

DOI: 10.12731/2658-6649-2022-14-6-107-121

УДК 579.64



ВЫДЕЛЕНИЕ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ ПРИРОДНЫХ БИОЦЕНОЗОВ И ПОДБОР ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ОПТИМАЛЬНЫХ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

О.В. Прокудина, Г.В. Песцов, А.В. Третьякова

Обоснование. Одна из самых актуальных проблем в мире – производство кормового белка. Мировой дефицит белка оценивается в 30 млн. т в год, для Российской Федерации оценивается в 2-2,5 млн. т белка в год.

Проблема дефицита белка может быть частично решена при помощи метанотрофных бактерий. При создании оптимальных условий метанотрофные бактерии способны активно окислять природный газ - метан и наращивать свою биомассу, богатую ценным белком, витаминами и другими биологически активными веществами. Кормовой продукт из метанотрофных бактерий сравним с рыбной мукой и соевым шротом, концентрация чистого белка в нем составляет более 80%.

Цель. Выделение метанотрофных бактерий из природных биоценозов и их культивирование на различных питательных средах в лабораторных условиях.

Материалы и методы. Исследование проводили с 2019 по 2022 год в микробиологической лаборатории центра технологического превосходства «Передовые химические и биотехнологии» Тульского государственного педагогического университета им. Л.Н. Толстого. Объектом исследования были метанотрофные бактерии, выделенные из различных естественных и искусственных экосистем, коллекционные штаммы *Methylococcus capsulatus* В-2990 и *Methylotheonas methanica* В-2110. Для выделения метанотрофных бактерий использовали метод посева накопительной культуры на твердую агаризированную стерильную питательную среду в чашки Петри. Для культивирования метанотрофов использовали питательные среды различного состава, содержащие все необходимые макро- и микроэлементы для нормального роста бактериальных колоний.

Результаты. Колонии метанотрофных бактерий были обнаружены в одной пробе донных отложений, взятой из сфагнового болота деревни Коча-

ки Тульской области и в пробах из метанреактора. В результате сравнения питательных сред для выделения и культивирования метанотрофов, было установлено, что наиболее подходящей средой для выделения метанотрофных бактерий является стандартная нитратная минеральная среда NMS. Для культивирования метанотрофных бактерий наилучшими средами являются: питательная среда с добавлением анаэробного ила, аммонийная минеральная питательная среда (AMS) и AMS с добавлением метанола, нитратная минеральная питательная среда №221 с добавлением метанола.

Заключение. Использование различных питательных сред для культивирования метанотрофных бактерий позволяет оценить влияние различных органических веществ на рост и развитие бактериальных колоний. Исследование различных естественных и искусственных экосистем позволяет расширить таксономические знания о данной группе микроорганизмов, а так же повысить потенциал использования метанотрофов в решении различных проблем экологии и биотехнологии.

Ключевые слова: метанотрофные бактерии; питательные среды; метанреактор; *Methylococcus capsulatus*; *Methylomonas methanica*

Для цитирования. Прокудина О.В., Песцов Г.В., Третьякова А.В. Выделение метанотрофных бактерий из природных биоценозов и подбор питательных сред, оптимальных для культивирования в лабораторных условиях // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. 2022. Т. 14, №6. С. 107-121. DOI: 10.12731/2658-6649-2022-14-6-107-121

ISOLATION OF METHANOTROPHIC BACTERIA FROM NATURAL BIOCENOSES AND SELECTION OF NUTRIENT MEDIA OPTIMAL FOR CULTIVATION IN LABORATORY CONDITIONS

O.V. Prokudina, G.V. Pestsov, A.V. Tretyakova

Background. One of the most pressing problems in the world is the production of food protein. The global protein deficit is estimated at 30 million tons per year; for the Russian Federation it is estimated at 2-2.5 million tons of protein per year.

The problem of protein deficit can be partially solved with the help of methanotrophic bacteria. Under optimal conditions, methanotrophic bacteria are able to oxidise actively natural gas – methane and increase their biomass, rich in valuable protein, vitamins and other biologically active substances. The feed product from

methanotrophic bacteria is comparable to fish meal and soybean meal, the concentration of pure protein in it is more than 80%.

Purpose. *Isolation of methanotrophic bacteria from natural biocenoses and their cultivation on various nutrient media in laboratory conditions.*

Materials and Methods. *The study was conducted from 2019 to 2022 in the microbiological laboratory of the Center for Technological Excellence “Advanced Chemical and Biotechnology” of the Tolstoy Tula State Pedagogical University. The object of the study was methanotrophic bacteria isolated from various natural and artificial ecosystems, collection strains of *Methylococcus capsulatus* B-2990 and *Methylomonas methanica* B-2110. To isolate methanotrophic bacteria, the method of seeding a accumulative culture on a solid agarized sterile nutrient medium in Petri dishes was used. For the cultivation of methanotrophs, nutrient media of various compositions containing all the necessary macro- and microelements for the normal growth of bacterial colonies were used.*

Results. *Colonies of methanotrophic bacteria were found in one sample of bottom sediments taken from the sphagnum swamp of the village of Kochaki in the Tula region and in samples from a methane reactor. As a result of comparison of nutrient media for isolation and cultivation of methanotrophs, it was found that the most suitable medium for isolation of methanotrophic bacteria is the standard nitrate mineral medium NMS. For the cultivation of methanotrophic bacteria, the best media were: the nutrient medium with the addition of anaerobic sludge, the ammonium mineral nutrient medium (AMS), and AMS with addition of methanol, the nutrient medium No.221 with addition of methanol.*

Conclusions. *The use of various nutrient media for the cultivation of methanotrophic bacteria makes it possible to assess the effect of various organic substances on the growth and development of bacterial colonies. The study of various natural and artificial ecosystems makes it possible to expand taxonomic knowledge about this group of microorganisms, as well as to increase the potential of using methanotrophs in solving various problems of ecology and biotechnology.*

Keywords: *methanotrophic bacteria; nutrient media; methane reactor; *Methylococcus capsulatus*; *Methylomonas methanica**

For citation. *Prokudina O.V., Pestsov G.V., Tretyakova A.V. Isolation of Methanotrophic Bacteria from Natural Biocenoses and Selection of Nutrient Media Optimal for Cultivation in Laboratory Conditions. Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture, 2022, vol. 14, no. 6, pp. 107-121. DOI: 10.12731/2658-6649-2022-14-6-107-121*

Кормовая база сейчас удовлетворяет потребность животноводства всего на 70-75%. Постоянный дефицит белка снижает качество продукции

и ведет к нерентабельному расходу кормов, удорожанию мяса, молока и других продуктов. С каждым годом спрос на кормовой белок для сельскохозяйственных животных будет расти и через 30 лет он увеличится уже на 15 млн. тонн [5]. На данный момент основными белковыми компонентами, входящими в состав кормов для сельскохозяйственных животных, являются соевый шрот, рыбная мука и сухое молоко. Соевый шрот содержит до 45% чистого белка, а сухое молоко и рыбная мука содержат до 40% протеинов. Кроме того, после использования рыбной муки в качестве белкового компонента для кормов, мясо животных приобретает характерный рыбный запах, что нежелательно при производстве продуктов питания [8].

Метанотрофные бактерии – это бактерии, которые способны активно расти и размножаться, используя в своём жизненном цикле метан [1,17]. Они играют важную роль в окислении метана в естественной среде. Данная группа микроорганизмов окисляет метан, который образуется геотермально, а так же в результате анаэробного метаболизма метаногенных бактерий, тем самым уменьшая выброс метана в атмосферу [14]. Ассимиляция углерода C1-соединений метанотрофами происходит в основном на уровне формальдегида и CO₂ [7, 9, 14]. Метанотрофы также могут окислять очень низкие концентрации метана (≈2 ppmv). Поэтому они являются ключевыми звеньями в глобальном цикле метана [16]. Метанотрофные бактерии широко распространены во всех биоценозах, но чаще всего встречаются в водных экосистемах, в донных отложениях которых происходит интенсивное бактериальное метанообразование, а также присутствуют минеральные источники питания, в том числе азот [15]. Экосистемами, где есть все необходимые элементы для роста и развития бактерий являются: пруды, озера, моря, различные почвы, болота, рисовые чеки, полигоны твердых бытовых отходов и другие [2]. В природе метанотрофные бактерии образуют симбиоз с бактериями, которые потребляют побочные продукты работы фермента метанмонооксигеназы. Таким образом, поддерживается стабильность сообщества, обеспечивается эффективное поглощение газообразного субстрата и исключается вероятность ингибирования продуктами метаболизма метанотрофов [3].

Природные экосистемы с низкими температурами занимают большую часть поверхности нашей планеты. В таких экосистемах обитают психрофильные виды метанотрофных бактерий. К ним относятся бактерии класса *Gammaproteobacteria*. Типовыми видами - психрофилами этого класса являются *Methylobacter psychrophilus*, *Methylosphaera hansonii*, *Methylomonas scandinavica*. Эти бактерии предпочитают расти при температурах ниже

15°C. Крупнейшими территориями, где преобладают низкие температуры являются обширные тундровые и северные болотные экосистемы, а также большая часть мирового океана [4, 2].

Помимо территорий с низкими температурами, так же встречаются места с высокими температурами (действующие вулканы, геотермальные источники, промышленные стоки, отходы сельского хозяйства), в них обитают сообщества термофильных и термотолерантных микроорганизмов. Преобладают в таких экосистемах метанотрофные бактерии родов: *Methylococcus*, *Methylocaldum* и *Methylothermus*, относящихся к подклассу *Proteobacteria*. [10, 20].

Метанотрофы - физиологическая группа бактерий, которые из-за своих трофических особенностей легко дифференцируются от других организмов. Но большинство характеристик указывает на существенные различия метанотрофов на уровне родов. облигатные метанотрофы были объединены в роды *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocella*, *Methylocapsa*, *Methyloferula*, *Methylocaldum*, *Methylogaea*, *Methylolalobius*, *Methylomarinum*, *Methylosarcina*, *Methylosoma*, *Methylosphaera*, *Methylovulum*, *Methylothermus*, *Methyloprofundus*, *Methyloglobulus*, *Methylomagnum*, *Methylomicrobium* и *Methylomarinovum* [4, 9]. Метанотрофные бактерии были объединены в 3 группы, на основании их различий в морфологии, ультраструктуре клеток и вариантах метаболических путей. К группе I были отнесены представители класса *Gamma*proteobacteria, родов *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylocaldum*, *Methylogaea*, *Methylolalobius*, *Methylomarinum*, *Methylosarcina*, *Methylosoma*, *Methylosphaera*, *Methylovulum*, *Methylothermus*, *Methyloprofundus*, *Methyloglobulus*, *Methylomagnum*, *Methylomicrobium* и *Methylomarinovum*. К группе X – бактерии класса *Gamma*proteobacteria, рода *Methylococcus*. Группе II – представители класса *Alphaproteobacteria*, родов *Methylosinus* и *Methylocystis*, *Methylocella*, *Methylocapsa*, *Methyloferula* [4, 1, 19].

В связи с особенностями метаболизма метанотрофные бактерии являются перспективными объектами биотехнологических исследований, так как они являются единственными биологическими окислителями метана. При подходящих условиях метанотрофы интенсивно поглощают метан и нарабатывают биомассу, которая обогащена белком, витаминами и другими биологически активными компонентами [3, 6].

Цель работы

Выделение метанотрофных бактерий из природных биоценозов и их

культивирование на различных питательных средах в лабораторных условиях.

Научная новизна

Одним из главных преимуществ метанотрофных бактерий является возможность их выращивания в нестерильных условиях. Из за особенных составов питательных сред и условий культивирования другие микроорганизмы не способны расти и развиваться вместе с ними [2, 17]. Для выращивания метанотрофных бактерий используют элективные среды, которые содержат только неорганические компоненты (макро- и микроэлементы). В качестве единственного источника углерода метанотрофные бактерии используют метан [13, 18]. Для стимуляции роста и интенсивной наработки биомассы допускается внесение некоторых органических компонентов в небольших количествах. Стимулируют метаноокисление и рост некоторых видов метанотрофных бактерий такие органические добавки как: дрожжевой экстракт, различные аминокислоты, метанол, раствор мальтозы [2, 3]. Так же возможно использование питательной среды, приготовленной на основе дистиллированной воды и анаэробного ила, который используется для биологической очистки сточных вод. Его преимущество в том, что он поддерживает приемлемые условия, близкие к естественным для метанотрофов.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили с 2019 по 2022 год в микробиологической лаборатории центра технологического превосходства «Передовые химические и биотехнологии» Тульского государственного педагогического университета им. Л.Н. Толстого. Объектом исследования были метанотрофные бактерии, выделенные из различных естественных и искусственных экосистем и чистые культуры штаммов *Methylococcus capsulatus* B-2990 и *Methylomonas methanica* B-2110 из Всероссийской коллекции микроорганизмов «Федерального исследовательского центра «Пушинский научный центр биологических исследований РАН». Выделение чистых культур метанотрофных бактерий проводили из естественных и искусственных экосистем. Для сравнения интенсивности роста метанотрофов и адаптации к экспериментальным питательным средам, использовали коллекционные штаммы метанотрофных бактерий. Выделение и культивирование данной группы бактерий выполняли по соответствующим методикам [2, 11, 12, 18].

Исследовали различные районы Тульской области. Объектами исследования являлись естественные и искусственные водные экосистемы: сфагновое болото в п. Кочаки Щекинского района, пруд в д. Мыза, пруд в п. Архангельское, пруд в Платоновском парке г. Тула, метанреактор Тульского Пивоваренного завода, филиала ООО «Пивоваренная компания «Балтика». Для выделения метанотрофных бактерий использовали нитратную минеральную среду NMS (Whittenbury, 1970) следующего состава: KNO_3 - 1,0 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,0 г/л; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 0,05 г/л; KH_2PO_4 - 0,05 г/л; CaCl_2 - 0,2 г/л, Трилон Б (Na_2EDTA) - 0,005 г/л, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,002 г/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 мг/л, CoCl_2 - 0,2 мг/л, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,03 мг/л, CuCl - 0,01 мг/л, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,02 мг/л, Na_2MoO_4 - 0,03 мг/л. В качестве единственного источника углерода для выделения метанотрофных бактерий использовали очищенный метан, полученный в лабораторных условиях. Для получения чистой культуры метанотрофов 5 г каждой пробы сначала помещали в колбу с 50 мл заранее простерилизованной питательной среды и инкубировали в течение 3-х недель в смеси воздуха и метана (1:1) при температуре 30°C, а затем методом истощающегося посева накопительную культуру инокулировали на твердую питательную среду в чашки Петри. Чашки помещали в стерильный вакуумный эксикатор, который заполняли смесью воздуха и метана (1:1).

Для дальнейшего культивирования метанотрофных бактерий использовали 3 основные питательные среды (NMS, AMS, среда №221), к ним добавляли экспериментальные органические добавки для изучения влияния органических веществ на скорость роста и адаптации бактерий к питательным средам и условиям культивирования. Так же использовали питательную среду, приготовленную на основе дистиллированной воды и анаэробного ила из метанректора Тульского Пивоваренного завода, филиала ООО «Пивоваренная компания «Балтика» (СИ). На 1 л дистиллированной воды добавляли 50 г анаэробного ила. Питательная среда NMS имеет следующий состав: KNO_3 - 1,0 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,0 г/л; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 0,05 г/л; KH_2PO_4 - 0,05 г/л; CaCl_2 - 0,2 г/л; Трилон Б (Na_2EDTA) - 0,005 г/л; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,002 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 мг/л; CoCl_2 - 0,2 мг/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,03 мг/л; CuCl - 0,01 мг/л; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,02 мг/л; Na_2MoO_4 - 0,03 мг/л.

Среда AMS (Whittenbury, 1970) со следующим составом: NH_4Cl - 0,5 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,0 г/л; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 0,05 г/л; KH_2PO_4 - 0,05 г/л; CaCl_2 - 0,2 г/л; Трилон Б (Na_2EDTA) - 0,005 г/л; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,002 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 мг/л; CoCl_2 - 0,2 мг/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,03 мг/л; CuCl - 0,01 мг/л; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,02 мг/л; Na_2MoO_4 - 0,03 мг/л.

Среду №221 из Всероссийской коллекции микроорганизмов «Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», использовали в качестве контроля: KNO_3 - 1,0 г/л; KH_2PO_4 - 0,7 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 г/л; CaCl_2 - 0,02 г/л; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 1,5 г/л; Трилон Б (Na_2EDTA) - 5,0 мг/л; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,0 мг/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 мг/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,03 мг/л; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 мг/л; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 мг/л; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,02 мг/л; Na_2MoO_4 - 0,03 мг/л. В качестве добавок использовали: раствор мальтозы (1мл/л), дрожжевой экстракт (0,1мл/л), раствор L-глутамина (0,1мл/л), раствор L-метионина (0,1мл/л), CH_3OH (0,5мл/л). Стерилизацию питательных сред проводили в автоклаве при 1,2 атм. в течение 45 мин.

Бактериальные колонии культивировали в пробирках на агаризованных питательных средах в газовой среде, содержащей смесь воздуха и метана в соотношении 1:1 при температуре 35°C.

Для проведения исследований использовали следующее оборудование: автоклав, микробиологический бокс, вакуумный эксикатор, термостат, стандартные инструменты и посуду, применяемые в микробиологических исследованиях.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведённой научно-исследовательской работы было установлено, что в одной из проб сфагнового болота в п. Кочаки и в пробах из метанреактора были обнаружены бактериальные колонии метанотрофных бактерий. Для исключения выделения микроорганизмов, которые окисляют другие органические соединения была использована нитратная минеральная питательная среда NMS для выделения метанотрофов. Специфика этой среды заключается в том, что она состоит только из минеральных компонентов, подобранных в строго определённых концентрациях. Для других видов микроорганизмов нормальный рост и развитие на такой среде практически невозможен. Результаты опыта представлены в таблице 1.

На агаризованной питательной среде в чашках Петри образовывались колонии округлой формы с выпуклым профилем и гладким краем. Цвет варьировался от кремового до розового. Дальнейшее микроскопическое исследование показало, что это были грамотрицательные палочки и кокки, обладающие характерными для метанотрофов морфологическими особенностями.

В остальных пробах колонии метанотрофов обнаружены не были, возможно это связано с тем, что водоёмы находятся под действием антропогенной нагрузки, многие из этих водоёмов загрязнены органическими

веществами, которые ингибируют рост и развитие метанотрофных бактерий. Кроме того, пробы были взяты с береговой зоны, а метанотрофы обитают там, где эмиссия метана достаточно интенсивна, то есть в центре водоёма.

Таблица 1.

Рост колоний на среде NMS, выделенных из толщи воды и донных отложений различных районов Тульской области

Вода					
№ пробы	п. Архангельское	п. Мыза	Платоновский парк г. Тула	д. Кочаки	Тульский Пивзавод
1	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	+
Донные отложения					
1	-	-	-	+	+
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	+

Для дальнейшего культивирования метанотрофных бактерий использовали 19 питательных сред: NMS, AMS, Среда № 221, NMS+мальтоза, AMS+мальтоза, Среда № 221+мальтоза, NMS+CH₃OH, AMS+CH₃OH, Среда № 221+CH₃OH, NMS+дрожжи, AMS+дрожжи, Среда № 221+дрожжи, NMS+L-глутамин, AMS+L-глутамин, Среда № 221+L-глутамин, NMS+L-метионин, AMS+L-метионин, Среда № 221+L-метионин, СИ (среда с анаэробным илом).

Результаты эксперимента представлены в таблице 2.

Результаты исследования влияния состава питательных сред на рост метанотрофных бактерий показали, что наилучшей является среда с добавлением анаэробного ила.

Рост выделенных колоний был больше на 34% по сравнению с контролем. Это связано с тем, что питательная среда наиболее близка к субстратам на которых живут метанотрофные бактерии в условиях, приближенных к естественным.

Для культивирования вида *Methylomonas methanica* В-2110 больше всего подходит питательная среда с добавлением анаэробного ила. Рост

штамма *Methylomonas methanica* В-2110 был на 42% больше чем в контрольном варианте. Также хорошие результаты были выявлены на среде AMS с добавлением метанола и на среде AMS, рост колоний был на 24% и 31% выше.

Таблица 2.

Изучение роста метанотрофных бактерий на твердых питательных средах различного состава

№	Питательная среда	14 сутки, мм	21 сутки, мм	28 сут-ки, мм	% к контролю
Штамм <i>Methylomonas methanica</i> В-2110					
1	Среда № 221 (контроль)	3,0 ± 0,27	5,1 ± 0,48	8,7 ± 0,78	100
2	NMS	2,0 ± 0,16	4,7 ± 0,34	7,6 ± 0,64	87
3	AMS	5,0 ± 0,42	8,4 ± 0,79	11,4 ± 1,01	131
4	NMS+ CH ₃ OH	2,3 ± 0,10	6,2 ± 0,48	9,4 ± 0,75	108
5	AMS+ CH ₃ OH	4,5 ± 0,38	8,6 ± 0,85	10,8 ± 0,98	124
6	Среда № 221 + CH ₃ OH	3,7 ± 0,28	7,9 ± 0,69	10,0 ± 0,89	114
7	Среда № 221 + дрожжи	1,4 ± 0,11	3,3 ± 0,24	5,6 ± 0,49	64
8	СИ	7,0 ± 0,41	10,5 ± 0,99	12,4 ± 1,20	142
Штамм <i>Methylococcus capsulatus</i> В-2990					
1	Среда № 221 (контроль)	2,6 ± 0,19	4,7 ± 0,40	7,9 ± 0,70	100
2	NMS	1,4 ± 0,12	3,3 ± 0,26	6,4 ± 0,57	81
3	AMS	2,7 ± 0,19	4,9 ± 0,40	8,3 ± 0,78	105
4	NMS+ CH ₃ OH	1,9 ± 0,14	4,3 ± 0,36	6,9 ± 0,59	88
5	AMS+ CH ₃ OH	1,7 ± 0,12	4,1 ± 0,39	6,6 ± 0,56	84
6	Среда № 221 + CH ₃ OH	2,8 ± 0,21	5,0 ± 0,44	8,7 ± 0,80	110
7	СИ	1,0 ± 0,04	1,7 ± 0,14	2,8 ± 0,23	36
Бактерии, выделенные из метанреактора					
1	Среда № 221 (контроль)	1,2 ± 0,10	2,8 ± 0,22	4,4 ± 0,37	100
2	NMS	1,4 ± 0,10	3,0 ± 0,27	4,7 ± 0,38	106
3	AMS	0,9 ± 0,05	1,9 ± 0,14	3,6 ± 0,29	82
4	Среда № 221 + дрожжи	0,8 ± 0,04	1,4 ± 0,10	2,1 ± 0,16	48
5	СИ	1,5 ± 0,12	3,5 ± 0,29	5,9 ± 0,52	134

Для штамма *Methylococcus capsulatus* В-2990 наилучшими средами для культивирования являются среда 221 с метанолом и AMS, рост колоний был на 10% и 5% выше, чем в контроле. Для бактерий, выделенных из метанреактора, наилучшей средой для культивирования является среда с добавлением анаэробного ила, увеличение диаметра колоний составляло 34%.

В среде AMS большое содержание соли CaCl_2 , в 10 раз больше чем в среде 221. Соль CaCl_2 оказывает стимулирующее действие на рост и развитие различных микроорганизмов. Так же в среде AMS в качестве азотного питания используется NH_4Cl . Соли аммония способствуют наработке биомассы метанотрофными бактериями.

Заключение

В ходе выполнения исследовательской работы удалось определить, что среда с добавлением анаэробного ила является подходящей для выращивания бактерий выделенных из естественных и искусственных биоценозов. Для выращивания коллекционных штаммов лучшими средами оказались AMS и AMS с добавлением метанола. Так же для выращивания штамма *Methylomonas methanica* В-2110 подходит среда с анаэробным илом.

Таким образом, изучение и испытания новых экспериментальных сред дает возможность упростить и оптимизировать процесс выделения и культивирования метанотрофных бактерий. Это способствует частичному снижению дефицита белка и обеспечению сельского хозяйства высококачественными белково-витаминными концентратами для кормов различных групп животных.

Работа выполнена в рамках гранта правительства Тульской области в сфере науки и техники 2021 года «Создание способа культивирования метанотрофных бактерий» по договору № ДС/287 от 25.10.2021 г.

Список литературы

1. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. Москва: изд. ГЕОС., 2001. С. 500.
2. Данилова О.В. Новые метанотрофы и филогенетически родственные им бактерии болотных экосистем : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2014. 27 с.
3. Дубинкин И.А., Самосадова П.В., Суясов Н.А. Выделение метанооксиляющих организмов из почвенных образцов // Успехи в химии и химической технологии. 2019, Т. 33, №5, С. 103.
4. Особенности психрофильных и термофильных метанотрофных микроорганизмов / Бакунина М.С., Пономарева А.Л., Дубовчук С.С., Еськова А.И., Шакиров Р.Б., Обжиров А.И. // Вестник ДВО РАН. 2020, Т. 213, №5. С. 43-50. <https://doi.org/10.37102/08697698.2020.213.5.004>
5. Рождественская Л. Н., Бычкова Е. С., Бычков А. Л. Анализ вызовов и современных тенденций развития технологий на рынке белков // Пищевая промышленность. 2018, № 5, С. 42-47.

6. Троценко Ю. А. Аэробные метилотрофы - перспективные объекты современной биотехнологии // *Journal of Siberian Federal University*. 2012, Т. 3, № 5, С. 243-279.
7. Троценко Ю.А. Особенности метаболизма метанотрофов : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Пушино, 1992. 38 с.
8. Чекмарев П. А., Артюхов А. И. Рациональные подходы к решению проблемы белка в России // *Достижения науки и техники АПК*. 2011, № 6, С. 5-8.
9. Aversesh N.J.H., Kracke F. Metabolic Network Analysis of Microbial Methane Utilization for Biomass Formation and Upgrading to Bio-Fuels // *Front. Energy Res*. 2018, 157 p. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00106>
10. Classification of pmoA amplicon pyrosequences using BLAST and the lowest common ancestor method in MEGAN / Dumont M.G., Luke C., Deng Y., Frenzel P. // *Front. Microbiol*. 2014, vol. 5, pp. 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb>
11. Cultivation of Important Methanotrophs From Indian Rice Fields / Rahalkar M.C., Kumal K., Pandit P., Bahulikar R. A., Mohite J.A. // *Microbiol*. 2021, pp. 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669244>
12. From nature to nurture: Essence and methods to isolate robust methanotrophic bacteria / Meruvua Haritha, Hui Wub, Ziyue Jiaoa, Liyan Wangc, Qiang Fei. // *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2020, vol. 5, no. 3, pp. 173-178. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.06.007>
13. Hanson R.S., Hanson T.E. Methanotrophic Bacteria // *Microbiological reviews*. 1996, vol. 60, no. 2, pp. 439–471.
14. Jiang H., Smith T.J. Environmental Biotechnology and Safety // *Comprehensive Biotechnology*. 2011, vol. 6, no. 2, 262 p.
15. Kung-Hui Chu, Lisa Alvarez-Cohen. Effect of Nitrogen Source on Growth and Trichloroethylene Degradation by Methane-Oxidizing Bacteria // *Applied and environmental microbiology*. 1998, vol. 64, no. 9, pp. 3451-3457.
16. Smith T.J., Murrell J.C. Methanotrophy/methane oxidation // *Encyclopedia of Microbiology*. 2009, vol. 3, pp. 293-298. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00054-7>
17. Soo Y. Ro, Amy C. Rosenzweig. Marine Enzymes and Specialized Metabolism - Part B // *Methods in Enzymology*. 2018, vol. 1, pp. 335-349.
18. Whittenbury R., Phillips K. C., Wilkinson J. F. Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria // *Journal of General Microbiology*. 1970, vol. 61, no. 2, pp. 205-218. <https://doi.org/10.1099/00221287-61-2-205>
19. Whittenbury R., Davies S.L, Davey J. F. Exospores and cysts formed by methane-utilizing bacteria // *Journal of General Microbiology*. 1970, vol. 61, no. 2, pp. 219-226. <https://doi.org/10.1099/00221287-61-2-219>
20. Wyss O., Moreland E.J. Composition of the capsule of obligate hydrocarbon-utilizing bacteria // *Microbiol*. 1968, vol. 16, no. 1, 185 p. <https://doi.org/10.1128/am.16.1.185-1968>

References

1. Galchenko V.F. *Metanotrofnye bakteriyi* [Methanotrophic bacteria]. Moscow: GEOS Publishing House, 2001, 500 p.
2. Danilova O.V. *Novie metanotrofy i filogeneticheski rodsvennyye im bakterii bolotnih ekosistem* [New methanotrophs and phylogenetically related bacteria of swamp ecosystems]. Abstract. diss. ... cand. biol. sciences. Moscow, 2014, 27 p.
3. Dubinkin I.A., Samosadova P.V., Suyasov N.A. Vydelenie metanokisl'yaychih organizmov iz pochvennih obrazcov [Isolation of methane-oxidizing organisms from soil samples]. *Yspehi v himii i himicheskoi tehnologii* [Advances in chemistry and chemical technology], 2019, vol. 33, no. 5, p. 103.
4. Osobennosti psichrofilnih i termofilynih metanotrofnih mikroorganizmov. [Features of psychrophilic and thermophilic methanotrophic microorganisms]. Bakunina M.S., Ponomareva A.L., Dubovchuk S.S., Eskova A.I., Shakirov R.B., Obzhirov A.I. *Vestnik DVO RAN* [Bulletin of the FEB RAS], 2020, vol. 213, no. 5, pp. 43-50. <https://doi.org/10.37102/08697698.2020.213.5.004>
5. Rozhdestvenskaya L. N., Bychkova E. S., Bychkov A. L. Analiz vyvozov i sovremennyh tendentsiy razvitya tehnologii na rynke belkov. [Analysis of challenges and current trends in the development of technologies in the protein market]. *Pishevaya promyshlennost* [Food industry], 2018, no. 5, pp. 42-47.
6. Trotsenko Y. A. Aerobnyye metilotrofy – perspektivnyye obekty sovremennoy biotekhnologii. [Aerobic methylotrophs – promising objects of modern biotechnology]. *Journal of Siberian Federal University*, 2012, vol. 3, no. 5, pp. 243-279.
7. Trotsenko Y.A. *Osobennosty metabolizma metanotrofov* [Features of metabolism of methanotrophs]. Abstract. dis. ... Doctor of Biological Sciences. Pushchino, 1992, 38 p.
8. Chekmarev P. A., Artyukhov A. I. Ratsionalnye podhody k resheniyu problemy belka v Rossii. [Rational approaches to solving the protein problem in Russia]. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK* [Achievements of science and technology of the agro-industrial complex], 2011, no. 6, pp. 5-8.
9. Averesh N.J.H., Krake F. Analysis of the metabolic network of the use of microbial methane for the formation of biomass and its conversion into biofuels. *Front. Energy resources*, 2018, p. 157. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00106>
10. Classification of pmoA amplicon pyrosequences using the BLAST method and the smallest common ancestor in MEGAN / Dumont M.G., Luke C., Deng Y., Frenzel P. *Front. Microbiol.*, 2014, vol. 5, pp. 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb>
11. Cultivation of Important Methanotrophs From Indian Rice Fields / Rahalkar M.C., Kumal K., Pandit P., Bahulikar R.A., Mohite J.A. *Microbiol.*, 2021, pp. 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669244>

12. From nature to education: the essence and methods of isolation of resistant methanotrophic bacteria / Meruvua Harita, Hui Wub, Ziyue Jiaoa, Liyan Wang, Qiang Fei. *Synthetic and systemic biotechnology*, 2020, vol. 5, no. 3, pp. 173-178. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.06.007>
13. Hanson R.S., Hanson T.E. Methanotrophic bacteria. *Microbiological reviews*, 1996, vol. 60, no. 2, pp. 439–471.
14. Jiang H., Smith T.J. Ecological biotechnology and safety. *Complex biotechnology*, 2011, vol. 6, no. 2, p. 262.
15. Kung-Hui Chu, Lisa Alvarez-Cohen. The effect of the nitrogen source on the growth and degradation of trichloroethylene by methane-oxidizing bacteria. *Applied and ecological microbiology*, 1998, vol. 64, no. 9, pp. 3451-3457.
16. Smith T.J., Murrell J. K. Methanotrophy / methane oxidation. *Encyclopedia of Microbiology*, 2009, vol. 3, pp. 293-298. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00054-7>
17. Soo Y. Ro, Amy K. Rosenzweig. Marine enzymes and specialized metabolism - Part B. *Methods in Enzymology*, 2018, vol. 1, pp. 335-349.
18. Wittenbury R., Phillips K. K., Wilkinson J. F. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *Journal of General Microbiology*, 1970, vol. 61, no. 2, pp. 205-218. <https://doi.org/10.1099/00221287-61-2-205>
19. Whittenbury R., Davies S.L, Davey J. F. Exospores and cysts formed by methane-utilizing bacteria. *Journal of General Microbiology*, 1970, vol. 61, no. 2, pp. 219-226. <https://doi.org/10.1099/00221287-61-2-219>
20. Wyss O., Moreland E.J. Composition of the capsule of obligate hydrocarbon-utilizing bacteria. *Microbiol.*, 1968, vol. 16, no. 1, 185 p. <https://doi.org/10.1128/am.16.1.185-.1968>

ДААННЫЕ ОБ АВТОРАХ

Прокудина Ольга Владимировна, студент кафедры биологии и технологии живых систем, лаборант технопарка универсальных педагогических компетенций

Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого

пр. Ленина 125, г. Тула, 300026, Российская Федерация

prokudinaolga11@gmail.com

Песцов Георгий Вячеславович, д.с.-х.н., профессор, заведующий микробиологической лаборатории центра технологического превосходства «Передовые химические и биотехнологии»

Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого

*пр. Ленина 125, г. Тула, 300026, Российская Федерация
georgypestsov@gmail.com*

Третьякова Анастасия Валерьевна, аспирант кафедры биологии и технологии живых систем, младший научный сотрудник микробиологической лаборатории центра технологического превосходства «Передовые химические и биотехнологии»

Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого

*пр. Ленина 125, г. Тула, 300026, Российская Федерация
glazynovaanastasiya@gmail.com*

DATA ABOUT THE AUTHORS

Olga V. Prokudina, student of the Department of Biology and Technology of Living Systems, laboratory assistant of the Technopark of Universal Pedagogical Competencies

*Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University
125, Lenin Ave., Tula, 300026, Russian Federation
prokudinaolga11@gmail.com*

Georgiy V. Pestsov, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Head of the Microbiological Laboratory of the Center for Technological Excellence “Advanced Chemical and Biotechnology”

*Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University
125, Lenin Ave., Tula, 300026, Russian Federation
georgypestsov@gmail.com*

Anastasia V. Tretyakova, Postgraduate at the Department of Biology and Technology of Living Systems, Junior Researcher of the Microbiological Laboratory of the Center for Technological Excellence “Advanced Chemical and Biotechnology”

*Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University
125, Lenin Ave., Tula, 300026, Russian Federation
glazynovaanastasiya@gmail.com*

Поступила 19.06.2022

После рецензирования 10.07.2022

Принята 12.07.2022

Received 19.06.2022

Revised 10.07.2022

Accepted 17.07.2022