

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МИКРООРГАНИЗМОВ-СПУТНИКОВ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МЕТАНОТРОФНЫХ СООБЩЕСТВ

© 2024 г. А. А. Сачавский¹, М. В. Романова¹, Н. А. Суясов¹,
А. С. Решетова¹, А. Д. Безяева¹, С. В. Калёнов¹, *

¹ФГБОУ ВПО “Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева”, Москва, 125047 Россия

*e-mail: wsezart@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.10.2024 г.

После доработки 08.11.2024 г.

Принята к публикации 09.11.2024 г.

Использование искусственных метанооксиляющих сообществ является перспективным направлением для повышения эффективности процесса культивирования метанотрофных микроорганизмов. Неметанотрофные бактерии-спутники в составе ассоциаций способны использовать ингибирующие рост продукты метаболизма и лизиса основной доминантной культуры. Проведенное исследование позволило выявить положительное влияние *Brevibacillus brevis* на накопление биомассы в ходе совместного культивирования с метанотрофами родов *Methylosinus* и *Methylocystis*, а также более позднее наступление стационарной фазы метанооксиляющих бактерий в ассоциации с *Brevibacillus brevis*, *Cupriavidus necator* и *Azospirillum lipoferum*. При культивировании парных ассоциаций, включающих *Azospirillum lipoferum* или *Brevibacillus brevis* выявлено увеличение скорости роста отобранных метанотрофных культур в присутствии ингибирующих концентраций метанола. Установлено повышение доли белка в биомассе парных сообществ, в которых присутствовал *Cupriavidus necator* в качестве спутника. Показано отрицательное воздействие актиномицета *Nocardia farcinica* на скорость роста синтетических метанотрофных сообществ. Культивирование метанооксиляющих микроорганизмов с подобранными неметанотрофными бактериями в рамках синтетического сообщества позволяет интенсифицировать процесс роста целевой культуры и также потенциально повысить продуктивность культивирования.

Ключевые слова: метанотрофные микроорганизмы, SCP, микроорганизмы-спутники, искусственные сообщества

DOI: 10.56304/S0234275824060140

ВВЕДЕНИЕ

Применение кормовых добавок, полученных из белка одноклеточных прокариотических микроорганизмов (SCP), может внести существенный вклад в решение проблемы дефицита белковых веществ в кормах для аквакультур, птиц и млекопитающих [1, 2]. Производство SCP перспективно экономически, независимо от климатических изменений и требует минимальных земельных ресурсов [1]. Культивирование бактерий зачастую отличается значительной скоростью роста, высоким выходом и содержанием белка в биомассе (40–80% белка от сухого веса) в сравнении с грибами (20–60%) и дрожжами (до 55%), а также является более технологически простым относительно выращивания микроводорослей [3]. К перспективным источникам для получения SCP

относят метанотрофные микроорганизмы и метанотрофные сообщества на их основе [4].

Метанотрофы характеризуются способностью использовать в качестве единственного источника углерода метан, который окисляется до метанола [5]. Специфическим ферментом метанотрофных организмов, отвечающим за данный процесс, является метанмонооксигеназа, которая присутствует в этих микроорганизмах в формах растворимого (sММО) и мембраносвязанного (нерастворимого) фермента (pММО) [6, 7]. В дальнейшем метаболическом пути метанол окисляется до формальдегида, который в результате анаболизма может усваиваться, включаясь в сериновый или рибозомонофосфатный цикл, либо подвергаться дальнейшему окислению до формиата и CO₂ [8, 9].

Биомасса некоторых метанотрофных микроорганизмов обладает высоким содержанием витамина B₁₂ и оптимальным аминокислотным профилем, аналогичным по составу рыбной и соевой муке [10]. Установлено, что применение кормовой

Список сокращений: SCP (Single Cell Protein) – белок одноклеточных организмов.

добавки на основе метанотрофных микроорганизмов способны стимулировать рост различных аквакультур (рыбы, креветки), птиц и млекопитающих [11–13]. Таким образом, метанотрофы способны использовать доступное и недорогое сырье, снижать уровень парниковых выбросов в атмосферу и при этом производить продукт с добавленной стоимостью, тем самым способствуя переходу к экономике “замкнутого цикла” [14].

Особый интерес для научных исследований с практической направленностью вызывает изучение метанотрофных сообществ, которые могут быть как естественного (выделенные и обогащенные из природных сред), так и искусственного происхождения (сконструированные на основе известных штаммов) [15, 16]. В целом, метанотрофные сообщества характеризуются наличием в своем составе одного или нескольких метанооксиляющих микроорганизмов, а также ряда неметанотрофных автотрофных или гетеротрофных микроорганизмов-спутников [17–19]. Организмы в составе сообщества могут вступать в мутуалистические, симбиотические или антагонистические взаимоотношения, а также сосуществовать без значимого влияния друг на друга [20]. При этом состав, количественное соотношение культур и продуктивность сообщества может изменяться с течением времени под воздействием различных факторов, таких как аэрация, pH, температура, накопление продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, количество макро- и микроэлементов [21–24].

Установлено, что в результате окисления метана доминантными метанотрофными культурами в ростовой среде могут накапливаться метанол, формальдегид и формиат, которые приводят к самоинтоксикации бактерий и формированию неблагоприятных условий роста [25]. Специфические гетеротрофные спутники способны участвовать в процессах соокисления данных метаболитов, что помогает уменьшать их ингибирующее воздействие при накоплении в культуральной жидкости и способствует повышению стабильности процесса [26, 27]. Так, в ходе культивирования обогащенного метанооксиляющего сообщества на метане в ростовой среде было обнаружено от 2 до 76 мкг/л формальдегида, от 11 до 45 мкг/л ацетата и до 28 мкг/л цитрата, в то время как метанол, формиат и бутират были детектированы в следовых количествах [28]. Исследования показали, что выращивание бактерий *Methylomonas* в ассоциации с *Cupriavidus taiwanensis* и *Methylosarcina fibrata* совместно с *Staphylococcus aureus* приводит к интенсификации роста метанотрофной культуры [27]. Более того, неметанотрофные микроорганизмы выделяют в окружающую среду соединения, стимулирующие рост доминантной метанотрофной культуры. Сообщалось о значимом увеличении потребления метана культурой *Methylobacter*

luteus в присутствии *Bacillus pumilus*, *Bacillus simplex*, *Exiguobacterium undae* и *Stenotrophomonas maltophilia* благодаря синтезу гетеротрофами летучих органических соединений [29]. Другим примером такого взаимодействия может являться выработка не окисляющими метан бактериями вида *Rhizobium* кобаламина, который в дальнейшем потребляется метанооксиляющими бактериями [30]. Также установлено существование устойчивой симбиотической ассоциации, состоящей из бактерий р. *Methylosinus* и азотфиксатора р. *Bradyrhizobium* [31]. В то же время ассоциации метанотрофов и автотрофных микроорганизмов способствуют увеличению эффективности усваивания углеродсодержащего субстрата при использовании природного газа в процессе культивирования сообщества, что подтверждается успешным ростом метан- и водородооксиляющего сообщества, включающего *Methyloparacoccus murrelli* и *Cupriavidus necator* [32]. Сообщается о возможности получения SCP со значимой долей белковых веществ (до 73%) из богатого сульфидными биогаза смешанной культурой метан- и сульфатооксиляющих бактерий [33].

С другой стороны, микроорганизмы, составляющие бактериальное сообщество, могут проявлять антагонизм по отношению друг к другу за счет выработки бактериальных токсинов и антибиотиков [34]. В основном данное явление возникает из-за конкуренции за питательные компоненты среды, а слишком большое видовое разнообразие способно усилить конкурентное влияние в рамках сообщества [35].

Установлено, что по сравнению с культивированием чистых метанотрофных культур, применение метанотрофных сообществ может характеризоваться большей стабильностью и продуктивностью [17, 36, 37]. Примером успешного использования смешанного метанотрофного сообщества для производства SCP может являться коммерческий препарат Bacterial Meal (FeedKind®), получаемый при культивировании метанотрофного штамма *Methylococcus capsulatus* вместе в гетеротрофными неметанотрофами *Cupriavidus* sp., *Aneurinibacillus danicus*, а также *Brevibacillus agri* [38, 39].

Несмотря на растущий спрос рынка кормовых добавок на белок одноклеточных организмов, получаемый из метанотрофных сообществ, существующие исследования ограничены в отношении анализа влияния того или иного микроорганизма-спутника на рост и продуктивность метанотрофных ассоциаций.

Целью данного исследования являлось определение влияния неметанотрофных микроорганизмов на рост метанооксиляющей ассоциации в присутствии метана в качестве единственного источника органического углерода. Отдельный акцент был сделан на выявлении способности спутников использовать продукты лизиса метанотрофных бакте-

рий. Планировалось проведение исследования веществ, образующихся в результате окисления метана и оказывающих ингибирующее воздействие на рост культуры (на примере метанола), а также оценка перспективы промышленного получения белка одноклеточных организмов на метане в присутствии немитанотрофных бактерий в составе сконструированного сообщества.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Отбор проб

Пробы почв были отобраны из прикорневой зоны сосны на морском берегу (координаты: 43.154681, 40.331367) и грота, расположенного в районе оз. Рица (координаты: 43.478496, 40.548453).

Получение обогащенных метанотрофных сообществ

С целью получения метанотрофных сообществ, обогащенных по основным метаболически связанным микроорганизмам, образцы почв инокулировали в жидкую минеральную среду DNMS с калий-фосфатным буфером (рН 6.8)¹ [40]. Процесс проводили в течение 90 сут в колбах Эрленмейера объемом 1 л с герметично закрываемой крышкой и разъемом для ввода газовой смеси при температуре 35–37°C при постоянном перемешивании со скоростью 160 об/мин на шейкере Shaker S-3.10M (ELMI, Латвия). С целью предотвращения роста немитанотрофных культур на гомологах метана, содержащихся в природном газе, и их побочном окислении метанмонооксигеназой, в качестве единственного источника углерода использовали чистый метан, подаваемый в составе газовой смеси [41]. Содержание метана в смеси составляло 30%, а обновление газовой среды осуществляли каждые 48 ч. Оба метанотрофных сообщества, полученные из различных природных сред, при достижении оптической плотности суспензии при 600 нм ($ОП_{600}$) > 0.3 (около 10^8 клеток/мл) пересеивали, перенося аликвоту (5 об. %) в свежую среду того же состава.

Дальнейший этап обогащения основными культурами заключался в непрерывном культивировании в ферментере объемом 5 л на среде NMS в течение 14 сут. При достижении стабильных параметров при скорости потока 0.2 ч^{-1} , а также неизменных со временем результатов микроскопии сообщества отбирали для дальнейших исследований.

¹ Для приготовления сред использованы соли и органические вещества различных производителей. Состав сред приведен в соответствующих статьях, на которые даны ссылки.

Выделение чистых метанотрофных и немитанотрофных культур

Чистые метанотрофные и немитанотрофные микроорганизмы выделяли методом серийных разведений высевом на твердые агаризованные среды NMS, LB, R2A и Эшби [42–44]. Чашки с твердой средой инкубировали в эксикаторе при 35–37°C как в присутствии 30% метана в газовой среде, так и без него в течение 3–5 сут в зависимости от среды.

Идентификация метанотрофных и немитанотрофных штаммов

Идентификацию чистых метанотрофных и немитанотрофных штаммов проводили с использованием оборудования центра коллективного пользования ФИЦ “Биотехнологии” РАН. Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК для исследуемого образца были использованы универсальные праймерные системы, позволяющие детектировать как бактерии (11f-1492r), так и археи (8fa-1492r) [45, 46]. Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: $1 \times$ буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67 мМ трис-НCl, рН 8.8, 2 мМ MgCl_2); по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (“Диалат ЛТД”, Россия). Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2%-ном геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см. Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США), согласно рекомендациям производителя. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, проводили по методу Сэнгера с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc., США) на генетическом анализаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems).

В ходе проведения первичного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемых микроорганизмов полученные последовательности были сгруппированы в операционные таксономические единицы (OTU) на основе гомологии на уровне видов (с идентичностью от 97%). Таксономическая идентификацию проводили при помощи базы данных последовательностей рРНК SILVA и классификатора SINA. Программный пакет BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) применяли для поиска ближайших последовательностей генов 16S рРНК в GenBank с настройками по умолчанию.

*Получение чистых метанотрофных культур
и устойчивых парных ассоциаций
“метанотроф-неметанотроф”*

Чистые метанотрофные, а также совмещенные попарно по принципу “метанотроф-неметанотроф” культуры высевали и поддерживали в колбах со стерильной минеральной средой NMS с калий-фосфатным буфером (рН 6.8). С целью получения стабильной метанотрофной ассоциации культивирование проводили в течение пяти пересевов. Каждый пассаж занимал пять сут. Обновление метановоздушной среды осуществляли каждые 24 ч. По окончании процесса культуральную жидкость исследовали при помощи светопольной микроскопии на микроскопе Микромед 1 (2-20 inf.) (“Микромед”, Россия) для анализа морфологии клеток и оценки разнообразия сообществ. В дальнейшем использовали только те парные сообщества, которые по результатам проведенных пассажей сохранили исходную структуру “метанотроф-неметанотроф” без вымывания микроорганизма-спутника.

*Культивирование парных ассоциаций
“метанотроф-неметанотроф”*

Чистые метанотрофные культуры, а также парные метанооксиляющие сообщества с целью сравнения роста и продуктивности культивировали в 12-луночных планшетах. В лунку планшета вносили 0.3 мл клеточной суспензии, полученной из колб, содержащих чистые метанотрофные бактерии или устойчивые ассоциации, с добавлением 2.7 мл стерильной минеральной среды NMS. Планшеты помещали в эксикатор, в который закачивали метан (30% об.). Газовоздушную среду в эксикаторе обновляли каждые 24 ч. Культивирование проводили в течение 12, 24, 48, 72, 96 и 120 ч в 3-х повторностях с определением оптической плотности в начале процесса для дальнейшего нормирования результатов.

*Оценка влияния неметанотрофных бактерий
на рост метанотрофного сообщества*

По окончании культивирования измеряли оптическую плотность при 600 нм (OP_{600}) суспензии в лунках культуральных планшетов на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ “Спектр”, Россия). Из-за доминирования метанотрофного микроорганизма в сообществе, а также на основании большего коэффициента поглощения для метанотрофных бактерий (ввиду их меньшего размера по сравнению со спутниками) сравнение оптических плотностей для разных парных ассоциаций считали правомерным. Проводили сопоставление значений оптической плотности для чистых и парных культур при одинаковом времени культивирования, из чего делался вывод о позитивном,

негативном или нейтральном влиянии неметанотрофного спутника на рост доминантного метанотрофа.

*Определение доли метанотрофной
и неметанотрофной культуры в процессе
культивирования сообщества*

Соотношение метанотрофного и неметанотрофного микроорганизмов, а также общее число клеток подсчитывали по фотографиям фиксированных и окрашенных фуксином препаратов, полученных с использованием микроскопа Микромед 1 (2–20 inf.) (“Микромед”). Благодаря морфологической различимости культур по форме и размеру клеток, составляющих сообщества, осуществляли подсчет соотношения метанотрофной и неметанотрофной культуры по окончании культивирования для каждой лунки планшетов.

*Оценка содержания белков
в бактериальной биомассе*

Содержание истинного и сырого протеина в биомассе определяли методом Лоури на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ “Спектр”) при 750 нм и методом Кьельдаля соответственно [47, 48]. С этой целью суспензию из колб, отобранную на этапе последнего посева перед этапом постановки эксперимента по культивированию парных ассоциаций, центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. В осажденной биомассе определяли долю сухих веществ и белка в соответствии с методиками. По полученным данным сравнивали содержание белка в биомассе чистой и смешанной метанотрофной культуры.

*Оценка стабильности роста
чистых метанотрофных культур
и метанотрофных сообществ*

Для оценки вклада неметанотрофных культур в стабильность метанооксиляющего сообщества при воздействии ингибирующих веществ была определена ингибирующая концентрация метанола в среде. Эксперимент проводили идентично культивированию в 12-луночном культуральном планшете (Nunc, Дания), но с добавлением метанола в среду в концентрации 2 мл/л, достаточной для подавления роста метанотрофных культур (было определено ранее для исследуемых микроорганизмов).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Состав обогащенных метанотрофных сообществ

Анализ последовательности на основе гена 16S рРНК позволил идентифицировать в составе обогащенных сообществ два метанотрофа: *Methylocystis parvus*, а также представителя р. *Methylosinus*

Таблица 1. Бактериальные неметанотрофные штаммы, идентифицированные в сообществе
Table 1. Bacterial non-methanotrophic strains identified in the community

Наименование	Класс	Ближайший родственник ^b (номер доступа GenBank)	Сходство, %
M1	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylosinus</i> sp. (M95664.1)	98
M2	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylocystis parvus</i> (AF150805.1)	99
C1	<i>Bacillales</i>	<i>Brevibacillus brevis</i> (KM191287.1)	100
C2	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i> (KP192771.1)	98
C3	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Cupriavidus necator</i> (KY010325.1)	100
C4	<i>Actinomycetes</i>	<i>Leifsonia</i> sp. (JQ806438.1)	99
C5	<i>Bacillales</i>	<i>Cohnella</i> sp. (OP288081.1)	97
C6	<i>Actinomycetes</i>	<i>Nocardia farcinica</i> (KC113169.1)	99
C7 ^a	<i>Gamma proteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (JQ897943.1)	97

Примечание: ^a Не изолирован.

^b Ближайшие родственники и сходства основаны на последовательностях генов 16S рРНК.

Note: ^a Not isolated.

^b Closest relatives and similarities are based on 16S rRNA gene sequences.

(по одному из каждого сообщества) и 7 гетеротрофных бактерий (представители классов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gamma proteobacteria*, *Bacillales* и *Actinomycetes*) (табл. 1). Шесть из этих семи гетеротрофных штаммов были выделены в чистом виде (табл. 1). Среди бактерий,

идентифицированных в составе сообщества, не удалось выделить *Stenotrophomonas maltophilia*.

*Получение устойчивых парных ассоциаций
 “метанотроф-неметанотроф”*

В результате выделения устойчивых парных ассоциаций были получены бинарные культуры для каждого метанотрофа только с четырьмя идентифицированными микроорганизмами: *B. brevis*, *A. lipoferum*, *C. necator* и *N. farcinica*. Бактерии *Leifsonia* sp. и *Cohnella* sp. оказались неспособны образовывать устойчивые консорциумы с выбранными метанотрофами и отсутствовали в культуральной жидкости после 3 и 4 пассажа соответственно.

*Влияние неметанотрофа на рост
 метанооксиляющего микроорганизма*

Полученная кривая роста (рис. 1) демонстрирует, что по сравнению с чистыми метанотрофными культурами консорциумы р. *Methylocystis* и р. *Methylosinus* с *B. brevis* и *C. necator* способствуют более интенсивному увеличению оптической плотности на всем временном диапазоне культивирования. В случае ассоциации с *A. lipoferum* преобладание над чистой культурой проявилось только в стационарную фазу роста (рис. 1).

Значимое влияние на рост сообщества с *M. parvus* оказала бактерия *B. brevis*, (рис. 2), при этом рост *C. necator* в ассоциации с *M. parvus* не отличался от роста чистого метанооксиляющего микроорганиз-

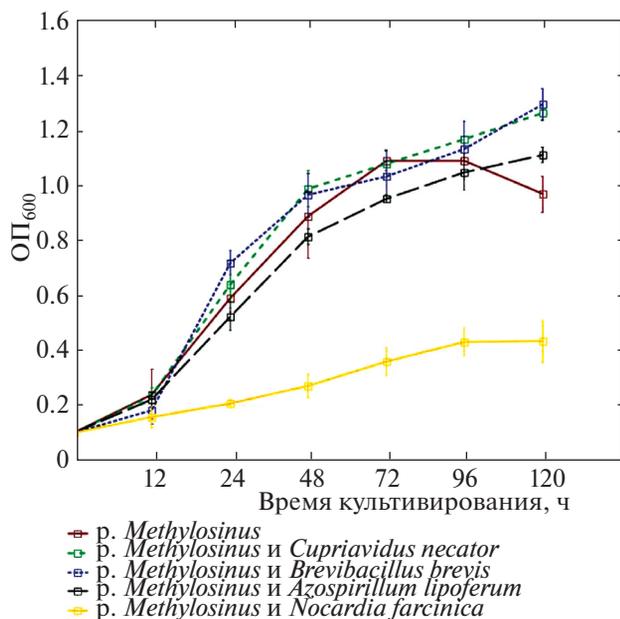


Рис. 1. Влияние неметанотрофов на рост метанотрофной культуры р. *Methylosinus*.

Fig. 1. Effect of non-methanotrophs on the growth of a methanotrophic culture of *Methylosinus* sp.

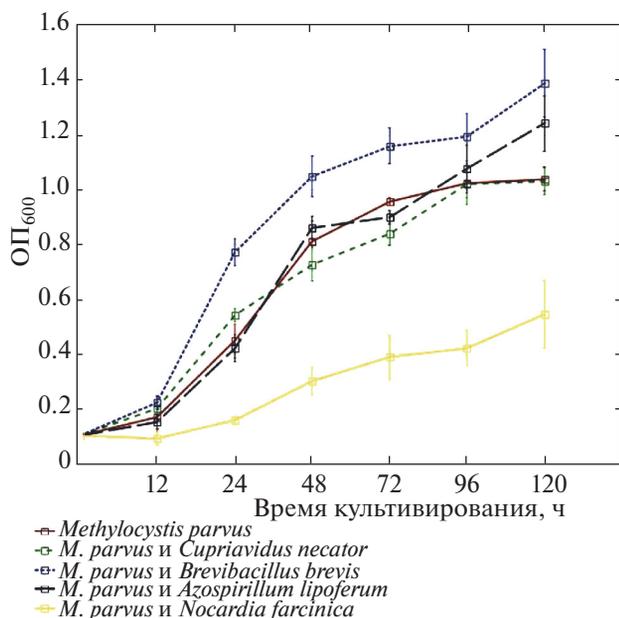


Рис. 2. Влияние неметанотрофов на рост метанотрофной культуры *Methylocystis parvus*.

Fig. 2. Effect of non-methanotrophs on the growth of the methanotrophic culture of *Methylocystis parvus*.

ма, а различия с ассоциацией с *A. lipoferum* отмечаются только на заключительных часах культивирования (рис. 2). Отдельно выделяется заметное снижение роста обеих метанотрофных ассоциаций в присутствии культуры актиномицетов *N. farcinica* (рис. 1, 2). Стоит отметить, что на заключитель-

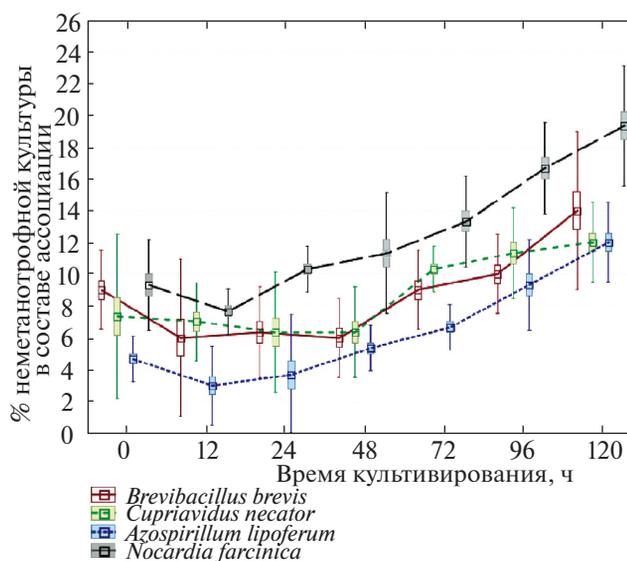


Рис. 3. Доля неметанотрофов при росте в ассоциации с культурой р. *Methylosinus*.

Fig. 3. Proportion of non-methanotrophs during growth in association with *Methylosinus* sp.

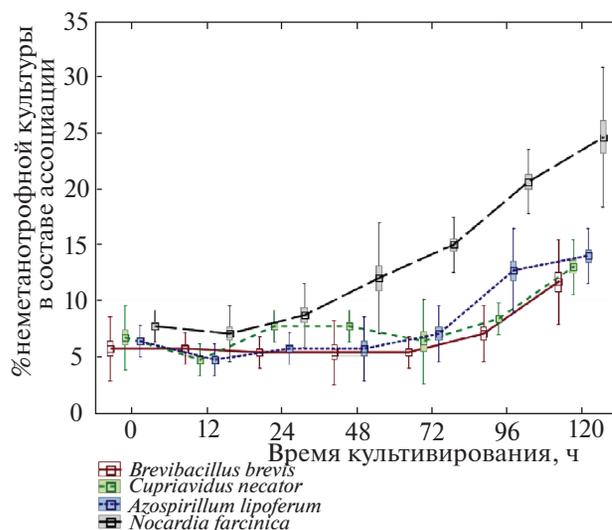


Рис. 4. Доля неметанотрофов при росте в ассоциации с культурой *Methylocystis parvus*.

Fig. 4. Proportion of non-methanotrophs during growth in association with *Methylocystis parvus*.

ном этапе периодического культивирования (96 и 120 ч ведения процесса) метанооксиляющие микроорганизмы в составе парных ассоциаций (за исключением пары *Methylosinus* sp. — *Nocardia farcinica*) продолжали свой рост. При этом в лунках с чистыми метанотрофными культурами наступление стационарной фазы было зафиксировано уже на 72–96 часу процесса.

Изменение количества микроорганизмов-спутников в составе ассоциаций

Количественное соотношение метанотрофов и неметанотрофных спутников в сообществе продемонстрировало единую тенденцию по увеличению численности гетеротрофных культур в конце экспоненциальной и в стационарной фазе роста метанотрофного сообщества (рис. 3, 4). Тем не менее для различных парных сочетаний культур анализируемое соотношение изменялось неодинаково и в значительной мере зависело от неметанотрофного микроорганизма (рис. 3, 4). Значительный рост доли неметанотрофов *B. brevis*, *C. necator* и *A. lipoferum* наблюдался только на 96 и 120 часы культивирования, но не превышал в итоге 15% для обоих анализируемых метанотрофов. При этом количественное соотношение к метанотрофной культуре при культивировании актиномицетов *Nocardia farcinica* изменялось в течение всего времени инкубирования в пользу микроорганизма-спутника и достигало 18 и 25% соответственно для анализируемых парных ассоциаций в конце процесса.

Таблица 2. Содержание белка в чистых культурах и парных сообществах
Table 2. Protein content in pure cultures and binary communities

Метанотрофная культура	Микроорганизм-спутник	Доля истинного протеина (по Лоури), %	Доля сырого протеина (по Кьельдалю), %
<i>Methylosinus</i> sp.	—	48.19 ± 2.78	59.60 ± 2.16
	<i>Brevibacillus brevis</i>	47.58 ± 2.68	58.44 ± 0.77
	<i>Cupriavidus necator</i>	57.93 ± 1.37	69.0 ± 1.91
	<i>Azospirillum lipoferum</i>	48.36 ± 0.40	59.48 ± 3.01
	<i>Nocardia farcinica</i>	49.09 ± 1.29	60.30 ± 2.04
<i>Methylocystis parvus</i>	—	46.45 ± 2.46	58.73 ± 0.70
	<i>Brevibacillus brevis</i>	45.01 ± 1.76	56.95 ± 2.19
	<i>Cupriavidus necator</i>	52.48 ± 1.59	63.66 ± 2.53
	<i>Azospirillum lipoferum</i>	43.88 ± 1.19	51.37 ± 0.67
	<i>Nocardia farcinica</i>	42.29 ± 1.24	53.50 ± 1.71

Определение содержания белка в бактериальной биомассе

При анализе состава микробной биомассы чистых метанотрофных культур и парных сообществ наибольшее содержание белка было достигнуто при культивировании метанотрофов совместно с *C. necator* (табл. 2). Создание парных сообществ с данным спутником позволило увеличить долю белков на 7–10%. В сочетании с остальными исследуемыми культурами состав биомассы по доле белковых веществ значимо не отличается от результатов по получению чистых культур. Доля истинного белка в бактериях р. *Methylosinus* и *M. parvus* составляла 48.19 ± 2.78% и 46.45 ± 2.46% соответственно. Разница между истинным и сырым протеином составляла от 10 до 15% для всех анализируемых образцов бактериальной биомассы.

Стабильность роста сообществ в присутствии метанола как ингибирующего агента

Анализ кривых роста чистых метанотрофных культур в присутствии 2 мл/л метанола в минеральной среде продемонстрировал значительное угнетение доминантных метаноксиляющих микроорганизмов по сравнению с культивированием на метане. Был обнаружен рост устойчивости сконструированных сообществ с *A. lipoferum* (в значительной степени) и *B. brevis* (незначительно) по сравнению с чистыми метанотрофными культурами. С другой стороны, наличие таких гетеротрофов как *C. necator* и *N. farcinica* в процессе культивирования не способствовало повышению устойчивости ассоциации при анализируемой концентрации метанола и, как в случае инкубирования чистых метанотрофов, к 120 ч ведения периодического процесса значимого роста опти-

ческой плотности культуральной жидкости не наблюдали (рис. 5, 6).

В ходе исследования была установлена значимая интенсификация роста метанотрофных культур р. *Methylosinus* и *M. parvus* в присутствии бактерий *B. brevis*. При этом увеличение оптической плотности, а следовательно повышение концентрации клеток в суспензии не объясняется только ростом доли микроорганизма-спутника в составе ассоциации, о чем также свидетельствует подсчет клеток методом микроскопии. На данный момент существуют упоминания о тесной связи метанотрофа *Methylococcus capsulatus* с *Brevibacillus brevis* в составе метаноксиляющего сообщества, в котором данная термотолерантная бактерия рассматривается как необходимый компонент для устойчивого процесса культивирования [49]. Исходя из этого утверждения, можно предположить, что бактерии р. *Brevibacillus* играют важную роль в поддержании активного роста и для исследуемых в нашей работе ассоциаций. Данное явление может быть объяснено установленной способностью р. *Brevibacillus* расти на широком спектре субстратов, таких как формальдегид, соли органических кислот (в том числе ацетат) и аминокислоты [49–51]. Также упоминается о способности этих микроорганизмов разрушать большинство органических соединений и даже ДНК, которая появляется в культуральной жидкости в ходе лизиса клеток основной метанотрофной культуры [50].

Таким образом, стабильный рост *B. brevis* в составе метанотрофной ассоциации обусловлен поступлением двух источников углеродного субстрата в питательную среду: за счет возможного выделения метанотрофами продуктов окисления метана (в случае формальдегида), и в результате потребления продуктов лизиса биомассы. Второй

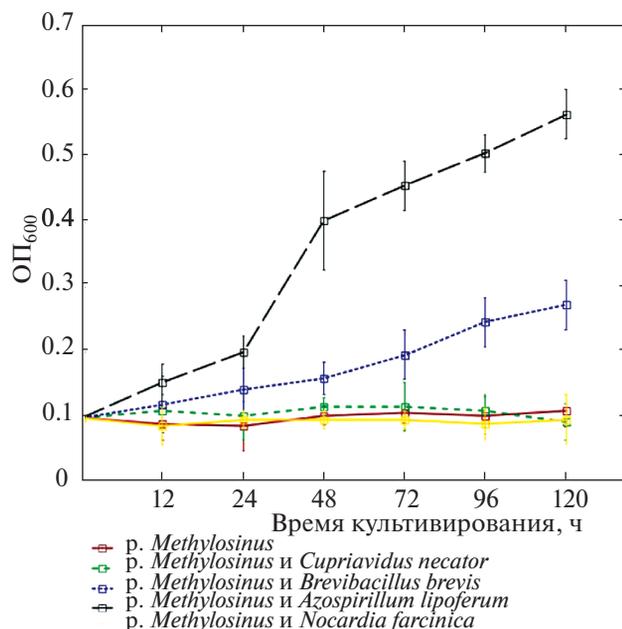


Рис. 5. Влияние неметанотрофов на рост метанотрофной культуры р. *Methylosinus* в присутствии 2 мл/л метанола.

Fig. 5. Effect of non-methanotrophs on the growth of a methanotrophic culture *Methylosinus* sp. in the presence of 2 mL/L methanol.

вариант также подтверждается увеличением доли гетеротрофных бактерий на заключительной (стационарной) фазе роста периодической культуры, для которой литические процессы протекают с наибольшей интенсивностью. В обоих случаях, бактерии р. *Brevibacillus* снижают содержание в среде продуктов, имеющих ингибирующее воздействие на рост метанотрофной культуры.

Несколько иной вклад в рост метанотрофного сообщества наблюдается в случае *A. lipoferum*. Значительное увеличение оптической плотности в сравнении с ростом чистой культуры наблюдается только на заключительном этапе культивирования. Тем не менее, стабильность содержания данного микроорганизма в течение всего времени периодического процесса свидетельствует о способности культуры потреблять метаболиты и продукты, образующиеся в результате разрушения мертвых метанотрофных клеток. Этот вывод согласуется с данными о способности бактерий р. *Azospirillum* расти на солях различных органических кислот (ацетат, лактат, малат, фумарат и сукцинат), а также продуктах окисления метана, таких как метанол, формиат и формальдегид [49, 50]. О возможности потреблять метанол в качестве единственного источника углерода также свидетельствуют результаты культивирования парного метанотрофного сообщества в присутствии 2 мл/л метанола. Таким образом, из рассматриваемых

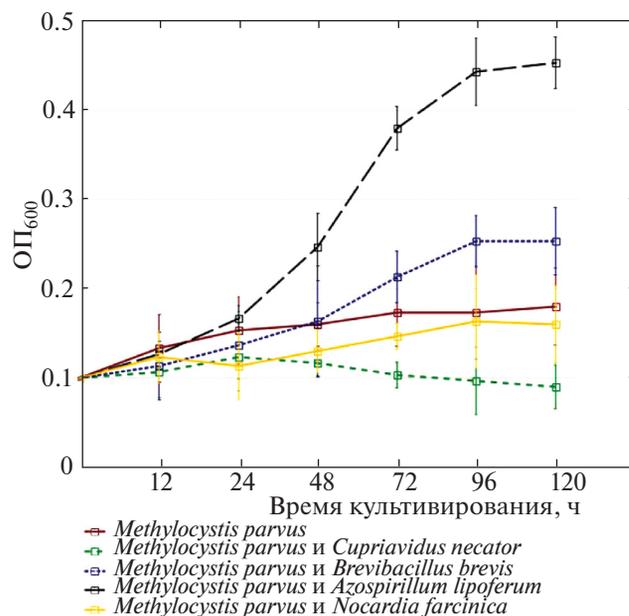


Рис. 6. Влияние неметанотрофов на рост метанотрофной культуры *Methylocystis parvus* в присутствии 2 мл/л метанола.

Fig. 6. Effect of non-methanotrophs on the growth of a methanotrophic culture *Methylocystis parvus* in the presence of 2 mL/L methanol.

спутников только *A. lipoferum* способен в значительной мере снижать ингибирующее влияние метанола в процессе культивирования смешанных метанотрофных сообществ.

Установлено, что *Cupriavidus necator* способен расти на средах, содержащих широкий спектр органических кислот и ароматических соединений [53]. Отдельно стоит выделить высокую активность формиатдегидрогеназы у данного микроорганизма, что позволяет эффективно усваивать формиат, который может высвобождаться из метанотрофных клеток в ходе литических процессов [54]. Однако, однозначно определить положительный вклад *C. necator* в рост метанотрофной культуры нельзя из-за различного эффекта на культуры р. *Methylosinus* и р. *Methylocystis*. Также способность *C. necator* к хемолитоавтотрофии затрудняет принципиальную оценку необходимости метанотрофной культуры для его возможного роста [55]. Полученные данные позволяют сделать вывод, что парные ассоциации метанотрофов с *C. necator* являются устойчивыми по видовому соотношению и не приводят к антагонистическим отношениям. Взаимосвязи исследуемых микроорганизмов в сообществе могут быть рассмотрены в дальнейших исследованиях на основании таких критериев, как скорость окисления метана метанотрофной культурой, активность метанмонооксигеназы, а также определение роли *C. necator* в процессах по-

требления веществ, выделяемых метанотрофными бактериями в ходе окисления C_1 -соединений, а также высвобождающихся из клеток в процессах лизиса.

Увеличение содержания белковых веществ в биомассе наблюдалось при совместном культивировании метанотрофов с *C. necator*. Данный факт объясняется тем, что этот микроорганизм способен к миксотрофии и, следовательно, способен не зависеть только от роста и метаболизма доминантного метанотрофа. С учетом установленного высокого значения белка, который способен накапливать *C. necator*, применение данной культуры в условиях нестабильного процесса культивирования сохранять интенсивность роста метанооксиляющего сообщества на повышенном уровне [56].

Присутствие актиномицета *N. farcinica* в ассоциации подавляет рост метанотрофного микроорганизма. На данный момент неизвестны причины обнаруженных антагонистических отношений, вероятно, они связаны с выделением *N. farcinica* в культуральную среду антибиотических соединений, подавляющих рост метанотрофных микроорганизмов. Учитывая наибольшую долю данного спутника из всех рассмотренных в данном исследовании, а также способность *N. farcinica* расти на различных субстратах, включающих в том числе формальдегид и формиат, можно сделать вывод, что данный организм способствует разрушению клеток доминантной метанотрофной культуры и использует высвободившиеся соединения для собственного роста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Симбиотические связи между метанотрофными бактериями и неметанотрофными спутниками, существующими в рамках одного сообщества, могут применяться для создания синтетических метанооксиляющих ассоциаций с целью интенсификации роста целевой культуры с дальнейшим получением различных биологически активных соединений.

Культивирование в периодических условиях парных ассоциаций метанотрофов р. *Methylosinus* и р. *Methylocystis* с рядом неметанотрофных бактерий-спутников продемонстрировало как положительный, так и отрицательный вклад в скорость роста доминантной культуры. Наибольший вклад в интенсификацию роста обоих метанотрофов наблюдали при использовании *B. brevis* в качестве микроорганизма-спутника. Также установлено, что наличие таких бактерий как *B. brevis*, *C. necator* и *A. lipoferum* позволяет продлить логарифмическую фазу роста метанотрофов.

Вероятно, положительный вклад спутников обусловлен их способностью потреблять продукты, образующиеся в результате процессов мета-

болизма и лизиса метанооксиляющих бактерий, тем самым уменьшая концентрацию в среде таких ингибирующих рост соединений, как метанол и формальдегид.

На примере добавления метанола в процессе периодического культивирования было установлено значительное снижение его ингибирующего воздействия на сообщество при наличии в нем бактерий *B. brevis* и *A. lipoferum* благодаря способности этих микроорганизмов потреблять метанол или же участвовать в процессах соокисления.

Не наблюдали значимой разницы в содержании белка в биомассе, полученной в результате использования чистых культур и парных ассоциаций за исключением применения *C. necator*. Для парных ассоциаций с *C. necator* увеличение содержания белка в получаемой биомассе составило 7–10%, что объясняется высоким содержанием белковых веществ в самом неметанотрофном микроорганизме.

Установлено отрицательное влияние актиномицета *Nocardia farcinica* на рост культур р. *Methylosinus* и р. *Methylocystis*, что может быть объяснено выделением данной культурой в среду антибиотических веществ.

Таким образом, использование синтетических метанотрофных ассоциаций с добавлением в качестве неметанотрофных спутников бактерий *Brevibacillus brevis*, *Cupriavidus necator* и *Azospirillum lipoferum* способствует более эффективному и устойчивому ведению культивирования и может применяться также для непрерывных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matassa S., Boon N., Pikaar I., Verstraete W. Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint. *Microb. Biotechnol.*, 2016, 9(5), 568–575. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12369>
2. Valverde-Pérez B., Xing W., Zachariae A.A., Skadborg M.M., Kjeldgaard A.F., Palomo A., Smets B.F. Cultivation of methanotrophic bacteria in a novel bubble-free membrane bioreactor for microbial protein production. *Bioresour. Technol.*, 2020, 310, 123388. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123388>
3. Bratosin B. C., Darjan S., Vodnar D. C. Single cell protein: A potential substitute in human and animal nutrition. *Sustainability*, 2021, 13(16), 9284. <https://doi.org/10.3390/su13169284>
4. Сакаян Д.И., Русякова М.А., Каленов С.В., Хохлачев Н.С. Изучение очистки сточных вод процесса культивирования метанооксиляющих микроорганизмов гранулированным аэробным илом. *Бутлеровские сообщения*, 2024, 77(3), 99–112. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/24-77-3-99>
5. Guerrero-Cruz S., Vaksmaa A., Horn M.A., Niemann H., Pijuan M., Ho A. Methanotrophs: discoveries, environ-

- mental relevance, and a perspective on current and future applications. *Front. Microbiol.*, 2021, 12, 678057. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678057>
6. Strong P.J., Kalyuzhnaya M., Silverman J., Clarke W.P. A methanotroph-based biorefinery: potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation. *Bioresour. Technol.*, 2016, 215, 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.099>
 7. McDonald I.R., Bodrossy L., Chen Y., Murrell J.C. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74(5), 1305–1315. <https://doi.org/10.1128/AEM.02233-07>
 8. Gęsicka A., Oleskiewicz-Popiel P., Łężyk M. Recent trends in methane to bioproduct conversion by methanotrophs. *Biotechnol. Adv.*, 2021, 53, 107861. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107861>
 9. Kalyuzhnaya M.G., Puri A. W., Lidstrom M.E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. *Metab. Eng.*, 2015, 29, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.010>
 10. Hombegowda G.P., Suresh B.N., Shivakumar M.C., Ravikumar P., Girish B.C., Rudrappa S.M., Indresh H.C. Growth performance, carcass traits and gut health of broiler chickens fed diets incorporated with single cell protein. *Anim. Biosci.*, 2021, 34(12), 1951. <https://doi.org/10.5713/ab.20.0844>
 11. Salazar-López N.J., Barco-Mendoza G.A., Zuñiga-Martínez B.S., Domínguez-Avila J.A., Robles-Sánchez R.M., Ochoa M.A.V., González-Aguilar G.A. Single-cell protein production as a strategy to reincorporate food waste and agro by-products back into the processing chain. *Bioeng.*, 2022, 9(11), 623. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9110623>
 12. Sharif M., Zafar M.H., Aqib A.I., Saeed M., Farag M.R., Alagawany M. Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition. *Aquac.*, 2021, 531, 735885. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735885>
 13. Skrede A., Berge G.M., Storebakken T., Herstad O., Aarstad K.G., Sundstøl F. Digestibility of bacterial protein grown on natural gas in mink, pigs, chicken and Atlantic salmon. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1998, 76(1–2), 103–116. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00208-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00208-9)
 14. Pereira A.G., Fraga-Corral M., Garcia-Oliveira P., Otero P., Soria-Lopez A., Cassani L., Simal-Gandara J. Single-cell proteins obtained by circular economy intended as a feed ingredient in aquaculture. *Foods*, 2022, 11(18), 2831. <https://doi.org/10.3390/foods11182831>
 15. Yu Z., Groom J., Zheng Y., Chistoserdova L., Huang J. Synthetic methane-consuming communities from a natural lake sediment. *MBio*, 2019, 10(4). <https://doi.org/10.1128/mbio.01072-19>
 16. Yu Z., Chistoserdova L. Communal metabolism of methane and the rare earth element switch. *J. Bacteriol.*, 2017, 199(22). <https://doi.org/10.1128/jb.00328-17>
 17. Areniello M., Matassa S., Esposito G., Lens P.N. Bio-waste upcycling into second-generation microbial protein through mixed-culture fermentation. *Trends Biotechnol.*, 2023, 41(2), 197–213. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.07.008>
 18. 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, 11(9), 2257. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092257>
 19. Yu Z., Beck D.A., Chistoserdova L. Natural selection in synthetic communities highlights the roles of *Methylococcaceae* and *Methylophilaceae* and suggests differential roles for alternative methanol dehydrogenases in methane consumption. *Front. Microbiol.*, 2017, 8, 2392. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02392>
 20. Ho A., Mendes L.W., Lee H.J., Kaupper T., Mo Y., Pöhllein, A., Horn M.A. Response of a methane-driven interaction network to stressor intensification. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2020, 96(10), fiae180. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae180>
 21. Reddy K.R., Rai R.K., Green S.J., Chetri J.K. Effect of pH on methane oxidation and community composition in landfill cover soil. *J. Environ. Eng.*, 2020, 146(6). [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001712](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001712)
 22. Pérez R., Cantera S., Bordel S., García-Encina P.A., Muñoz R. The effect of temperature during culture enrichment on methanotrophic polyhydroxyalkanoate production. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2019, 140, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.04.004>
 23. Chidambarampadmavathy K., Karthikeyan O.P., Huerlimann R., Maes G.E., Heimann K. Responses of mixed methanotrophic consortia to variable Cu²⁺/Fe²⁺ ratios. *J. Environ. Manag.*, 2017, 197, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.03.063>
 24. Ho A., Frenzel P. Heat stress and methane-oxidizing bacteria: effects on activity and population dynamics. *Soil Biol. Biochem.*, 2012, 50, 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.02.023>
 25. Costa C., Vecherskaya M., Dijkema C., Stams A.J.M. The effect of oxygen on methanol oxidation by an obligate methanotrophic bacterium studied by in vivo ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 26(1–2), 9–14. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000075>
 26. Krause S.M., Johnson T., Samadhi Karunaratne Y., Fu Y., Beck D.A., Chistoserdova L., Lidstrom M.E. Lanthanide-dependent cross-feeding of methane-derived carbon is linked by microbial community interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, 114(2), 358–363. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619871114>
 27. Stock M., Hoefman S., Kerckhof F.M., Boon N., De Vos P., De Baets B., Waegeman W. Exploration and prediction of interactions between methanotrophs and hetero-

- trophs. *Res. Microbiol.*, 2013, 164(10), 1045–1054.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.08.006>
28. Zhu J., Xu X., Yuan M., Wu H., Ma Z., Wu W. Optimum O₂: CH₄ ratio promotes the synergy between aerobic methanotrophs and denitrifiers to enhance nitrogen removal. *Front. Microbiol.*, 2017, 8, 1112.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01112>
 29. Veraart A.J., Garbeva P., Van Beersum F., Ho A., Hordijk C.A., Meima-Franke M., Bodelier P.L.E. Living apart together—bacterial volatiles influence methanotrophic growth and activity. *ISME J.*, 2018, 12(4), 1163–1166.
<https://doi.org/10.1038/s41396-018-0055-7>
 30. Iguchi H., Yurimoto H., Sakai Y. Interactions of methylotrophs with plants and other heterotrophic bacteria. *Microorganisms*, 2015, 3(2), 137–151.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms3020137>
 31. Minamisawa K., Imaizumi-Anraku H., Bao Z., Shinoda R., Okubo T., Ikeda S. Are symbiotic methanotrophs key microbes for N acquisition in paddy rice root?. *Microbes Environ.*, 2016, 31(1), 4–10.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME15180>
 32. Kerckhof F. M., Sakarika M., Van Giel M., Muys M., Vermeir P., De Vrieze J., Boon N. From biogas and hydrogen to microbial protein through co-cultivation of methane and hydrogen oxidizing bacteria. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2021, 9, 733753.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.733753>
 33. Areniello M., Matassa S., Esposito G., Lens P.N. Microbial protein production from sulfide-rich biogas through an enrichment of methane- and sulfur-oxidizing bacteria. *Bioresour. Technol.*, 2023, 383, 129237.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129237>
 34. Levine U.Y., Teal T.K., Robertson G.P., Schmidt T.M. Agriculture's impact on microbial diversity and associated fluxes of carbon dioxide and methane. *ISME J.*, 2011, 5(10), 1683–1691.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2011.40>
 35. Becker J., Eisenhauer N., Scheu S., Jousset A. Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity. *Ecol. Lett.*, 2012, 15(5), 468–474.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01759.x>
 36. Schnyder E., Bodelier P.L., Hartmann M., Henneberger R., Niklaus P.A. Positive diversity-functioning relationships in model communities of methanotrophic bacteria. *Ecology*, 2018, 99(3), 714–723.
<https://doi.org/10.1002/ecy.2138>
 37. Cardinale B.J., Matulich K.L., Hooper D.U., Byrnes J.E., Duffy E., Gamfeldt, L., Gonzalez A. The functional role of producer diversity in ecosystems. *Am. J. Bot.*, 2011, 98(3), 572–592.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1000364>
 38. Guo B., He X., Ge C., Xue M., Wang J., Longshaw M., Liang X. A natural gas fermentation bacterial meal (FeedKind®) as a functional alternative ingredient for fishmeal in diet of largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Antioxidants*, 2022, 11(8), 1479.
<https://doi.org/10.3390/antiox11081479>
 39. Jintasataporn O., Chumkam S., Triwatanon S., LeBlanc A., Sawanboonchun J. Effects of a single cell protein (*Methylococcus capsulatus*, Bath) in Pacific White Shrimp (*Penaeus vannamei*) diet on growth performance, survival rate and resistance to *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Front. Mar. Sci.*, 2021, 8, 764042.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2021.764042>
 40. Dunfield P.F., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Dedysh S.N. *Methylocella silvestris* sp. nov., a novel methanotroph isolated from an acidic forest cambisol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, 53(5), 1231–1239.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02481-0>
 41. Green J., Dalton H. Substrate specificity of soluble methane monooxygenase: mechanistic implications. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264(30), 17698–17703.
 42. Massa S., Caruso M., Trovatelli F., Tosques M. Comparison of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 14, 727–730.
<https://doi.org/10.1023/A:1008893627877>
 43. Kızılkaya R. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecol. Eng.*, 2008, 33(2), 150–156.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.02.011>
 44. Diestra E., Esteve I., Burnat M., Maldonado J., Solé A. Isolation and characterization of a heterotrophic bacterium able to grow in different environmental stress conditions, including crude oil and heavy metals. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A. Mendoz-Vilas ed., Badajoz, Spain. 2007, 1, 90–99.
 45. George I.F., Liles M.R., Hartmann M., Ludwig W., Goodman R.M., Agathos S.N. Changes in soil *Acidobacteria* communities after 2, 4, 6-trinitrotoluene contamination. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, 296(2), 159–166.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01632.x>
 46. Ma L., Cao Y.H., Cheng M.H., Huang Y., Mo M.H., Wang Y., Yang F.X. Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103, 299–312.
<https://doi.org/10.1007/s10482-012-9810-3>
 47. Геворгуз Р.Г., Железнова С.Н., Нехорошев М.В. Количественное определение массовой доли суммарных белков в воздушно-сухой биомассе микродорослей методом Лоури: учебное пособие, 2017.
 48. Helrich K. Association of official analytical chemists. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 1990, 15, 70–74.
 49. Oshkin I.Y., Belova S.E., Khokhlachev N.S., Semanova V.A., Chervyakova O.P., Chernushkin D.V., Dedysh S.N. Molecular analysis of the microbial community developing in continuous culture of *Methylococcus* sp. con-

- cept-8 on natural gas. *Microbiology*, 2020, 89, 551–559. <https://doi.org/10.1134/S0026261720050173>
50. 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 59, 33–39. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0964-1>
51. Nian H., Meng Q., Zhang W., Chen L. Overexpression of the formaldehyde dehydrogenase gene from *Brevibacillus brevis* to enhance formaldehyde tolerance and detoxification of tobacco. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, 169, 170–180. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9957-4>
52. Orlova M.V., Tarlachkov S.V., Dubinina G.A., Belousova E.V., Tutukina M.N., Grabovich, M.Y. Genomic insights into metabolic versatility of a lithotrophic sulfur-oxidizing diazotrophic *Alphaproteobacterium Azospirillum thiophilum*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2016, 92(12), fiw199. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw199>
53. Wierckx N., Koopman F., Bandounas L., De Winde J.H., Ruijsenaars H.J. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. *Microb. Biotechnol.*, 2010, 3(3), 336–343. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00158.x>
54. Collas F., Dronsella B.B., Kubis A., Schann K., Binder S., Arto N., Orsi, E. Engineering the biological conversion of formate into crotonate in *Cupriavidus necator*. *Metab. Eng.*, 2023, 79, 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2023.06.015>
55. Janasch M., Crang N., Asplund-Samuelsson J., Sporre E., Bruch M., Gynnå A., Hudson E.P. Thermodynamic limitations of PHB production from formate and fructose in *Cupriavidus necator*. *Metab. Eng.*, 2022, 73, 256–269. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2022.08.005>
56. Chee J.Y., Lakshmanan M., Jeepery I.F., Hairudin N.H.M., Sudesh K. The potential application of *Cupriavidus necator* as polyhydroxyalkanoates producer and single cell protein: A review on scientific, cultural and religious perspectives. *Appl. Food Biotechnol.*, 2019, 6(1), 19–34. <https://doi.org/10.22037/afb.v6i1.22234>

Investigation of the Role of Satellite Microorganisms in the Functioning of Methanotrophic Communities

A. A. Sachavskii^a, M. V. Romanova^a, N. A. Suyasov^a,
A. S. Reshetova^a, A. D. Bezyaeva^a, and S. V. Kalenov^{a, #}

^aDepartment of Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Industrial Ecology,
Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, 12504 Russia

[#]e-mail: wsezart@yandex.ru

Abstract—The usage of synthetic methane-consuming communities is a promising direction for increasing efficacy of cultivation of methanotrophical bacteria. Non-methanotrophic satellites as a part of bacterial associations are able to utilize metabolic and lysis products that inhibit growth of dominant bacterial culture. This research allowed to determine positive effect of *Brevibacillus brevis* on biomass accumulation during co-cultivation with methanotrophic genus *Methylosinus* sp. and *Methylocystis* sp. It was also revealed that stationary phase occurs later for methane-consuming bacteria in association with *Brevibacillus brevis*, *Cupriavidus necator* and *Azospirillum lipoferum*. During cultivation of binary associates including *Azospirillum lipoferum* and *Brevibacillus brevis* increase in bacterial growth rate was found for selected methanotrophical bacteria in the presence of inhibitory methanol concentration. An increase in the proportion of protein was found in the biomass of binary associates with *Cupriavidus necator* as a satellite. It was shown that the actinobacteria *Nocardia farcinica* has a negative impact on growth rate of synthetic methane-consuming communities. Cultivation of methanotrophs with selected non-methanotrophic bacteria in synthetic microbial communities allows to intensify the growth of desired bacterial culture and potentially enhance cultivation productivity.

Keywords: methanotrophic microorganisms, SCP, satellite microorganisms, synthetic communities