

Характеристика	Штамм Ch1-1 <sup>T</sup>	<i>Mr. vadi</i> IT-4 <sup>T</sup>
Размер клеток, мкм	0.85×1.5	1×2
Пигментация колоний	Лососево-розовая	Кремовая
Подвижность	+	+
Температурный диапазон роста (опт.), °С	5-42 (30-35)	20-44 (37-43)
Диапазон pH (опт.)	6.3-7.5 (6.5-6.8)	4.5-7 (6.2-6.6)
Диапазон NaCl (опт.), %	0.5-10 (3.5-4)	1-8 (2-3)
Диапазон роста на CH <sub>3</sub> OH (опт.), %	5 (0.25)	н.о. (0.1)
мММО/рММО	+/-	+/-
Содержание Г+Ц в ДНК, %	50.8	51.5
Размер генома, млн. н.о.	4.7	4.3
Число белок-кодирующих генов	4309	3871
тРНК	46	48
5S, 16S, 23S	3;3;3	3;3;3

**Диагноз нового вида – *Methylomarinum roseum* sp. nov.**

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

Клетки представлены короткими подвижными палочками шириной  $0.85\pm 0.05$  и длиной  $1.50\pm 0.10$  мкм, встречающимися 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 pH 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<sup>T</sup> (=VKM B-3852<sup>T</sup> =UQM 41855<sup>T</sup>), выделен из донных отложений реки Чернавка в месте ее впадения в гиперсоленое озеро Эльтон, Россия.

### 9.3. Культивирование штамма Ch1-1<sup>T</sup> в биореакторе

Оценку ростовых и продукционных характеристик *Methylomarinum roseum* Ch1-1<sup>T</sup> проводили в условиях непрерывного культивирования в биореакторе объемом 1.5 л.

В результате культивирования штамма Ch1-1<sup>T</sup> в биореакторе были получены следующие ростовые характеристики. В фазе накопительного режима культура показала удельную скорость роста 0.155 ч<sup>-1</sup>, в проточном режиме культура поддерживала устойчивый рост со средней скоростью разбавления 0.135 ч<sup>-1</sup>. АСВ биомассы составил 3.5 г л<sup>-1</sup> при OD<sub>600</sub>=13.

Анализ биомассы клеток штамма Ch1-1<sup>T</sup> в чистой культуре показал 61% белка, тогда как в составе ассоциации с гетеротрофными бактериями содержание белка было выше – 66-68%. Низкое содержание белка в биомассе чистой культуры может быть связано с тем, что условия культивирования этого метанотрофа в биореакторе, в том числе состав и рН среды, были не до конца оптимизированы. Возможно, более продолжительное культивирование могло бы повысить ростовые и продукционные характеристики микроорганизма в ходе адаптации и накопления полезных мутаций в геноме этого штамма.

Все описанные на сегодняшний день метанотрофные бактерии из морских экосистем имеют низкие ростовые характеристики, включая ближайший к штамму Ch1-1<sup>T</sup> – *Mr. vadi*, штамм IT-4<sup>T</sup>, а потому непригодны для биотехнологических производств. Изолят Ch1-1<sup>T</sup>, 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 11.

Таблица 11 – Полученные в работе штаммы метанотрофов, обладающие наибольшим биотехнологическим потенциалом

Род	<i>Methylococcus</i>		<i>Methylomonas</i>	<i>Methylomarinum</i>
Штамм	MIR	KN2	MP1 <sup>T</sup>	Ch1-1 <sup>T</sup>
μ в ферментере, ч <sup>-1</sup>	0.25-0.30	0.25-0.30	0.22	0.14
Температурный оптимум, °C	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 *Mс. capulatus*, из штаммов, указанных в Таблице 11, для работ по метаболической инженерии был выбран штамм MIR.

## ГЛАВА 10. РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА *METHYLOCOCCUS CAPSULATUS* MIR

### 10.1. Проверка антибиотикорезистентности штамма MIR

Для исключения ложноположительных результатов ночная жидкая культура штамма MIR была высеяна на агаризованную среду «П», содержащую один из трех антибиотиков в различных концентрациях – гентамицин, спектиномицин, канамицин. Положительный контроль представлял собой три чашки Петри со средой «П» без антибиотиков. Проведенный анализ показал высокую чувствительность культуры ко всем антибиотикам, выбранным в качестве селективных маркеров.

### 10.2. Дизайн вектора для делеции генов гликогенсинтаз путем двойной гомологичной рекомбинации

Для получения модифицированного штамма *Ms. capsulatus* MIR путем двойной гомологичной рекомбинации с делецией генов гликогенсинтаз *glgA1* и *glgA2* использовали суицидальный вектор pK18mob. В работе были получены две плазмиды, несущие фланкирующие последовательности каждого из целевых генов (каждая ~700 п.н.). Далее в каждую из них был внесен маркер – ген устойчивости к гентамицину или спектиномицину. Маркер вносился между фланкирующими фрагментами по сайту рестрикции *Bam*HI. В результате проведенных манипуляций были получены две плазмиды – pK18mob-*glgA1*-Gm и pK18mob-*glgA2*-Sp (Рисунок 25). Для промежуточного клонирования вектора использовали штамм *E. coli* Top10.



Рисунок 25 – Схема полученного вектора для двойной гомологичной рекомбинации гена *glgA1/glgA2*. «up» и «dw» – фланкирующие последовательности соответствующего им гена.

### 10.3. Делеция генов синтеза гликогена

Внесение готового вектора осуществляли конъюгативным переносом от донорного штамма *Escherichia coli* S17-1 к реципиенту *Ms. capsulatus* MIR.

В результате конъюгации плазмиды от донора к реципиенту и последующей двойной гомологичной рекомбинации каждый из генов синтеза гликогена (*glgA1* или *glgA2*) был заменен на ген устойчивости к соответствующему кассете устойчивости антибиотику. Дальнейший высеv культур на среды с селективным антибиотиком показал их устойчивость, что может указывать на успешную делецию рекомбинацией. Это также было подтверждено при помощи ПЦР-метода.

В итоге были получены два штамма *Ms. capsulatus* MIR, с делецией генов *glgA1* ( $Gm^R$ ) и *glgA2* ( $Sp^R$ ). Далее проводили повторную процедуру для получения одновременно двух делеций –  $\Delta glgA1\Delta glgA2$ . Для достижения данной цели проводили перекрестную конъюгацию: плазмиду pK18mob-*glgA1*- $Gm$  трансформировали в штамм с делецией гена *glgA2*, а плазмиду pK18mob-*glgA2*- $Sp$  – в штамм с делецией гена *glgA1*. Этот способ получения штамма с одновременной делецией *glgA1* и *glgA2*, однако, оказался нерезультативен. Только предложенный и реализованный старшим научным сотрудником ФИЦ ПНЦБИ РАН лаборатории радиоактивных изотопов С.Ю. Бутом метод с использованием вектора pCAN01 ( $Km^R$ ) с геном *glgA2* из геномной ДНК *Methylovium alcaliphilum* 20Z с индуцибельным ангидротетрациклином промотором ( $P_{tetA}$ ) дал положительный результат.

Экспрессируемый ген *glgA2* вектора pCAN01 в клетках на среде «П» с ангидротетрациклином позволил провести двойную гомологичную рекомбинацию у штамма *Ms. capsulatus* MIR  $\Delta glgA1$  с использованием плазмиды pK18mob-*glgA2*- $Sp$ .

В результате был получен штамм *Ms. capsulatus* MIR  $\Delta glgA1\Delta glgA2$ . Многократные пересевы и серийные разведения на среде без антибиотика канамицина и активатора промотора ангидротетрациклина позволили очистить культуру от вектора pCAN01-*glgA2*. Проверка методом ПЦР клеток из отдельных колоний подтвердила отсутствие плазмиды и гена *glgA2* *Mt. alcaliphilum* 20Z, также, как и нативных генов гликогенсинтаз культуры.

Полученные штаммы с одной (штаммы  $\Delta glgA1$  и  $\Delta glgA2$ ) и двумя делециями генов гликогенсинтаз (штамм  $\Delta glgA1\Delta glgA2$ ) вместе со штаммом дикого типа были использованы в дальнейшем анализе влияния этих мутаций на синтез гликогена,

удельную скорость роста штамма, а также на содержание белка в биомассе, полученной при культивировании в биореакторе.

#### 10.4. Анализ влияния делеций на ростовые характеристики штамма MIR

Полученные в ходе генетической модификации по генам гликогенсинтаз штаммы *Ms. capsulatus* MIR –  $\Delta glgA1$ ,  $\Delta glgA2$  и  $\Delta glgA1\Delta glgA2$  – были проанализированы по таким характеристикам, как скорость роста и накопление гликогена в клетках.

Наиболее высокие удельные скорости роста в периодических культурах на жидкой минеральной среде «П»–  $0.13 \text{ ч}^{-1}$  и  $0.135 \text{ ч}^{-1}$  – были зарегистрированы для штамма дикого типа и штамма  $\Delta glgA1\Delta glgA2$  (Рисунок 26А).

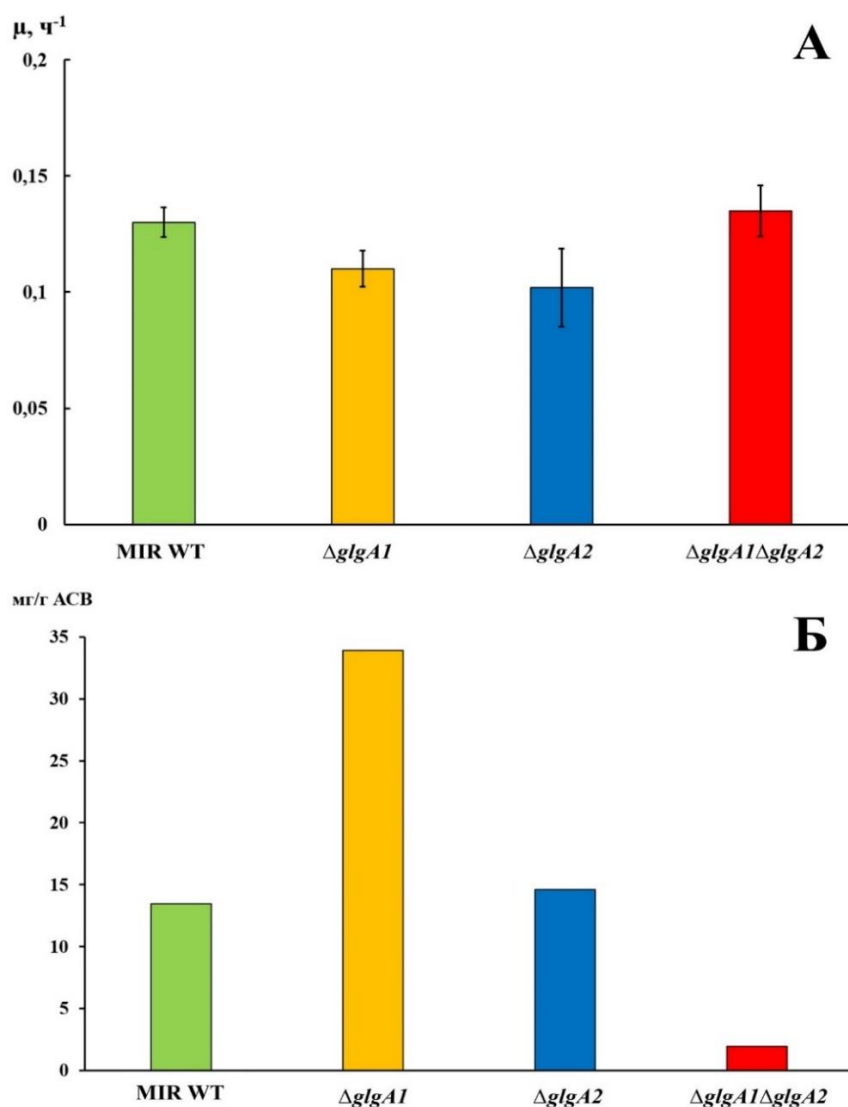


Рисунок 26 – Удельные скорости роста (А) и содержание гликогена (Б) в биомассе штамма *Ms. capsulatus* MIR дикого типа (WT) и штаммов с делецией генов гликогенсинтаз на жидкой минеральной среде «П» с метаном в газовой фазе

Для анализа содержания гликогена в биомассе культуры были выращены в тех же условиях до стационарной фазы роста. Анализ содержания углеводов в лиофильно высушенной биомассе с применением антронового реактива показал, что синтез запасных веществ в штаммах с делецией по одному гену *glgA* или не снижается, как это имело место в случае штамма  $\Delta glgA2$ , или даже увеличивается, как это было отмечено для штамма  $\Delta glgA1$  (Рисунок 26Б). Однако в биомассе штамма  $\Delta glgA1\Delta glgA2$ , как и ожидалось, содержание углеводов было минимальным. Предположительно, выявленные высокочувствительным антроновым реактивом в биомассе штамма MIR  $\Delta glgA1\Delta glgA2$  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.

## ГЛАВА 11. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ШТАММА *MIR ΔglgA1ΔglgA2* В БИОРЕАКТОРЕ

Штамм дикого типа *Ms. capsulatus* MIR и штамм с двойной делецией генов гликогенсинтаз ( $\Delta glgA1\Delta glgA2$ ) были использованы для сравнительного анализа удельных скоростей роста в условиях культивирования в биореакторе, а также анализа их продукционных характеристик. Как для штамма *Ms. capsulatus* MIR дикого типа, так и для штамма  $\Delta glgA1\Delta glgA2$  были зарегистрированы высокие удельные скорости роста в накопительном режиме, около  $0.3 \text{ ч}^{-1}$ , а также устойчивый продолжительный рост в условиях непрерывного культивирования со скоростью разбавления до  $250 \text{ мл ч}^{-1}$ . 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 27).

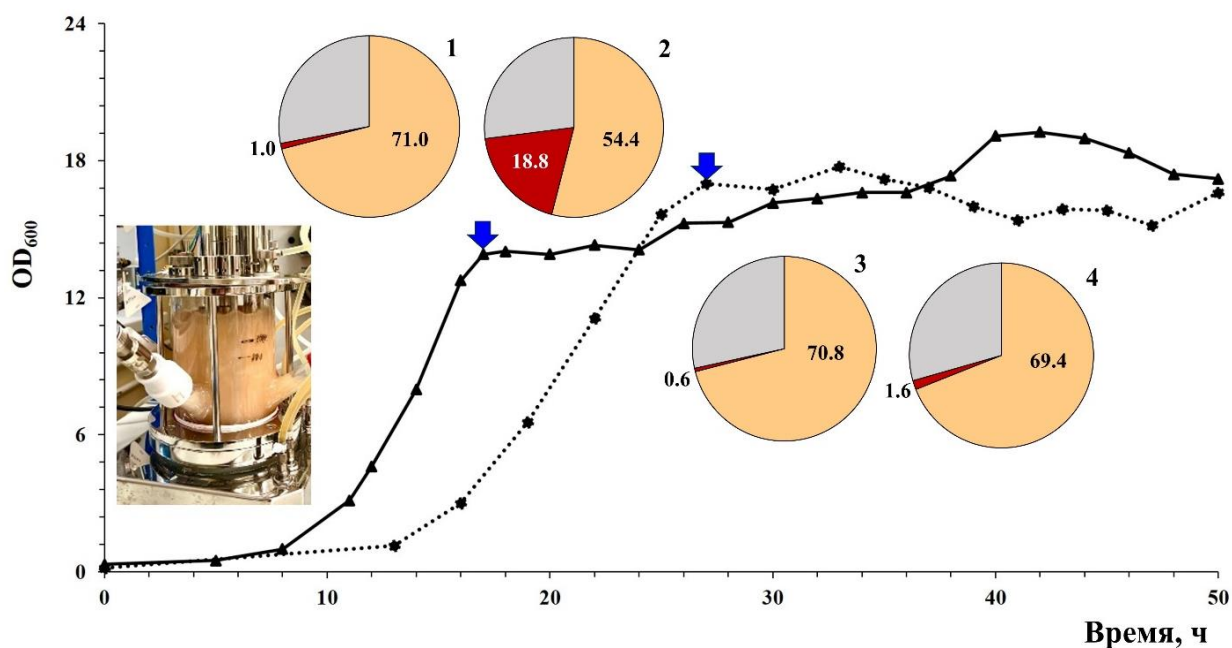


Рисунок 27 – Динамика роста *Ms. capsulatus* MIR дикого типа (пунктирная линия) и модифицированного штамма  $\Delta glgA1\Delta glgA2$  (сплошная линия) в биореакторе. Переключение режима работы реактора с накопительного на проточный указано стрелками. Мониторинг роста осуществляли путем регистрации  $OD_{600}$  культур каждые 2 часа. 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 But, Suleimanov *et al.*, 2024.



Анализ биомассы штамма дикого типа и с делециями *glgA1glgA2* показал, что абсолютно сухой вес (АСВ) биомассы модифицированного штамма при тех же параметрах роста был выше ( $4.72 \text{ г л}^{-1}$ ), чем у штамма дикого типа ( $4.12 \text{ г л}^{-1}$ ). Кроме того, для модифицированного штамма более высокими оказались значения содержания белка в биомассе. Так, в накопительном режиме роста биомасса штамма дикого типа содержала лишь 54.4% белка, а штамма  $\Delta glgA1\Delta glgA2$  – 71.0% (диаграммы 1 и 2 на рисунке 27). Это может быть связано с высокой долей накопления запасного питательного вещества диким типом – 18.8%, тогда как штамм с делециями *glgA1glgA2* не был способен его синтезировать, что, предположительно, позволило перенаправить поток углерода на биосинтез белка. В пользу этого предположения свидетельствовало более высокое потребление азота из среды культивирования штаммом  $\Delta glgA1\Delta glgA2$  –  $61.5 \text{ мг N г}^{-1}$  сухой биомассы против  $52.0 \text{ мг N г}^{-1}$  у дикого типа.

В условиях непрерывного культивирования содержание белка в биомассе сравниваемых штаммов было близким – 69.4% и 70.8% – для штаммов WT и  $\Delta glgA1\Delta glgA2$ , соответственно (диаграммы 3 и 4 на рисунке 27). 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 на содержание гликогена в динамике перехода культивирования из накопительного режима в проточный (Рисунок 28).

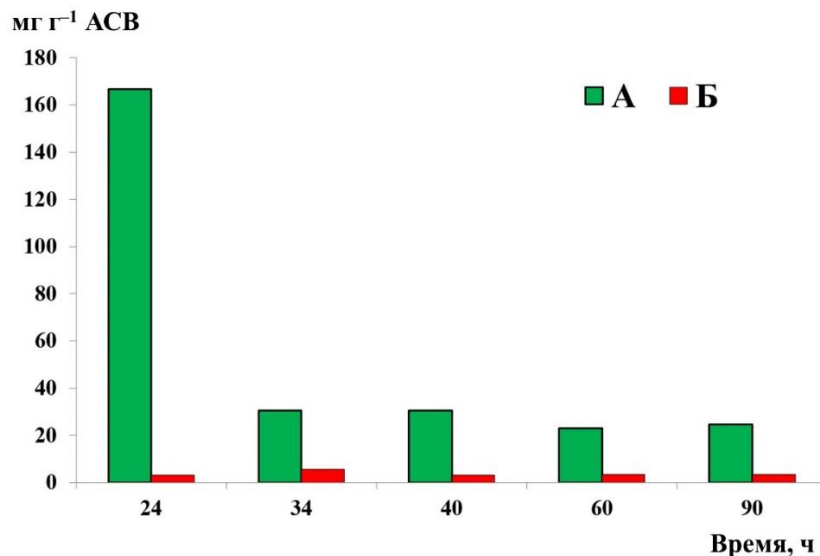


Рисунок 28 – Содержание гликогена ( $\text{мг г}^{-1}$ ) в сухой биомассе *Mc. capsulatus* MIR дикого типа (А) и с делециями генов *glgA1 glgA2* (Б).

Детекция незначительного количества «гликогена» в клетках с двойной делецией генов гликогенсинтаз, по всей видимости, объясняется не наличием самого полимера, а присутствием различных углеводов центрального метаболизма, как в целевой культуре, так и в клетках-спутниках, к которым чувствителен примененный метод анализа с использованием антронового реактива.

Таким образом, для штамма дикого типа MIR и модифицированного штамма  $\Delta glgA1\Delta glgA2$  были получены ростовые характеристики в условиях накопительного и непрерывного режимов культивирования в биореакторе, а также данные по содержанию общего белка в сухой биомассе. Была показана способность к стабильному росту в условиях непрерывного культивирования в ферментере со скоростью протока  $0.25 \text{ ч}^{-1}$ , что сопоставимо с таковыми у производственных штаммов. Кроме того, оба типа продемонстрировали скорость роста  $0.3 \text{ ч}^{-1}$  в накопительном режиме, однако для штамма  $\Delta glgA1\Delta glgA2$  было показано существенное сокращение лаг-фазы роста и ускорение выхода в логарифмическую фазу роста

## 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 – Ю01, KN2 MIR, ВН и Мс7. Первые 4 изолята были идентифицированы как представители вида *Ms. capulatus*, которые традиционно используют в биотехнологии получения кормового белка из метана или природного газа. Пятый штамм, Мс7, 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<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup> в накопительном и 0.25 ч<sup>-1</sup> 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<sup>T</sup>, MY1, MV1, MO1 и MW1<sup>T</sup>. 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<sup>T</sup> демонстрировали наиболее высокие скорости роста – 0.29-0.33 ч<sup>-1</sup> – при температурах 30-35°C, что сопоставимо с таковыми у производственных штаммов. Все изоляты, кроме штамма MW1<sup>T</sup>, 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<sup>T</sup>. 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<sup>T</sup> 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<sup>-1</sup>, показал способность культуры расти со скоростью 0.16 ч<sup>-1</sup> в накопительном режиме, а также способность поддерживать устойчивый рост со средней скоростью разбавления 0.14 ч<sup>-1</sup>. Анализ продуцируемой биомассы при нестерильном проточном культивировании показал содержание белка до 67.6%. Полученные данные по ростовым и продукционным характеристикам для штамма Ch1-1<sup>T</sup> 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 Ю01, ВН, КН2, Мс7 и МІR. Наиболее высокие скорости роста в биореакторе, до 0.3 ч<sup>-1</sup>, и высокое содержание белка в биомассе, до 73-74%, зарегистрированы для штаммов МІR и КН2.
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 МР1<sup>T</sup>.
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<sup>-1</sup>. “*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<sup>T</sup>, растущий при содержании NaCl в среде до 10%. Экспериментально подтвержден устойчивый рост штамма Ch1-1<sup>T</sup> в биореакторе на природном газе и среде с общим содержанием солей 36 г л<sup>-1</sup> и содержанием белка в продуцируемой биомассе до 68%.
5. Исследования модифицированного штамма *Methylococcus capsulatus* МІR 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бут С.Ю., Дедыш С.Н., Попов В.О., Пименов Н.В., Хмеленина В.Н. Конструирование метанотрофа I типа с пониженной способностью аккумулировать гликоген и сахарозу // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56(5). – С. 465-471.
2. Волова Т.Г. Биотехнология // Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения РАН. – 1999. – 252 стр.
3. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии // Москва: ГЕОС. – 2001. – 500 стр.
4. Гальченко В.Ф., Шишкина В.Н., Тюрин В.С., Троценко Ю.А., Выделение чистых культур метанотрофов и их свойства // Микробиология. – 1975. – Т. 44(5). – С. 844-850
5. Григорян А.Н., Горская Л.А. Использование природного газа для микробиологического синтеза // Москва. ОНТИ Микробиопром. –1970. – 90 стр.
6. Дедыш С.Н. Выявление представителей *Planctomycetes* в сфагновых болотах с использованием молекулярных и культуральных подходов // Микробиология. – 2006. – Т. 75(3). – С. 389-396.
7. Малашенко Ю.Р., Романовская В.А., Богаченко В.Н., Швед А.Д. Термофильные и термотолерантные бактерии, ассимилирующие метан // Микробиология. – 1975. – Т. 44(5). – С. 855.
8. Плясов Ю.М. Комплексная оценка питательной ценности кормового микробного белка // Биотехнология. – 1988. – Т. 4(3). – С. 402-408.
9. 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.
10. Троценко Ю.А, Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии // ОНТИ ПНЦ РАН. – 2010. – 325 стр.
11. Троценко Ю.А., Торгонская М.Л. Аэробные метилотрофы-перспективные объекты современной биотехнологии // Журнал Сибирского Федерального Университета. Биология. – 2012. – Т. 5(3). – С. 243-279.
12. Троценко Ю.А., Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы // Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН. – 2008. – 206 стр.

13. Хмеленина В.Н., Бут С.Ю., Розова О.Н., Ошкин И.Ю., Пименов Н.В., Дедыш С.Н. Редактирование геномов метанотрофных бактерий: возможные мишени и доступный инструментарий // Микробиология. – 2022. – Т. 91(6). – С. 647-655.
14. Четина Е.В., Троценко Ю.А. Оценка перевариваемости биомассы метанотрофных бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. – 1984. – Т. 20(5). – С. 648-652.
15. Akberdin I.R., Thompson M., Hamilton R., Desai N., Alexander D., Henard C.A., Guarnieri M.T., Kalyuzhnaya M.G. Methane utilization in *Methylococcum alcaliphilum* 20Z<sup>R</sup>: a systems approach // Scientific Reports. – 2018. – V. 8(1). – art. 2512.
16. Ali H., Murrell J.C. Development and validation of promoter-probe vectors for the study of methane monooxygenase gene expression in *Methylococcus capsulatus* Bath // Microbiology (SGM). – 2009. – V. 155(3). – P. 761-771.
17. Anthony C. The biochemistry of methylotrophs // Academic Press, New York. – 1982. – P. 447.
18. Anthony C., Williams P. The structure and mechanism of methanol dehydrogenase // Biochimica et Biophysica Acta. – 2003. – V. 1647. – P. 18-23.
19. Awala S.I. Gwak J.H., Kim Y., Seo C., Strazzulli A., Kim S.G., Rhee S.K. *Methylacidiphilum caldifontis* gen. nov., sp. nov., a thermoacidophilic methane-oxidizing bacterium from an acidic geothermal environment, and descriptions of the family *Methylacidiphilaceae* fam. nov. and order *Methylacidiphilales* ord. nov // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2023. – V. 73(10). – art. 006085.
20. Awala S.I., Bellosillo L.A., Gwak J.H., Nguyen N.L., Kim S.J., Lee B.H., Rhee S.K. *Methylococcus geothermalis* sp. nov., a methanotroph isolated from a geothermal field in the Republic of Korea // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2020. – V. 70(10). – P. 5520-5530.
21. Balasubramanian R., Rosenzweig A.C. Copper methanobactin: a molecule whose time has come // Current Opinion in Chemical Biology. – 2008. – V. 12(2). – P. 245-249.
22. Bernhoft A., Berdal K.G., Espe M., Mjaaland S., Storrø I., Sørum H., Valheim M., Volden H., Aursand M., Bertnssen M., Hemre G.-I., Jenssen B.M., Thommassen M., Haldorsen A.K.L. Opinion on the Safety of BioProtein<sup>®</sup> by the Scientific Panel on Animal Feed of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. – European Journal of Nutrition & Food Safety. – 2022. – V. 14(4). – P. 3-5.

23. Beschastny A.P., Sokolov A.P., Khmelenina V.N., Trotsenko Y.A. Purification and properties of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of obligate methanotroph *Methylomonas methanica* // Biochemistry. – 1992. – V. 57. – P. 1215-1221.
24. Bodrossy L., Holmes E.M., Holmes A.J., Kovács K.L., Murrell J.C. Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov // Archives of Microbiology. – 1997. – V. 168. – P. 493-503.
25. Bothe H., Moller Jensen K., Mergel A., Larsen J., Jorgensen C., Bothe H., Jorgensen L. Heterotrophic bacteria growing in association with *Methylococcus capsulatus* (Bath) in a single cell protein production process // Applied Microbiology and Biotechnology. –2002. - V.59. – P.33-39.
26. Bothe H., Møller Jensen, K., Mergel A., Larsen J., Jørgensen C., Bothe H., Jørgensen L. Heterotrophic bacteria growing in association with *Methylococcus capsulatus* (Bath) in a single cell protein production process // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2002. – V. 59. – P. 33-39.
27. Bowman J.P., Sly L.I., Cox J.M., Hayward A.C. *Methylomonas fodinarum* sp. nov. and *Methylomonas aurantiaca* sp. nov.: two closely related type I obligate methanotrophs // Systematic and Applied Microbiology. – 1990. – V. 13(3). – P. 279-287.
28. Bowman J.P., Sly L.I., Nichols P.D., Hayward A.C. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1993. – V. 43. – P. 735-753.
29. Brazeau B.J., Lipscomb J.D. Kinetics and activation thermodynamics of methane monooxygenase compound Q formation and reaction with substrates // Biochemistry. – 2000. – V. 39(44). – P. 13503-13515.
30. Bussmann I., Horn F., Hoppert M., Klings K. W., Saborowski A., Warnstedt J., Liebner S. *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. – V. 44(6). – art. 126248.



31. But S.Y., Khmelenina V.N., Reshetnikov A.S., Mustakhimov I.I., Kalyuzhnaya M.G., Trotsenko Y.A. Sucrose metabolism in halotolerant methanotroph *Methylophilum alcaliphilum* 20Z // Archives of Microbiology. – 2015. – V. 197. – P. 471-480.
32. 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.
33. Chang S.L., Wallar B.J., Lipscomb J.D., Mayo K.H. Solution structure of component B from methane monooxygenase derived through heteronuclear NMR and molecular modelling // Biochemistry. – 1999. – V. 38. – P. 5799-5812.
34. Chatwood L.L. Müller J., Gross J.D., Wagner G., Lippard S.J. NMR structure of the flavin domain from soluble methane monooxygenase reductase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) // Biochemistry. – 2004. – V. 43(38). – P. 11983-11991.
35. Chen Y., Dumont M.G., Cébron A., Murrell J.C. Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes // Environmental Microbiology. – 2007. – V. 9(11). – P. 2855-2869.
36. Chistoserdova L. Modularity of methylotrophy, revisited // Environmental Microbiology. – 2011. – V. 13(10). – P. 2603-2622.
37. Chistoserdova L., Crowther G.J., Vorholt J.A., Skovran E., Portais, J.C., Lidstrom M.E. Identification of a fourth formate dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 and confirmation of the essential role of formate oxidation in methylotrophy // Journal of Bacteriology. – 2007. – V. 189. – P. 9076-9081.
38. Chistoserdova L., Lidstrom M. E. A metagenomic insight into freshwater methane-utilizing communities and evidence for cooperation between the *Methylococcaceae* and the *Methylophilaceae* // PeerJ. – 2013. – V. 1. – art. 23.
39. Chistoserdova L., Lidstrom M.E. Molecular and mutational analysis of a DNA region separating two methylotrophy gene clusters in *Methylobacterium extorquens* AM1 // Microbiology (SGM). – 1997. – V. 143(5). – P. 1729-1736.
40. Choi M., Yun T., Song M.J., Kim J., Lee B.H., Löffler F.E., Yoon S. Cometabolic vinyl chloride degradation at acidic pH catalyzed by acidophilic methanotrophs isolated from alpine peat bogs // Environmental Science & Technology. – 2021. – V. 55(9). – P. 5959-5969.

41. Chu F., Beck D.C., Lidstrom M.E. *MxaY* regulates the lanthanide-mediated methanol dehydrogenase switch in *Methylobacterium buryatense* // PeerJ. – 2016. V. 4. – art. e2435.
42. Chu F., Lidstrom M.E. *XoxF* acts as the predominant methanol dehydrogenase in the type I methanotroph *Methylobacterium buryatense* // Journal of Bacteriology. – 2016. – V. 198. – P. 1317-1325.
43. Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2018. – V. 13(1). – P. 461-466.
44. Claassens N.J., Satanowski A., Bysani V.R., Dronsella B., Orsi E., Rainaldi V., Yilmaz S., Wenk S., Lindner S.N. Engineering the reductive glycine pathway: a promising synthetic metabolism approach for C1-assimilation // One-Carbon Feedstocks for Sustainable Bioproduction. – Cham: Springer International Publishing. – 2022. – P. 299-350.
45. Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved // Environmental Microbiology Reports – 2009. – V. 1(5). – P. 285-292.
46. Costello A.M., Lidstrom M.E. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – V. 65. – P. 5066-5074.
47. Coty V.F. A critical review of the utilization of methane // Biotechnology and Bioengineering Symposium. – 1969. – P. 105-117.
48. Crombie A.T., Murrell J.C. Trace-gas metabolic versatility of the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* // Nature. – 2014. – V. 510(7503). – P. 148-151.
49. Crumbley A.M., Gonzalez R. Cracking “Economies of Scale”: Biomanufacturing on Methane-Rich Feedstock // Methane biocatalysis: Paving the way to sustainability. – 2018. – P. 271-292.
50. Culpepper M.A., Rosenzweig A.C. Architecture and active site of particulate methane monooxygenase // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. – 2012. – V. 47(6). – P. 483-492.
51. Cumberlege T., Blenkinsopp T., Clark J. Assessment of environmental impact of FeedKind protein // Carbon Trust. – 2016. – P. 26.

52. Dalton H. The Leeuwenhoek Lecture 2000 the natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2005. – V. 360(1458). – P. 1207-1222.
53. Danilova O.V., Kulichevskaya I.S., Rozova O.N., Detkova E.N., Bodelier P.L., Trotsenko Y.A., Dedysh S.N. *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. – V. 63 (6). – P. 2282-2289.
54. Dedysh S. and Knief C. Diversity and phylogeny of described aerobic methanotrophs. In *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability*. – 2018. – P. 17-42.
55. Dedysh S.N., Belova S.E., Bodelier P.L., Smirnova K.V., Khmelenina V.N., Chidthaisong A., Trotsenko Y.A., Liesack W., Dunfield P.F. *Methylocystis heyeri* sp. nov., a novel type II methanotrophic bacterium possessing 'signature' fatty acids of type I methanotrophs // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2007. – V. 57(3). – P. 472-479.
56. Dedysh S.N., Berestovskaya Y.Y., Vasylieva L.V., Belova S.E., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Liesack W., Zavarzin G.A. *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic peatlands of tundra // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2004. – V. 54. – P. 151-156.
57. Dedysh S.N., Liesack W., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Semrau J.D., Bares A.M., Panikov N.S., Tiedje J.M. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2000. – V. 50. – P. 955-969.
58. Elango N.A., Radhakrishnan R., Froland W.A., Wallar B.J., Earhart C.A., Lipscomb J.D., Ohlendorf D.H. Crystal structure of the hydroxylase component of methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Protein Science*. – 1997. – V. 6(3). – P. 556-568.
59. Erb T.J., Zarzycki J. A short history of RubisCO: the rise and fall (?) of Nature's predominant CO<sub>2</sub> fixing enzyme // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2018. – V. 49. – P. 100-107.
60. Erb T.J., Berg I.A., Brecht V., Muller M., Fuchs G, and Alber B.E. Synthesis of C<sub>5</sub>-dicarboxylic acids from C<sub>2</sub>-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalyl-CoA pathway // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. – 2007. – V. 104. – P. 10631-10636.

61. Ettwig K.F., Butler M.K., LePaslier D. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria // *Nature*. – 2010. – V. 464. – P. 543-548.
62. Fei Q., Guarnieri M.T., Tao L., Laurens L.M., Dowe N., Pienkos P.T. Bioconversion of natural gas to liquid fuel: opportunities and challenges // *Biotechnology Advances*. – 2014. – V. 32(3). – P. 596-614.
63. Foster J.W., Davis R.H. A methane-dependent coccus, with notes on classification and nomenclature of obligate, methane-utilizing bacteria // *Journal of Bacteriology*. – 1966. – T. 91(5). – P. 1924-1931.
64. Fox B.G., Froland J.E., Dege J., Lipscomb J.D. Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: Purification and properties of a three-component system with high specific activity from a type II methanotroph // *Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – V. 264. – P. 10023-10033.
65. Fradet D.T., Tavormina P.L., Orphan V.J. Members of the methanotrophic genus *Methylomarinum* inhabit inland mud pots // *PeerJ*. – 2016. – V. 4. – art. e2116.
66. García Martínez J.B., Pearce J.M., Throup J., Cates J., Lackner M., Denkenberger D.C. Methane single cell protein: Potential to secure a global protein supply against catastrophic food shocks // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – V. 10. – art. 906704.
67. Gayazov R.R., Shishkina V.N., Mshensky Y.N., Trotsenko Y.A. Effect of temperature on growth and metabolism of *Methylomonas methanica* // *Doklady Academy of Sciences*. – 1985. – V. 284. – P. 746-748.
68. Gilman A., Fu Y., Hendershott M. Oxygen-limited metabolism in the methanotroph *Methylomicrobium buryatense* 5GB1C // *PeerJ*. – 2017. – V. 5. – art. e3945.
69. Gilman A., Laurens L.M., Puri A.W. Bioreactor performance parameters for an industrially-promising methanotroph *Methylomicrobium buryatense* 5GB1 // *Microbial Cell Factories*. – 2015. – V. 14. – P. 182.
70. Girard M., Viens P., Ramirez A.A., Brzezinski R., Buelna G., Heitz M. Simultaneous treatment of methane and swine slurry by biofiltration // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2012. – V. 87(5). – P. 697-704.
71. Goris J., Konstantinidis K.T., Klappenbach J.A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J.M. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence

- similarities // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2007. – V. 57(1). – P. 81-91.
72. Graef C., Hestnes A.G., Svenning M.M., Frenzel P. The active methanotrophic community in a wetland from the High Arctic // Environmental Microbiology Reports. – 2011. – V. 3(4). – P. 466-472.
73. Hanson R.S and Hanson T.E. Methanotrophic bacteria // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 1996. – V.60. – P. 439-471.
74. Haque M.F.U., Xu H.J., Murrell J.C., Crombie A. Facultative methanotrophs—diversity, genetics, molecular ecology and biotechnological potential: A mini-review // Microbiology (SGM). – 2020. – V. 166(10). – art. 894.
75. Harwood J.H., Williams E., Bainbridge B.W. Mutation of the methane oxidizing bacterium, *Methylococcus capsulatus* // Journal of Applied Bacteriology. – 1972. – V. 35(1). – P. 99-108.
76. Henard C.A., Akberdin I.R., Kalyuzhnaya M.G., Guarnieri M.T. Muconic acid production from methane using rationally engineered methanotrophic biocatalysts // Green Chemistry. – 2019. – V. 21. – P. 6731-6737.
77. Henard C.A., Franklin T.G., Youhenna B., But S.Y., Alexander D., Kalyuzhnaya M.G., Guarnieri M.T. Biogas biocatalysis: methanotrophic bacterial cultivation, metabolite profiling, and bioconversion to lactic acid // Frontiers in Microbiology. – 2018. – V. 9. – art. 2610.
78. Henard C.A., Wu C., Xiong W., Henard J.M., Davidheiser-Kroll B., Orata F.D., Guarnieri M.T. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) is essential for growth of the methanotroph *Methylococcus capsulatus* strain Bath // Applied and Environmental Microbiology. – 2021. – V. 87. – art. e00881-21.
79. Henard C.A., Smith H., Dowe N. Bioconversion of methane to lactate by an obligate methanotrophic bacterium // Scientific Reports. – 2016. – V. 6. – art. 21585.
80. Hirayama H., Fuse H., Abe M., Miyazaki M., Nakamura T., Nunoura T., Furushima Y., Yamamoto H., Takai K. *Methylomarinum vadi* gen. nov., sp. nov., a methanotroph isolated from two distinct marine environments // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2013. – V. 63(3). – P. 1073-1082.
81. Hirayama H., Suzuki Y., Abe M., Miyazaki M., Makita H., Inagaki F., Uematsu K., Takai K. *Methylothermus subterraneus* sp. nov., a moderately thermophilic methanotroph isolated

- from a terrestrial subsurface hot aquifer // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2011. – V. 61(11). – P. 2646-2653.
82. Hoefman S., Heylen K., De Vos P. *Methylomonas lenta* sp. nov., a methanotroph isolated from manure and a denitrification tank // *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2014. – V. 64(4). – P. 1210-1217.
83. Holmes A.J., Costello A., Lidstrom M.E., Murrell J.C. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonium monooxygenase may be evolutionarily related // *FEMS Microbiology Letters*. – 1995. – V. 132. – P. 203-208.
84. Horz H.P., Rich V., Avrahami S., Bohannon B.J.M. Methane oxidizing bacteria in a California upland grassland soil: diversity and response to simulated global change // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71. – P. 2642-2652.
85. Hu L., Guo S., Yan X., Zhang T., Xiang J., Fei Q. Exploration of an efficient electroporation system for heterologous gene expression in the genome of methanotroph // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – V. 12. – art. 717033.
86. Hur D.H., Nguyen T.T., Kim D., Lee E.Y. Selective bio-oxidation of propane to acetone using methane-oxidizing *Methylomonas* sp. DH-1 // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – V. 44(7). – P. 1097-1105.
87. Ishikawa M., Yokoe S., Kato S., Hori K. Efficient counterselection for *Methylococcus capsulatus* (Bath) by using a mutated *pheS* gene // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2018. – V. 84. – art. e01875-18.
88. Jeong J., Kim T.H., Jang N., Ko M., Kim S.K., Baek J.I., Emelianov G., Rha E., Kwon K.K., Kim H., Lee E.Y., Lee D.H., Lee H., Lee S.G. A highly efficient and versatile genetic engineering toolkit for a methanotroph-based biorefinery // *Chemical Engineering Journal*. – 2023. – V. 453. – art. 139911.
89. Jodts R.J., Ross M.O., Koo C.W., Doan P.E., Rosenzweig A.C., Hoffman B.M. Coordination of the copper centers in particulate methane monooxygenase: Comparison between methanotrophs and characterization of the Cu<sub>C</sub> site by EPR and ENDOR spectroscopies // *Journal of the American Chemical Society*. – 2021. – V. 143(37). – P. 15358-15368.
90. Kalyuzhnaya M.G. Hristova K.R., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of *Burkholderiales*: implications for

- environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution // *Journal of Bacteriology*. – 2008b. – V. 190(11). – P. 3817-3823.
91. Kalyuzhnaya M.G., Kumaresan D., Heimann K., Caetano N.S., Visvanathan C., Karthikeyan O.P. Methane: A bioresource for fuel and biomolecules // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 8. – art. 9.
92. Kalyuzhnaya M.G., Lapidus A., Ivanova N., Copeland A., McHardy A.C., Szeto E., Salamov A., Grigoriev I.V., Suciú D., Levine S.R., Markowitz V.M., Rigoutsos I., Tringe S.G., Bruce D.C., Richardson P.M., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities // *Nature Biotechnology*. – 2008a. – V. 26(9). – P. 1029-1034.
93. Kalyuzhnaya M.G., Puri A.W., Lidstrom M.E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria // *Metabolic Engineering*. – 2015. – V. 29. – P. 142-152.
94. Kalyuzhnaya M.G., Khmelenina V.N., Kotelnikova S., Holmquist L., Pedersen K., Trotsenko Y.A. *Methylomonas scandinavica* sp. nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden // *Systematic and Applied Microbiology*. – 1999. – V. 22. – P. 565-572.
95. Kalyuzhnaya M.G., Puri A.W., Lidstrom M.E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria // *Metabolic Engineering*. – 2015. – V. 29. – P. 142-52.
96. Keltjens J.T., Pol A., Reimann J., Op den Camp H.J.M. PQQ-dependent methanol dehydrogenases: rare-earth elements make a difference // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – V. 98. – P. 6163-6183.
97. Khadem A.F., Pol A., Wiczorek A., Mohammadi S.S., Francoijs K.J., Stunnenberg H.G., Jetten M.S.M., Op den Camp H.J. Autotrophic methanotrophy in *Verrucomicrobia*: *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV uses the Calvin-Benson-Bassham cycle for carbon dioxide fixation // *Journal of Bacteriology*. – 2011. – V. 193(17). – P. 4438-4446.
98. Khadem A.F., Pol A., Wiczorek A. Autotrophic methanotrophy in *Verrucomicrobia*: *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV uses the Calvin-Benson-Bassham cycle for carbon dioxide fixation // *Journal of Bacteriology*. – 2011. – V. 193. – P. 4438-4446.
99. Khmelenina V.N., Rozova O.N., Akberdin I.R., Kalyuzhnaya M.G., Trotsenko Y.A. Pyrophosphate-dependent enzymes in methanotrophs: new findings and views // *Methane biocatalysis: paving the way to sustainability*. – 2018. – P. 83-98.

100. Kirschke S., Bousquet P., Ciais P., Saunois M., Canadell J.G., Dlugokencky E.J., Bergamaschi P., Bergmann D., Blake D.R., Bruhwiler L., Cameron-Smith P., Castaldi S., Chevallier F., Feng L., Fraser A., Heimann M., Hodson E.L., Houweling S., Josse B., Fraser P.J., Paul B., Krummel P.B., Lamarque J-F., Langenfelds R.L., Quéré C.L., Naik V., O'Doherty S., Palmer P.I., Pison I., Plummer D., Poulter B., Prinn R.G., Rigby M., Ringeval B., Santini M., Schmidt M., Shindell D.T., Simpson I.J., Spahni R., Steele L.P., Strode S.A., Sudo K., Szopa S., van der Werf G.R., Voulgarakis A., van Weele M., Ray F., Weiss R.F., Williams J.E., Zeng G. Three decades of global methane sources and sinks // *Nature Geoscience*. – 2013. – V. 6. – P. 813-823.
101. Knief C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – V. 6. – art. 1346.
102. Knief C., Dunfield P.F. Response and adaptation of different methanotrophic bacteria to low methane mixing ratios // *Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 7(9). – P. 1307-1317.
103. Konstantinidis K.T., Tiedje J.M. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes // *Journal of Bacteriology*. – 2005. – V. 187(18). – P. 6258-6264.
104. Koo C.W., Rosenzweig A.C. Biochemistry of aerobic biological methane oxidation // *Chemical Society Reviews*. – 2021. – V. 50(5). – P. 3424-3436.
105. Koo C.W., Tucci F.J., He Y., Rosenzweig A.C. Recovery of particulate methane monooxygenase structure and activity in a lipid bilayer // *Science*. – 2022. – V. 375(6586). – P. 1287-1291.
106. 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. – V. 138(30). – P. 9327-9340.
107. 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. – V. 384. – art. 129296.
108. Lee H.J., Kim S.Y., Kim P.J., Madsen E.L., Jeon C.O. Methane emission and dynamics of methanotrophic and methanogenic communities in a flooded rice field ecosystem // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2014. – V. 88(1). – P. 195-212.



109. Lee H.M., Ren J., Yu M.S., Kim H., Kim W.Y., Shen J., Yoo S.M., Eyun S.I., Na D. Construction of a tunable promoter library to optimize gene expression in *Methylomonas* sp. DH-1, a methanotroph, and its application to cadaverine production // *Biotechnology for Biofuels*. – 2021b. – V. 14. – art. 228.
110. Lee J.Y., Choi M., Song M.J., Kim D.D., Yun T., Chang J., Ho A., Myung J., Yoon S. Selective enrichment of *Methylococcaceae* versus *Methylocystaceae* methanotrophs via control of methane feeding schemes // *Environmental Science & Technology*. – 2024. – V. 58(32). – P. 14237-14248.
111. Lee S.J., McCormick M.S., Lippard S.J., Cho U-S. Control of substrate access to the active site in methane monooxygenase // *Nature*. – 2013. – V. 494. – P. 380-384.
112. Lee S-K., Nesheim J.C., Lipscomb J.D. Transient intermediates of the methane monooxygenase catalytic cycle // *Journal of Biological Chemist.* – 1993. – V. 268. – P. 21569-21577.
113. Li J., Li Y., Pawlik K.M., Napierala J.S., Napierala M. A CRISPR-Cas9, Cre-lox, and Flp-FRT cascade strategy for the precise and efficient integration of exogenous DNA into cellular genomes // *The CRISPR Journal*. – 2020. – V. 3(6). – P. 470-486.
114. Liu Y., Zhang H., He X., Liu J. Genetically engineered methanotroph as a platform for bioaugmentation of chemical pesticide contaminated soil // *ACS Synthetic Biology*. – 2021. – V. 10. – P. 487-494.
115. Martinho M., Choi D.W., Dispirito A.A., Antholine W.E., Semrau J.D., Münck E. Mössbauer studies of the membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* Bath: evidence for a Diiron center // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – V. 26. – P. 15783-15785.
116. Marx C.J., Lidstrom M.E. Broad-host-range Cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria // *Biotechniques*. – 2002. – V. 33(5). – P. 1062-1067.
117. Matsen J.B., Yang S., Stein L.Y., Beck D., Kalyuzhnaya M.G. Global molecular analyses of methane metabolism in methanotrophic *Alphaproteobacterium*, *Methylosinus trichosporium* OB3b. Part I: Transcriptomic Study // *Frontiers in Microbiology*. – 2013 – V. 4. – art. 40.
118. McCarty N.S., Graham A.E., Studená L., Ledesma-Amaro R. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation // *Nature Communications*. – 2020. – V. 11(1). – art. 1281.

119. McDonald I.R., Bodrossy L., Chen Y., Murrell J.C. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – V. 74. – P. 1305-1315.
120. McDonald I.R., Kenna E.M., Murrell J.C. Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1995. – V. 61. – P. 116-121.
121. Mohammadi S.S., Schmitz R.A., Pol A., Berben T., Jetten M.S., Op den Camp H.J. The acidophilic methanotroph *Methylacidimicrobium tartarophylax* 4AC grows as autotroph on H<sub>2</sub> under microoxic conditions // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – art. 2352.
122. Murguia-Flores F., Arndt S., Ganesan A.L., Murray-Tortarolo G., Hornibrook E. R. Soil methanotrophy model (MeMo v1. 0): a process-based model to quantify global uptake of atmospheric methane by soil // *Geoscientific Model Development*. – 2018. – V. 11(6). – P. 2009-2032.
123. Murrell J.C., McDonald I.R., Bourne D.G. Molecular methods for the study of methanotroph ecology // *FEMS Microbiology Ecology*. – 1998. – V. 27(2). – P. 103-114.
124. Murrell J.C., McGowan V., Cardy D.L.N. Detection of methylotrophic bacteria in natural samples by molecular probing techniques // *Chemosphere*. – 1992. – V. 26. – P. 1-11.
125. Nakagawa T., Mitsui R., Tani A., Sasa K., Tashiro S., Iwama T., Kawai K. A catalytic role of XoxF1 as La<sup>3+</sup>-dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1 // *PloS One*. – 2012. – V. 7(11). – art. e50480.
126. Nguyen A.D., Hwang I.Y., Lee O.K., Kim D., Kalyuzhnaya M.G., Mariyana R., Hadiyati S., Kim M.S., Lee E.Y. Systematic metabolic engineering of *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z for 2,3-butanediol production from methane // *Metabolic Engineering*. – 2018. – V. 47. – P. 323-333.
127. Nguyen D.T.N., Lee O.K., Hadiyati S., Affifah A.N., Kim M.S., Lee E.Y. Metabolic engineering of the type I methanotroph *Methylomonas* sp. DH-1 for production of succinate from methane // *Metabolic Engineering*. – 2019. – V. 54. – P. 170-179.
128. Nguyen L.T., Lee E.Y. Biological conversion of methane to putrescine using genome-scale model-guided metabolic engineering of a methanotrophic bacterium *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z // *Biotechnology for Biofuels*. – 2019. – V. 12. – art. 147.

129. Nikiema J., Brzezinski R., Heitz M. Elimination of methane generated from landfills by biofiltration: a review // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2007. – V. 6. – P. 261-284.
130. Nizovtseva I.G., Chernushkin D.V., Rezaykin A.V., Svitich V.E., Korenskaia A.E., Mikushin P.V., Starodumov I.O. Gas fermentation: a game-changing technology from molecular engineering to bioreactors, modeling, and optimizing processes and apparatuses // *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. – 2024. – V. 58(5). – P. 1671-1682.
131. Ogiso T., Ueno C., Dianou D., Huy T.V., Katayama A., Kimura M., Asakaw S. *Methylomonas koyamae* sp. nov., a type I methane-oxidizing bacterium from floodwater of a rice paddy field // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012. – V. 62(8). – P. 1832-1837.
132. Op den Camp H.J.M., Islam T., Stott M.B., Harhangi H.R., Hynes A., Schouten S., Jetten M.S.M., Birkeland N.K., Pol A., Dunfield P.F. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia* // *Environmental Microbiology Reports*. – 2009. – V. 1(5). – P. 293-306.
133. Oshkin I.Y., Danilova O.V., But S.Y., Miroshnikov K.K., Suleimanov R.Z., Belova S.E., 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.
134. 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.
135. 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.
136. Park D., Lee J. Biological conversion of methane to methanol // *Korean Journal of Chemical Engineering*. – 2013. – V. 30. – P. 977-987.
137. Pieja A.J., Rostkowski K.H., Criddle C.S. Distribution and selection of poly-3-hydroxybutyrate production capacity in methanotrophic proteobacteria // *Microbial Ecology*. – 2011. – V. 62. – P. 564-573.

138. Pikaar I., Matassa S., Bodirsky B.L., Weindl I., Humpenöder F., Rabaey K., Popp A. Decoupling livestock from land use through industrial feed production pathways // *Environmental Science & Technology*. – 2018. – V. 52(13). – P. 7351-7359.
139. Puri A.W., Kalyuzhnaya M.G., Lidstrom M.E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria // *Metabolic engineering*. – 2015. – V. 29. – P. 142-152.
140. Puri A.W., Owen S., Chu F., Chavkin T., Beck D.A.C., Kalyuzhnaya M.G. Genetic tools for the industrially promising methanotroph *Methylobacterium buryatense* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2015. – V. 81. – P. 1775-1781.
141. Rajesh M., Kamalam B. S., Sharma P., Verma V.C., Pandey A., Dubey M.K., Kaushik S.J. Evaluation of a novel methanotroph bacteria meal grown on natural gas as fish meal substitute in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // *Aquaculture Research*. – 2022. – V. 53(6). – P. 2159-2174.
142. Rasigraf O., Kool D.M., Jetten M.S., Sinninghe Damsté J.S., Ettwig K.F. Autotrophic carbon dioxide fixation via the Calvin-Benson-Bassham cycle by the denitrifying methanotroph “*Candidatus Methylobacterium oxyfera*” // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – V. 80(8). – P. 2451-2460.
143. Ratnadevi C.M., Erikstad H.A., Kruse T., Birkeland N.K. *Methylobacterium kamchatkense* gen. nov., sp. nov., an extremely acidophilic and moderately thermophilic methanotroph belonging to the phylum *Verrucomicrobiota* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2023. – P. 73(9). – art. 006060.
144. Recorbet G., Robert C., Givaudan A., Kudla B., Normand P., Faurie G. Conditional suicide system of *Escherichia coli* released into soil that uses the *Bacillus subtilis sacB* gene // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1993. – V. 59(5). – P. 1361-1366.
145. Reshetnikov A.S., Khmelenina V.N., Mustakhimov I.I., Trotsenko Y.A. Genes and enzymes of ectoine biosynthesis in halotolerant methanotrophs // *Methods in Enzymology*. – 2011. – V. 495. – P. 15-30.
146. Reshetnikov A.S., Solntseva N.P., Rozova O.N., Mustakhimov I.I., Trotsenko Y.A., Khmelenina V.N. ATP- and polyphosphate-dependent glucokinases from aerobic methanotrophs // *Microorganisms*. – 2019. – V. 7(2). – art. 52.
147. Ritala A., Häkkinen S.T., Toivari M., Wiebe M.G. Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016 // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – art. 300587.

148. Ro S.Y., Rosenzweig A.C. Recent advances in the genetic manipulation of *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Methods in Enzymology*. – 2018. – V. 605. – P. 335-349.
149. Ro S.Y., Ross M.O., Deng Y.W., Batelu S., Lawton T.J., Hurley J.D., Rosenzweig A.C. From micelles to bicelles: Effect of the membrane on particulate methane monooxygenase activity // *Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – V. 293(27). – P. 10457-10465.
150. Ross M.O., Macmillan F., Wang J., Nisthal A., Lawton T.J., Olafson B.D., Mayo S.L., Rosenzweig A.C., Hoffman B.M. Particulate methane monooxygenase contains only mononuclear copper centers // *Science*. – 2019. – V. 364 (6440). – P. 566-570.
151. Rozova O.N., But S.Y., Khmelenina V.N., Reshetnikov A.S., Mustakhimov I.I., Trotsenko Y.A. Characterization of two recombinant 3-hexulose-6-phosphate synthases from the halotolerant obligate methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z // *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – V. 82. – P. 176-185.
152. Rumah B.L., Claxton Stevens B.H., Yeboah J.E., Stead C.E., Harding E.L., Minton N.P., Zhang Y. In vivo genome editing in type I and II methanotrophs using a CRISPR/Cas9 system // *ACS Synthetic Biology*. – 2023. – V. 12(2). – P. 544-554.
153. Sánchez-Andrea I., Guedes I.A., Hornung B., Boeren S., Lawson C.E., Sousa D.Z., Bar-Even A., Claassens N.J., Stams A.J. The reductive glycine pathway allows autotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* // *Nature Communications*. – 2020. – V. 11(1). – art. 5090.
154. Saunio M., Stavert A.R., Poulter B., Bousquet P., Canadell J.G., Jackson R.B., Raymond P.A., Dlugokencky E.J., Houweling S., Patra P.K., Ciais P., Arora V.K., Bastviken D., Bergamaschi P., Blake D.R., Brailsford G., Bruhwiler L., Carlson K.M., Carrol M., Castaldi S., Chandra N., Crevoisier C., Crill P.M., Covey K., Curry C.L., Etiope G., Frankenberg C., Gedney N., Hegglin M.I., Höglund-Isaksson L., Hugelius G., Ishizawa M., Ito A., Janssens-Maenhout G., Jensen K.M., Joos F., Kleinen T., Krummel P.B., Langenfelds R.L., Laruelle G.G., Liu L., Machida T., Maksyutov S., McDonald K.C., McNorton J., Miller P.A., Melton J.R., Morino I., Müller J., Murguia-Flores F., Naik V., Niwa Y., Noce S., O'Doherty S., Parker R.J., Peng C., Peng S., Peters G.P., Prigent C., Prinn R., Ramonet M., Regnier P., Riley W.J., Rosentreter J.A., Segers A., Simpson I.J., Shi H., Smith S.J., Steele L.P., Thornton B.F., Tian H., Tohjima Y., Tubiello F.N., Tsuruta A., Viovy N., Voulgarakis A., Weber T.S., van Weele M., van der Werf G.R., Weiss R.F., Worthy D., Wunch D., Yin Y.,

- Yoshida Y., Zhang W., Zhang Z., Zhao Y., Zheng B., Zhu Q., Zhu Q., Zhuang Q. The global methane budget 2000–2017 // *Earth System Science Data*. – 2019. – V. 2019. – P. 1-136.
155. Schafer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Theirbach G., and Puhler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // *Gene*. – 1994. – V. 145. – P. 69-73.
156. Schweizer H.P. Applications of the *Saccharomyces cerevisiae* Flp-FRT system in bacterial genetics // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. – 2003. – V. 5(2). – P. 67-77.
157. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // *Bioinformatics*. – 2014. – V. 30(14). – P. 2068-2069.
158. Semrau J.D., DiSpirito A.A., Yoon S. Metals and methanotrophy // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2018. – V. 84(6). – art. e02289-17.
159. Semrau J.D., DiSpirito A.A., Yoon S. Methanotrophs and copper // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2010. – V. 34(4). – P. 496-531.
160. Semrau J.D., Zolanz D., Lindstrom M.E., Chan S.I. The role of copper in the pMMO of *Methylococcus capsulatus* Bath: a structural vs. catalytic function // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 1995. – V. 58(4). – P. 235-244.
161. Sirajuddin S., Rosenzweig A. C. Enzymatic oxidation of methane // *Biochemistry*. – 2015. – V. 54(14). – P. 2283-2294.
162. Skovran E., Raghuraman C., Martinez-Gomez N.C. Lanthanides in methylotrophy // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2019. – V. 33(1). – P. 101-116.
163. Stafford G.P., Scanlan J., McDonald I.R., Murrell J.C. *rpoN*, *mmoR* and *mmoG*, genes involved in regulating the expression of soluble methane monooxygenase in *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Microbiology (SGM)*. – 2003. – V. 149. – P. 1771-1784.
164. Stein L.Y., Klotz M.G. Nitrifying and denitrifying pathways of methanotrophic bacteria // *Biochemical Society Transactions*. – 2011. – V. 39(6). – P. 1826-1831.
165. Sternberg N., Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between *loxP* sites // *Journal of Molecular Biology*. – 1981. – V. 150(4). – P. 467-486.
166. Takeuchi M., Kamagata Y., Oshima K., Hanada S., Tamaki H., Marumo K., Maeda H., Nedachi M., Hattori M., Iwasaki W., Sakata S. *Methylocaldum marinum* sp. nov., a

- thermotolerant, methane-oxidizing bacterium isolated from marine sediments, and emended description of the genus *Methylocaldum* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2014. – V. 64(9). – P. 3240-3246.
167. Tao L., Sedkova N., Yao H., Ye R.W., Sharpe P.L., Cheng Q. Expression of bacterial hemoglobin genes to improve astaxanthin production in a methanotrophic bacterium *Methylomonas* sp // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – V. 74(3). – P. 625-633.
168. Tapscott T., Guarnieri M.T., Henard C.A. Development of a CRISPR/Cas9 system for *Methylococcus capsulatus* in vivo gene editing // Applied and Environmental Microbiology. – 2019. – V. 85(11). – art. e00340-19.
169. Taylor S.C., Dalton H., Dow C.S. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and carbon assimilation in *Methylococcus capsulatus* (Bath) // Microbiology (SGM). – 1981. – V. 122(1). – P. 89-94.
170. 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.
171. 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., Khmelenina V.N., 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.
172. Trotsenko Y.A., Khmelenina V.N. Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs // Archives of Microbiology. – 2002. – V. 177. – P. 123-131.
173. Trotsenko Y.A., Murrell J.C. Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy // Advances in Applied Microbiology – 2008. – V. 63. – P. 183-229.
174. Trotsenko Y.A., Shishkina V.N. Studies on phosphate metabolism in obligate methanotrophs // FEMS Microbiology Reviews. – 1990. – V. 7(3). – P. 267-271.
175. Tsubota J., Eshinimaev B.T., Khmelenina V.N., Trotsenko Y.A. *Methylothermus thermalis* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic obligate methanotroph from a hot spring in Japan // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2005. – V. 55(5). – P. 1877-1884.

176. Tucci F.J., Rosenzweig A.C. Direct methane oxidation by copper- and iron-dependent methane monooxygenases // *Chemical Reviews*. – 2024. – V. 124(3). – P. 1288-1320.
177. Vorholt J.A. Microbial life in the phyllosphere // *Nature Reviews Microbiology*. – 2012. – V. 10(12). – P. 828-840.
178. Vorholt J., Chistoserdova L., Lidstrom M., Thauer R. The NADP-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 // *Journal of Bacteriology*. – 1998. – V. 180. – P. 5351-5356.
179. Vorholt J.A. Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria // *Archives of Microbiology*. – 2002. – V. 178. – P. 39-249.
180. Vorobev A.V., Baani M., Doronina N.V., Brady A.L., Liesack W., Dunfield P.F., Dedys S.N. *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. – V. 61. – P. 2456-2463
181. Vu H.N., Subuyuj G.A., Vijayakumar S. Lanthanide-dependent regulation of methanol oxidation systems in *Methylobacterium extorquens* AM1 and their contribution to methanol growth // *Journal of Bacteriology*. – 2016. – V. 98. – P. 1250-1259.
182. Wang J., Chen L., Xu J., Ma S., Liang X., Wei Z., Li D., Xue M. C<sub>1</sub> gas protein: a potential protein substitute for advancing aquaculture sustainability // *Reviews in Aquaculture*. – 2022. – V. 15(3). – P. 1179-1197.
183. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *Journal of Bacteriology*. – 1991. – V. 173. – P. 697-703.
184. Whittenbury R. The interrelationship of autotrophy and methylotrophy as seen in *Methylococcus capsulatus* (Bath) // *Microbial growth on C<sub>1</sub> compounds*. Heyden, London. – 1981. – P. 181-190.
185. Whittenbury R., Dalton H. The methylotrophic bacteria // *The prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. – Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 1981. – P. 894-902.
186. Whittenbury R., Phillips K. C., Wilkinson J.F. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria // *Microbiology*. – 1970. – V. 61(2). – P. 205-218.
187. Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // *PLoS Computational Biology*. – 2017. – V. 13(6). – art. e1005595.



188. Williams E., Shimmin M.A., Bainbridge B.W. Mutation in the obligate methylotrophs *Methylococcus capsulatus* and *Methylomonas albus* // FEMS Microbiology Letters. – 1977. – V. 2(6). – P. 293-296.
189. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Current Protocols in Molecular Biology. – 2001. – V. 56(1). – P. 2.4.1-2.4.5.
190. Woodland M.P, Patil D.S., Cammack R., Dalton H. ESR studies of protein A of the soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. – 1986. – V. 873(2). – P. 237-242.
191. Xin J., Cui J. R., Niu J. Z., Hua S.F., Xia C.G., Li S.B., Zhu L.M. Production of methanol from methane by methanotrophic bacteria // Biocatalysis and Biotransformation. – 2004. – V. 22(3). – P. 225-229.
192. Yan X., Chu F., Puri A.W., Fu Y., Lidstrom M.E. Electroporation-based genetic manipulation in type I methanotrophs // Applied and Environmental Microbiology. – 2016. – V. 82. – P. 2062-2069.
193. Yang S., Matsen J.B., Konopka M., Green-Saxena A., Clubb J., Sadilek M., Orphan V.J., Beck D., Kalyuzhnaya M.G. 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. – V. 4. – art. 70.
194. Ye R.W., Kelly K. Construction of carotenoid biosynthetic pathways through chromosomal integration in methane-utilizing bacterium *Methylomonas* sp. strain 16a // Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae: Methods and Protocols. – 2012. – P. 185-195.
195. Ye R.W., Yao H., Stead K., Wang T., Tao L., Cheng Q., Sharpe P.L., Suh W., Nagel E., Arcilla D., Dragotta D., Miller E.S. Construction of the astaxanthin biosynthetic pathway in a methanotrophic bacterium *Methylomonas* sp. strain 16a // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2007. – V. 34. – P. 289-299.
196. Yu S.S.F., Chen K.H.C., Tseng M.Y.H., Wang Y.S., Tseng C.F., Chen Y.J., Chan S.I. Production of high-quality particulate methane monooxygenase in high yields from *Methylococcus capsulatus* (Bath) with a hollow-fiber membrane bioreactor // Journal of bacteriology. – 2003. – V. 185(20). – P. 5915-5924.

197. Zheng Y., Zhang L.M., Zheng Y.M., Di H., He J.Z. Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices // *Journal of Soils and Sediments*. – 2008. – V. 8. – P. 406-414.
198. Zhu Y., Koo C.W., Cassidy C.K., Spink M.C., Ni T., Zanetti-Domingue L.C., Bateman B., Martin-Fernandez M.L., Shen J., Sheng Y., Song Y., Yang Z., Rosenzweig A.C., Zhang P. Structure and activity of particulate methane monooxygenase arrays in methanotrophs // *Nature Communications*. – 2022. – V. 13(1). – art. 5221.