

# ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ДЕЙТЕРИЯ в клетках бактерий и микроводорослей при росте на тяжелой воде ( $D_2O$ )

**Изучены изотопные эффекты дейтерия в клетках различных таксономических групп микроорганизмов, реализующих метилотрофные, хемогетеротрофные, фотоорганогетеротрофные и фотосинтетические способы ассимиляции углеродных субстратов (метилотрофные бактерии, галобактерии, одноклеточные зеленые водоросли), при росте на средах с тяжёлой водой ( $D_2O$ ). Разработан метод ступенчатой адаптации клеток к тяжёлой воде, заключающийся в их рассеве на чашках Петри с твёрдыми (2 % агар) питательными средами при ступенчатом увеличении градиента концентрации тяжёлой воды (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98 %  $D_2O$ ) и последующей селекции устойчивых к  $D_2O$  клеток. Выросшие на средах с низким градиентом концентрации  $D_2O$  клетки переносили на среды с большим градиентом концентрации, вплоть до 98 %  $D_2O$ . В результате на максимально дейтерированной среде с 98 %  $D_2O$  получены адаптированные к  $D_2O$  клетки, весь биологический материал которых вместо водорода содержит дейтерий.**

Показано, что эффекты, наблюдаемые при росте клеток на тяжёлой воде, носят комплексный многофакторный характер и связаны с изменениями физиологических параметров – величины лаг-фазы, времени клеточной генерации, выходов биомассы, соотношения синтезируемых аминокислот, белков, углеводов и липидов, а также с эволюционным уровнем организации изучаемого объекта.

## Введение

Одним из интереснейших биологических феноменов является способность микроорганизмов расти в искусственных условиях в тяжёлой воде ( $D_2O$ ) [1]. Молекулы тяжёлой воды (ТВ) были впервые обнаружены в природной воде Гарольдом Юри в 1932 г. [2]. В 1933 г. Гильберт Льюис получил чистую ТВ путём электролиза обычной воды [3].

ТВ обладает высоким экологическим потенциалом вследствие отсутствия радиоактивности, что способствует ее использованию в

качестве изотопного индикатора в химии, биологии и медицине, в т. ч. в биомедицинской диагностике [4]. Мировое производство ТВ составляет несколько тысяч тонн в год. К основным способам получения  $D_2O$  относятся изотопный обмен между водой и  $D_2S$ , электролиз воды в сочетании с каталитическим изотопным обменом между водой и водородом; низкотемпературная ректификация жидкого водорода с последующим сжиганием  $D_2$  с кислородом; изотопный обмен между водородом и аммиаком в присутствии  $KNH_2$ . Для конечного концентрирования  $D_2O$  используют ректификацию воды под вакуумом и электролиз.

Трудности получения ТВ высокого уровня дейтерированности связаны с малой природной распространенностью дейтерия, которая составляет 0,015 ат. %. Это количество зависит как от природы вещества, так и от общего количества материи, сформированной в процессе эволюции Вселенной. Дейтерий может служить индикатором эволюции Вселенной, поскольку его количество в природе постоянно.

Изотопные эффекты удобно изучать в лабораторных условиях на адаптированных к ТВ клетках бактерий и микроводорослей, которые являются удобными объектами для многочисленных исследований. В процессе роста клеток в ТВ в них синтезируются макромолекулы жизненно-важных соединений (ДНК, белки), атомы водорода при углеродных скелетах которых полностью замещены на дейтерий. Их выделяют из дейтерированной биомассы, полученной на средах с максимальными концентрациями  $D_2O$ , используя комбинацию физико-химических методов выделения: гидролиз, экстракцию органическими растворителями, спиртовое осаждение и хроматографическую очистку методом колоночной хроматографии с применением различных сорбентов. Такие дей-

**О.В. Мосин\***,  
кандидат химических наук, научный сотрудник, ФГБОУ ВПО Московский государственный университет пищевых производств

**И.И. Игнатов**,  
доктор Европейской Академии Естественных Наук (Германия), директор научно-исследовательского центра медицинской биофизики, НИЦМБ, София, Болгария

\* Адрес для корреспонденции: mosin-oleg@yandex.ru

терированные макромолекулы претерпевают структурно-адаптационные модификации, необходимые для нормального функционирования клетки в ТВ [5]. Но эти изменения не единственны; физиология, морфология, цитология, а также генетический аппарат клетки также подвергается воздействию и изменениям в ТВ [6]. Несмотря на то, что ТВ действует угнетающе на клетки животных, растений и простейших, за последнее время в нашей стране разрабатываются специальные подходы по получению адаптированных к высоким концентрациям D<sub>2</sub>O клеток организмов.

Адаптация к ТВ интересна не только с научной точки зрения, она также позволяет использовать уникальный дейтерированный биологический материал для решения задач молекулярной организации клетки методом ЯМР-спектроскопии [7]. Тенденции к применению дейтерия в качестве изотопной метки обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации дейтерия в молекуле методами высокого разрешения: спектроскопией ЯМР [8], инфракрасной [9], лазерной спектроскопией [10] и масс-спектрометрией [11]. Это позволило за последние годы существенно повысить эффективность проведения многочисленных биологических исследований с D<sub>2</sub>O и дейтерированными природными соединениями *de novo*, а также изучать структуру и механизм их действия на молекулярном уровне.

Данная работа является продолжением наших исследований, связанных с принципиальной возможностью практического использования различных клеток бактерий, микроводорослей и растений для синтеза природных соединений в условиях максимально дейтерированных сред с ТВ. Целью работы являлось изучение изотопных эффектов D<sub>2</sub>O в клетках различных таксономических групп бактерий и микроводорослей, осуществляющих метилотрофный, хемогетеротрофный, фотоорганогетеротрофный и фотосинтетический пути ассимиляции углеродных субстратов.

## Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись две хемогетеротрофные грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* и *Brevibacterium methylicum* (последняя способна к метилотрофии), фотоорганогетеротрофная галобактерия *Halobacterium halobium* и фотосинтезирующая одноклеточная зеленая микроводоросль *Chlorella vulgaris*, полученные из

Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИГенетика).

1. *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В 5652, лейцинзависимый штамм грамположительных факультативных метилотрофных бактерий, ассимилирующий метанол по рибулозо-5-моно-фосфатному (РМФ) циклу фиксации углерода.

2. *Bacillus subtilis* В-3157, полиауксотрофный штамм по гистидину, тирозину, аденину и урацилу штамм грамположительных хемогетеротрофных бактерий, реализующий гексозо-6-моно-фосфатный (ГМФ) путь ассимиляции углеводов.

3. *Halobacterium halobium* ЕТ 1001, фотоорганогетеротрофный пигментсодержащий штамм экстремальных галобактерий, синтезирующий трансмембранный белок бактериородопсин.

4. *Chlorella vulgaris* В 8765, зеленая одноклеточная фотосинтезирующая микроводоросль.

Для приготовления питательных сред применяли D<sub>2</sub>O (99,8 ат.% D), DCl (95,5 ат.% D) и [D]метанол (97,5 ат.% D), полученные из Российского научно-исследовательского центра «Изотоп» (г. Санкт-Петербург, РФ). Неорганические соли и D, L- глюкозу (Reanal, Венгрия) предварительно перекристаллизовывали в D<sub>2</sub>O, которую дистиллировали над перманганатом калия с последующим контролем изотопной чистоты <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопией на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) (частота 70 МГц).

Для выращивания использовали следующие питательные среды (количества компонентов приведены в г/л):

1. Минимальная среда М9 для выращивания факультативной метилотрофной бактерии *B. methylicum*, на основе ступенчато-увеличивающихся концентраций D<sub>2</sub>O (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98 об. % D<sub>2</sub>O) и 2 % метанолом/[D]-метанолом: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 3; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 6; NaCl - 0,5; NH<sub>4</sub>Cl - 1.

2. Среда ГС1 для выращивания хемогетеротрофной бактерии *B. subtilis* (на основе D<sub>2</sub>O): глюкоза - 120; гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum* - 25; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> - 30; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 20; мел - 20.

3. Среда ГС2 для выращивания фотоорганогетеротрофной галобактерии *H. halobium* (на основе D<sub>2</sub>O): NaCl - 250; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 20; KCl - 2; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O - 0,065; цитрат натрия - 0,5; гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum* - 20, витамины (биотин - 1·10<sup>-4</sup>; фолиевая кислота - 1,5·10<sup>-4</sup>; витамин B12 - 2·10<sup>-5</sup>).

4. Среда Тамия для выращивания фотосин-

тезирующей зеленой микроводоросли *C. vulgaris* (на основе  $D_2O$ ):  $KNO_3$  – 5,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 2,5;  $KH_2PO_4$  – 1,25;  $FeSO_4$  – 0,003; микроэлементы ( $MnSO_4 \cdot 2H_2O$  –  $3 \cdot 10^{-4}$ ;  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0,065;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  –  $4 \cdot 10^{-5}$ ;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  –  $5 \cdot 10^{-5}$ ;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  –  $5 \cdot 10^{-6}$ ).

Стартовым материалом для выращивания хемогетеротрофных бактерий *B. subtilis* и фотоорганогетеротрофных галобактерий *H. halobium* являлась биомасса факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum*, полученная в условиях многостадийной адаптации на твердых (2 % агар) средах M9 с  $D_2O$ . Сырую дейтеро-биомассу *B. methylicum* (выход 100 г по влажному весу с 1 л среды) автоклавировали в 0,5 н HCl (в  $D_2O$ ) (0,8 атм, 30 мин), нейтрализовали 0,1 н KOH (в  $D_2O$ ) (pH 7,0) и использовали в качестве источника дейтерированных ростовых субстратов для адаптации и выращивания хемогетеротрофных и фотоорганогетеротрофных галобактерий.

Бактериальный рост оценивали по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твердых агаризованных сред с  $D_2O$ , а также по величине оптической плотности суспензии клеток, измеренной на спектрофотометре Beckman-DU6 (США) при  $\lambda=620$  нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Выращивание грамположительных хемогетеротрофных бактерий *B. subtilis* проводили на среде ГС1 при 34 °С в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл с наполнением средой до 50 мл в условиях интенсивной аэрации на орбитальном шейкере Biorad (100 об/мин) (Польша), используя в качестве источников дейтерия  $D_2O$  и гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum*. Фотоорга-

**Ключевые слова:**

дейтерий,  
тяжелая вода,  
адаптация,  
бактерии,  
микроводоросли

ногетеротрофные галобактерии *H. halobium* выращивали в аналогичных условиях на среде ГС2 при 37 °С при освещении лампами дневного света ЛБ-40. Выращивание микроводоросли *C. vulgaris* проводили на синтетической среде Тамия при 32 °С в фотореакторе с барботажем  $CO_2$ . После 6-7 сут культивирования клетки отделяли центрифугированием (10000 об/мин, 20 мин).

Биомассу, полученную после выращивания, промывали  $D_2O$  и дважды обрабатывали смесью органических растворителей хлороформ-метанол-ацетон (2:1:1) для выделения липидов и пигментов. Полученный осадок высушивали до постоянного веса (10-12 мг) и использовали в качестве фракции суммарных белков биомассы, а жидкий экстракт - в качестве липидной фракции.

Гидролиз дейтерированных белков биомассы проводили в запаянных стеклянных ампулах в 50-ти кратном избытке 6 н DCl (в  $D_2O$ ), используя 10 мг высушенной биомассы. Ампулы выдерживали при 110 °С в течение 24 ч. После этого реакцию массу суспендировали в горячей  $D_2O$ , фильтровали. Гидролизат упаривали в роторном испарителе при 40 °С. Остатки DCl удаляли в эксикаторе путем выдерживания над твердым NaOH.

Для проведения гидролиза внутриклеточных углеводов 50 мг сухой делипидизованной биомассы помещали в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мл  $D_2O$  и 1,6 мл 25 %  $D_2SO_4$  и кипятили с обратным водяным холодильником в течение 90 мин. После охлаждения реакцию смесь суспендировали в 50 мл  $D_2O$  и нейтрализовали 2 н раствором  $Ba(OH)_2$  (в  $D_2O$ ) до pH 7,0. Выпавший осадок  $BaSO_4$  отделяли центрифугированием (15000 об/мин, 5 мин) на цен-



трифуге Т-24 (ФРГ), супернатант декантировали и упаривали в роторном вакуумном испарителе РВО-10 (Венгрия) при 60 °С.

Аминокислотный анализ белковых гидролизатов проводили на приборе Biotronic LC 5001 (ФРГ); 230×3,2 мм; рабочее давление 50-60 атм; скорость подачи натрий-цитратного буфера 18,5; нингидрина - 9,25 мл/ч; детекция при  $\lambda=570$  нм и  $\lambda=440$  нм (для пролина).

Анализ углеводов осуществляли на жидкостном хроматографе Knauer (ФРГ), снабженном насосом Gilson (ФРГ) и рефрактометром Waters К 401 (ФРГ); неподвижная фаза - Separon NH2, 10 мкм; подвижная фаза - ацетонитрил-вода, (75:25); скорость подачи - 0,6 мл/мин.

Липиды анализировали на хроматографе Beckman Gold System (США), снабженном насосом Model 166 и детектором Model 126 (США); неподвижная фаза - Ultrasphere ODS 5 мкм; 4,6 × 250 мм; подвижная фаза - линейный градиент 5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -ацетонитрил; 100 % в течение 50 мин; скорость подачи - 0,5 мл/мин; детекция при  $\lambda=210$  нм. Уровни включения дейтерия в молекулы аминокислот белковых гидролизатов определяли методом масс-спектрометрии ЭУ в виде метиловых эфиров N-(диметиламино) нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот на приборе MB-80A (Hitachi, Япония) при ионизирующем напряжении 70 эВ и температуре катодного источника 180-200 °С по ранее разработанной нами методике [12]. Расчет уровней дейтерированности молекул аминокислот белковых гидролизатов в масс-спектрах ЭУ проводили по соотношению вкладов пиков молекулярных ионов производных аминокислот  $[\text{M}]^+$  и контрольного гидролизата, полученного в обычной воде.

## Результаты и их обсуждение

**И**зотопные эффекты дейтерия определяются изотопным строением молекулы ТВ, которая по химическому составу является оксидом дейтерия  $\text{D}_2\text{O}$  с кислородом природного изотопного состава  $^{16}\text{O}$ . Химическое строение молекул  $\text{D}_2\text{O}$  аналогично строению молекул  $\text{H}_2\text{O}$ , с очень малым различием в значениях длин ковалентных связей и углов между ними. Разница в молекулярных массах  $\text{D}_2\text{O}$  и  $\text{H}_2\text{O}$  приводит к существенным различиям в физических свойствах ТВ (табл. 1).

Вследствие изотопных эффектов дейтерия, значения константы ионизации ( $\lg K_{\text{H}} = 78,06$  при 298,15 К), дипольного момента (6,24·

10<sup>-30</sup> Кл.м) и диамагнитной проницаемости (при 293,15 К -  $1,295 \cdot 10^{-5}$  Кл.м) для  $\text{D}_2\text{O}$  немного меньше, чем для  $\text{H}_2\text{O}$ . Подвижность ионов  $\text{D}_3\text{O}^+$  на 28,5 % ниже  $\text{H}_3\text{O}^+$ , а  $\text{OD}^-$  - на 39,8 % ниже  $\text{OH}^-$ . Для других ионов различие подвижностей в  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$  составляет около 18 % [14]. Константы диссоциации слабых кислот и оснований  $K_d$  снижаются в  $\text{D}_2\text{O}$  по сравнению с  $\text{H}_2\text{O}$ , а растворимость и растворяющая способность  $\text{D}_2\text{O}$  для многих неорганических и органических веществ ниже, чем у  $\text{H}_2\text{O}$ .

В смесях ТВ с обычной водой с большой скоростью происходит изотопный обмен с образованием "полутяжелой" воды (HDO):  $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} = 2\text{HDO}$ . Поэтому дейтерий при малом содержании присутствует в воде почти полностью в форме HDO, а при высоком - в форме  $\text{D}_2\text{O}$ .

В составе природной воды дейтерий образует 6 конфигураций изотопологов -  $\text{HD}^{16}\text{O}$ ,  $\text{HD}^{17}\text{O}$ ,  $\text{HD}^{18}\text{O}$ ,  $\text{D}_2^{16}\text{O}$ ,  $\text{D}_2^{17}\text{O}$ ,  $\text{D}_2^{18}\text{O}$ , 3 конфигурации образованы изотопологами кислорода -  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ ,  $\text{H}_2^{17}\text{O}$ ,  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . Концентрации изотопологов воды, рассчитанные на основании данных определения их содержания методом инфракрасной спектроскопии [15], варьируют в пределах, зафиксированных в основных стандартах изотопного состава гидросферы Standard Marine Ordinary Water (SMOW) (табл. 2). В среднем, в природных водах в 10000 молекул содержится 9973 молекул  $^1\text{H}_2^{16}\text{O}$ , 3 молекулы  $^1\text{HD}^{16}\text{O}$ , 4 молекулы  $^1\text{H}_2^{17}\text{O}$ , 20 молекул  $^1\text{H}_2^{18}\text{O}$  и около 2 молекул  $\text{D}_2^{16}\text{O}$ .

При воздействии воды на биологические объекты их реакция изменяется в зависимости от изотопного состава воды. Самые большие изотопные эффекты в разнице констант скоростей химических реакций с соотношением  $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 7-10$  наблюдаются в ТВ для C-H/C-D, N-H<sub>2</sub>/N-D<sub>2</sub> и O-H/O-D связей. Изотопные эффекты оказывают влияние не только на физико-химические, но и биологические свойства  $\text{D}_2\text{O}$ . Эксперименты с ТВ

Таблица 1

Физические свойства обычной и тяжелой воды [13]

Физические свойства	$\text{D}_2\text{O}$	$\text{H}_2\text{O}$
Молекулярная масса (г/моль)	20,0276	18,0153
Плотность при 20 °С (г/см <sup>3</sup> )	1,1050	0,9982
Температура максимальной плотности, °С	11,24	3,98
Температура замерзания при 1 атм, °С	3,82	0
Температура кипения при 1 атм, °С	101,44	100
Давление пара при 100 °С, мм. рт. ст.	721,60	760,00
Вязкость при 20 °С, сантипуаз	1,247	1,002



Таблица 2

Рассчитанные массовые концентрации изотопологов в природной воде, соответствующие международному стандарту SMOW [15]

Изотополог воды	Молекулярная масса	Содержание, г/кг SMOW
$^1\text{H}_2^{16}\text{O}$	18,0106	997,03253636
$^1\text{HD}^{16}\text{O}$	19,01684	0,32800009
$\text{D}_2^{16}\text{O}$	20,0231	0,00002690
$^1\text{H}_2^{17}\text{O}$	19,0148	0,41150907
$^1\text{HD}^{17}\text{O}$	20,0211	0,00013499
$\text{D}_2^{17}\text{O}$	21,0273	0,00000001
$^1\text{H}_2^{18}\text{O}$	20,0148	2,22706373
$^1\text{HD}^{18}\text{O}$	21,0211	0,00072876
$\text{D}_2^{18}\text{O}$	22,0274	0,00000005

показали (рис. 1), что клетки животных способны выдерживать до 30 %  $\text{D}_2\text{O}$ , растений – 50 %  $\text{D}_2\text{O}$ , микроводорослей – 70 %  $\text{D}_2\text{O}$ , а клетки простейших микроорганизмов способны жить на 95 %  $\text{D}_2\text{O}$  [16].

Тем не менее, ТВ играет значительную роль в различных биологических процессах, например, при биосинтезе дейтерированных природных соединений. Систематическое изучение ее воздействия на клетки животных, растений и бактерий в нашей стране начато сравнительно недавно [17]. ТВ действует отрицательно на жизненные функции организмов; это происходит даже при использовании обычной природной воды с повышенным содержанием тяжелой или “полутяжелой” воды ( $\text{HDO}$ ) [18].

Лишь бактерии и микроводоросли способны выдерживать высокие концентрации  $\text{D}_2\text{O}$ . Ранее нами были получены адаптированные к максимальным концентрациям ТВ клетки, относящиеся к различным таксономическим группам микроорганизмов, реализующих метилотрофный, хемогетеротрофный, фотоорганогетеротрофный и фотосинтетический пути ассимиляции углеродных субстратов – метилотрофные бактерии, галобактерии и микроводоросли [19]. Их общей особенностью являлось то, что весь биологический материал клеток вместо природного водорода содержал дейтерий. Стратегия адаптации к  $\text{D}_2\text{O}$  приведена в табл. 3 на примере факультативных метилотрофных бактерий *V. methylicum*, реализующих РМФ-путь ассимиляции углерода, дейтеро-биомасса которых использовалась в дальнейших экспериментах в качестве дейтерированных ростовых субстратов для выращивания хемогетеротрофных и фотоорганогетерот-

рофных галобактерий. Для адаптации клеток к  $\text{D}_2\text{O}$  использовали ступенчато увеличивающийся градиент концентрации  $\text{D}_2\text{O}$  (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98 %  $\text{D}_2\text{O}$ ), поскольку предполагалось, что постепенное привыкание клеток к дейтерию будет оказывать благоприятный эффект на ростовые и физиологические параметры (табл. 3).

Адаптация заключалась в расसेве микроорганизмов на чашках Петри с твердыми агаризованными средами с 2 %-м агаром со ступенчатом увеличении концентрации ТВ в них (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98 %  $\text{D}_2\text{O}$ ) и последующей селекции устойчивых к  $\text{D}_2\text{O}$  клеток. Выросшие на средах с низким градиентом концентрации  $\text{D}_2\text{O}$  клетки переносили на среды с большим градиентом концентрации, вплоть до 98 %  $\text{D}_2\text{O}$ . На конечном этапе на 98 %-ной  $\text{D}_2\text{O}$  были выделены отдельные клеточные колонии, представляющие собой потомство одной единственной клетки, устойчивой к действию  $\text{D}_2\text{O}$ . Затем колонии переносили в жидкую питательную среду, приготовленную на основе  $\text{D}_2\text{O}$  и культивировали в течение 5 сут при 34 °С. Уровень выживаемости клеток на полностью дейтерированной среде составил не более 40-50 %. За ходом адаптации наблюдали по изменениям продолжительности лаг-периода, времени клеточной генерации и выходов микробной биомассы, а также по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твердых агаризованных сред с  $\text{D}_2\text{O}$ . Общей особенностью адаптированных к  $\text{D}_2\text{O}$  клеток микроорганизмов было увеличение лаг-периода и времени клеточной генерации при уменьшении выходов микробной биомассы. При этом значения этих параметров коррелировали с уровнями содержания  $\text{D}_2\text{O}$  в водной среде, с фиксированием самых низких значений в максимально дейтерированных средах. В отличие от адаптирован-

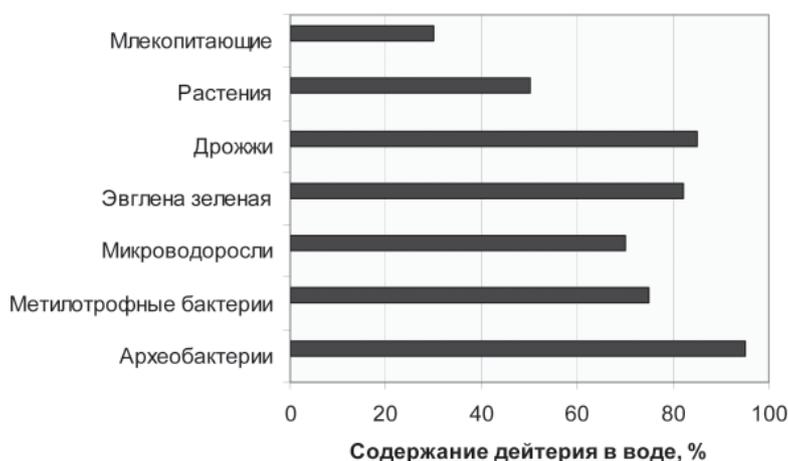


Рис. 1. Выживаемость различных организмов в воде с различными содержаниями дейтерия (по данным авторов).

Таблица 3

Изотопный состав ростовых сред и характеристики роста метилотрофных бактерий *B. methylicum* в процессе адаптации к тяжелой воде

Номер опыта	Компоненты среды, об. %				Лаг-период, ч	Выход микробной биомассы, % от контроля	Время генерации, ч
	H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O	метанол	[D]метанол			
1	98,0	0	2	0	20	100	2,2
2	98,0	0	0	2	30	92,3	2,4
3	73,5	24,5	2	0	32	90,6	2,4
4	73,5	24,5	0	2	34	85,9	2,6
5	49,0	49,0	2	0	40	70,1	3,0
6	49,0	49,0	0	2	44	60,5	3,2
7	24,5	73,5	2	0	45	56,4	3,5
8	24,5	73,5	0	2	49	47,2	3,8
9	0	98,0	2	0	58	32,9	4,4
10	0	98,0	0	2	60	30,1	4,9
10'	0	98,0	0	2	40	87,0	2,8

\* Данные опытов 1-10 приведены при выращивании бактерий на водных средах, содержащих 2 % метанол/[D]-метанол и D<sub>2</sub>O. Данные опыта 10' приведены для адаптированных к максимальному содержанию дейтерия в среде бактерий при выращивании в среде с максимальной концентрацией D<sub>2</sub>O и [D]метанола. В качестве контроля использовали опыт 1, где применяли обычную воду и метанол.

ных к D<sub>2</sub>O микроорганизмов, рост исходных микроорганизмов в максимально дейтерированных средах ингибировался дейтерием. Адаптированные микроорганизмы имели несколько сниженные уровни накопления микробной биомассы и увеличенные времена клеточной генерации при росте в D<sub>2</sub>O-средах.

Полученный результат в опытах по адаптации метилотрофных бактерий *B. methylicum* к D<sub>2</sub>O позволил использовать гидролизаты дейтерированной биомассы, полученной в процессе многоступенчатой адаптации к ТВ, в качестве дейтерированных ростовых субстратов для выращивания грамположительных хемогетеротрофных бактерий *B. subtilis* и фотоорганогетеротрофных галобактерий *H. halobium*. Усваиваемость биомассы метилотрофов клетками простейших и эукариот составляет 85-99 %, а производительность метилотрофов, измеренная по уровню конверсии метилового спирта, достигает 50-60 % (при эффективности конверсии 15,5-17,3 г. сух. биомассы на 1 г потребленного субстрата) [20]. Благодаря этому метилотрофные бактерии рассматриваются как дешевые источники дейтерированного белка и аминокислот. При разработке питательных сред на

основе дейтеро-биомассы метилотрофных бактерий учитывалось, что метилотрофные бактерии при росте на метаноле способны синтезировать большое количество полноценных белков (до 55 % от веса сухого вещества), 15-17 % полисахаридов, 10-12 % липидов (в основном, фосфолипидов) и 18 % зольных веществ [21]. Причем эта способность сохраняется при росте на средах, содержащих D<sub>2</sub>O и [D]метанол. Чтобы обеспечить высокие выходы этих соединений и минимизировать реакции обратного (H-D) обмена в аминокислотных остатках молекул белков, гидролиз дейтеро-биомассы проводили автоклавированием в 0,5 н DCl (в D<sub>2</sub>O).

Учитывая способы ассимиляции углеродных субстратов, адаптацию *B. subtilis* и *H. halobium* проводили путем рассева и селекции бактерий до отдельных колоний на соответствующих питательных средах ГС1 и ГС2 на основе 99,8 % D<sub>2</sub>O с 2 % агаром и гидролизатом дейтеро-биомассы *B. methylicum*. В отличие от D<sub>2</sub>O [D]метанол не оказывал существенного влияния на параметры роста метилотрофных бактерий. Для выращивания *S. vulgaris* использовали питательную среду Тамия на основе 99,8 ат.% D<sub>2</sub>O. В случае с *H. halobium* и *S. vulgaris* использовали освещение лампами дневного света ЛБ-40, поскольку оба микроорганизма развиваются в присутствии света. Выделенные селекцией отдельные колонии клеток, устойчивые к D<sub>2</sub>O, выращивали в жидких средах аналогичного состава с 99,8 ат.% D<sub>2</sub>O для наработки дейтеро-биомассы.

Выбор фотоорганогетеротрофных галобактерий для этих исследований был обусловлен перспективами дальнейшего выделения ретинальсодержащего трансмембранного белка бактериородопсина (БР), выполняющего роль АТФ-зависимой транслоказы в клеточной мембране галобактерии *H. halobium*, создающей электрохимический градиент протонов  $H^+$  на поверхности клеточной мембраны, энергия которого используется клеткой для синтеза АТФ в анаэробном фотосинтетическом фосфорилировании. БР представляет собой хромопротеид из 248 аминокислотных остатков, связанный с остатком лизина-216, который содержит в качестве хромоформной группы эквимолекулярную смесь 13-*цис*- и полностью 13-*транс*-ретинольного  $C_{20}$ -каротиноида, определяющего пурпурно-красный цвет этих бактерий.

Несмотря на структурно-функциональную изученность БР, он остается в центре внимания био- и нанотехнологии из-за своей высокой светочувствительности и разрешающей способности и используется в прикладных целях как биологический фотохромный материал. БР также привлекателен, как модельный объект для изучения функциональной активности и структурных свойств мембранных белков в составе искусственно сконструированных энергопреобразующих мембран [22].

Адаптацию галобактерий *H. halobium* к ТВ проводили путем посева до отдельных колоний и отбора устойчивых колоний на 2% агаре, содержащим 99,8 ат.%  $D_2O$  с добавлением гидролизата дейтеро-биомассы *B. methylicum*. Выделенные селекцией отдельные колонии клеток *H. halobium*, устойчивые к  $D_2O$ , выращивали в жидкой среде с 99,8 ат.%  $D_2O$  аналогичного состава. В опти-

мальных условиях выращивания ( $37^\circ C$ , 3-4 сут, освещение лампами ЛБ-40) в клетках синтезировался каротиноидсодержащий фиолетовый пигмент, по спектральному соотношению белкового и хромоформного фрагментов молекулы  $D_{280}/D_{568}$  1,5:1 идентичный природному БР. Рост галобактерий в  $D_2O$ -среде ингибировался незначительно по сравнению с протонированной средой, что существенно упрощает оптимизацию условий наработки дейтерированной биомассы галобактерий, а суммарный уровень дейтерированности бактериородопсина, рассчитанный по уровням дейтерированности аминокислот белкового гидролизата, составил 92-95 % D.

Использование грамположительных хемогетеротрофных бактерий *B. subtilis* определялось необходимостью препаративного выделения продуцируемого этой бактерией в  $D_2O$ -среде дейтерированного рибонуклеозида – рибоксина (уровень дейтерированности 75 % D) для медицинской диагностики, а использование фотосинтезирующей микроводоросли *C. vulgaris* было связано с исследованием биосинтеза в  $D_2O$  дейтерированных пигментов и хлорофиллов (уровень дейтерированности 95-97 % D) для их последующего использования для реконструкции искусственных мембран.

Проведённые нами исследования свидетельствуют, что способность к адаптации к ТВ у разных таксономических групп микроорганизмов различная и определяется как таксономической принадлежностью микроорганизмов, так и особенностями метаболизма, функционированием различных путей ассимиляции субстратов, а также эволюционной нишей, которую занимает исследуемый объект. При этом чем ниже уровень эволюционного развития организма, тем лучше он при-



**Ключевые слова:**

экстракция,  
реэкстракция,  
гуминовые кислоты,  
тяжелые металлы

способливается к присутствию дейтерия в среде [23]. Так, из изученных объектов наиболее примитивными в эволюционном плане (строение клеточной мембраны, биохимия, устойчивость к внешним факторам среды) кажутся нам археи, относящиеся к археобактериям, стоящие обособленно как от прокариотических, так и от эукариотических микроорганизмов, обнаруживающих повышенную устойчивость к ТВ и практически не нуждающиеся в адаптации к  $D_2O$ , что нельзя сказать о микроводорослях, которые, будучи эукариотами, труднее всех адаптируются к ТВ и проявляют ингибирование роста в 70-75 %  $D_2O$ .

В процессе адаптации к  $D_2O$  немаловажную роль играет состав водной среды, поскольку причинами ингибирования роста клеток и их гибели могут стать изменения соотношения синтезируемых аминокислот, белков и углеводов на  $D_2O$ -среде. Отмечено, что адаптация к ТВ проходит легче при постепенном увеличении содержания дейтерия в среде, так как чувствительность к ТВ разных жизненно важных систем различна. Как правило, высокодейтерированные среды содержат протоны от 0,2-10 %. Остаточные протоны в момент адаптации к ТВ облегчают перестройку к изменившимся условиям, предположительно встраиваясь именно в те участки, которые наиболее чувствительны к замене атомов водорода на дейтерий. Также были выявлены существенные различия в морфологии дейтерированных и протонированных клеток *C. vulgaris*. Клетки *C. vulgaris*, выращенные на  $D_2O$ -средах, имели в 2-3 раза большие размеры и более толстую клеточную стенку; чем контрольные клетки, выращенные на обычной протонированной среде с обычной водой; распределение в них ДНК было неравномерным. В некоторых случаях на поверхности мембран наблюдались участки, состоящие из плотно упакованных складок цитоплазматической мембраны, напоминающие мезосомы. Кроме того,

для дейтерированной *C. vulgaris* было также характерно резкое изменение формы клеток и направления их деления. Наблюдавшееся деление не заканчивалось обычным расхождением дочерних клеток, а приводило к образованию атипичных клеток, описанных в работах других авторов [24]. Наблюдаемые морфологические изменения, связанные с торможением роста дейтерированных клеток, обусловлены перестройкой в процессе адаптации к  $D_2O$ . Факт, что дейтерированные клетки имеют более крупные размеры (кажущийся размер в 2-4 раза превосходит размер протонированных клеток), является общебиологическим и наблюдается при выращивании в  $D_2O$  целого ряда других адаптированных нами прокариотических и эукариотических клеток.

Полученные нами данные, в целом, подтверждают устойчивое представление о том, что адаптация к ТВ является фенотипическим явлением, поскольку адаптированные к ТВ клетки возвращаются после их переноса на обычную водную среду к нормальному росту после некоторого лаг-периода. В то же время эффект обратимости роста на водно/тяжёловодородных средах теоретически не исключает возможности того, что этот признак стабильно сохраняется при росте в воде, но "маскируется" при переносе клеток на ТВ. Также не исключается, что определенный генотип детерминирует проявление одного и того же фенотипического признака в средах различного изотопного состава.

При попадании клетки в тяжёловодородную среду, лишённую протонов, из неё не только удаляется протонированная вода за счет реакции обмена  $H_2O-D_2O$ , но и происходит быстрый изотопный (H-D) обмен в гидроксильных (-OH), сульфгидрильных (-SH) и аминогруппах (-NH<sub>2</sub>) молекул всех органических соединений, включая белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и липиды. Известно, что в этих условиях только ковалентная C-H связь не подвергается изотопному обмену и вследствие этого только соединения со связями типа C-D могут синтезироваться *de novo* [25]. В зависимости от того, какое положение занимает атом дейтерия в молекуле, различают первичные и вторичные изотопные эффекты дейтерия, опосредованные межмолекулярными взаимодействиями. В этом аспекте наиболее важными для структуры макромолекулы являются динамические короткоживущие водородные (дейтериевые) связи. Они формируются между соседними атомами дейтерия (водорода) и гетероатомами кислорода, углерода, азота, серы и ТВ из окружающей среды и играют главную роль в поддержании

пространственной структуры макромолекул и в межмолекулярных взаимодействиях.

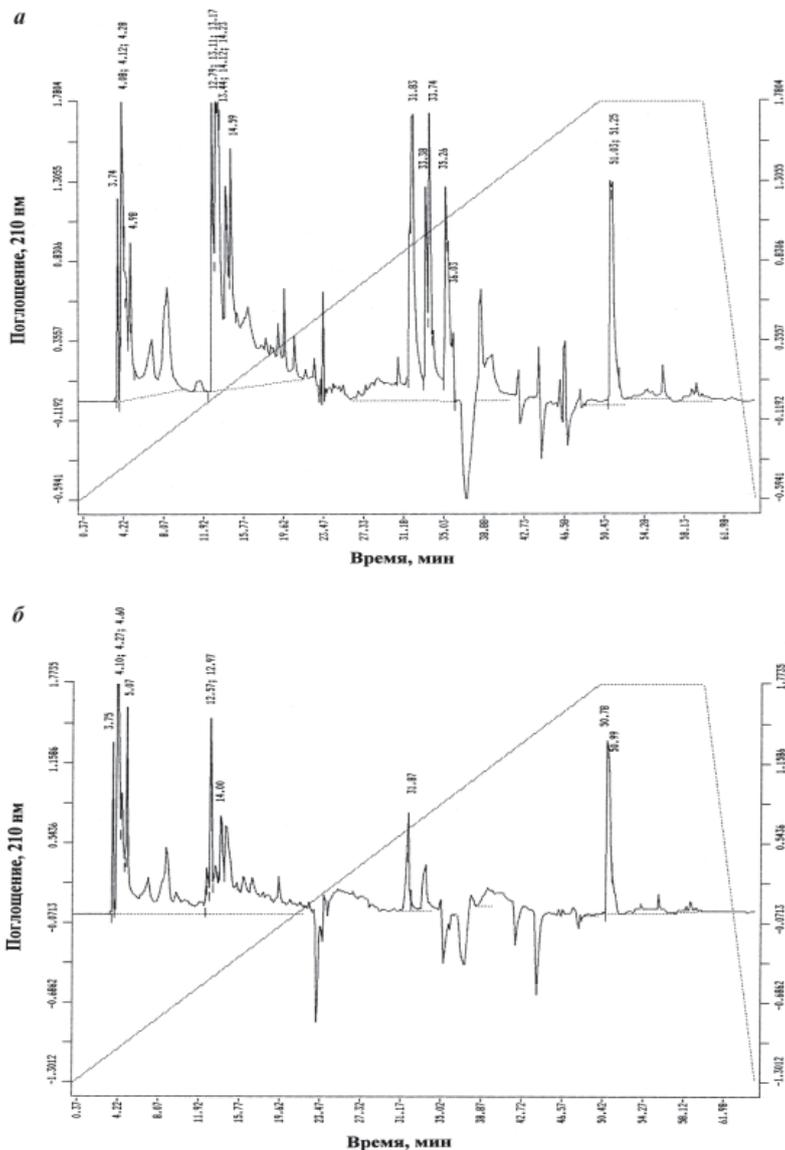
Другое важное свойство определяется пространственной структурой ТВ, имеющей тенденцию сближать гидрофобные группы макромолекул, чтобы минимизировать их эффект на водородную (дейтериевую) связь в присутствии молекул ТВ. Поэтому структура макромолекул белков и нуклеиновых кислот в присутствии  $D_2O$  стабилизируется [26].

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что клетка реализует особые адаптивные механизмы, способствующие функциональной реорганизации работы жизненно-важных систем в ТВ. Так, например, нормальному синтезу и функционированию в ТВ таких важных соединений как нуклеиновые кислоты и белки способствует поддержание их структуры посредством формирования водородных (дейтериевых) связей в молекулах. Связи, сформированные атомами дейтерия, различаются по прочности и энергии от аналогичных водородных связей. Большая прочность связи D-O по сравнению с H-O обуславливает различия в кинетике скоростей химических реакций в тяжёлой и обычной воде. По теории абсолютных скоростей разрыв C-H-связей может происходить быстрее, чем C-D-связей, подвижность иона  $D_3O^+$  меньше, чем подвижность иона  $H_3O^+$ , константа ионизации ТВ меньше константы ионизации обычной воды [27]. Эти эффекты отражаются на химической кинетике и скорости химических реакций в ТВ. Протеолитические реакции и биохимические процессы в  $D_2O$  значительно замедлены.

Ферменты после замещения дейтерием не прекращают своей функции, но изменения в результате изотопного замещения за счет первичного и вторичного изотопных эффектов, а также действие ТВ как растворителя (большая структурированность, плотность и вязкость по сравнению с обычной водой) приводят к изменению скоростей (замедлению) и специфичности ферментативных реакций в  $D_2O$  [28]. Однако существуют и такие реакции, скорость которых в  $D_2O$  выше, чем в  $H_2O$ . В основном это реакции, катализируемые ионами  $D_3O^+$  или  $H_3O^+$  или  $OD^-$  и  $OH^-$ .

Из-за различий в атомной массе водорода и дейтерия в  $D_2O$  синтезируются молекулы с иными структурно-функциональными свойствами, чем молекулы, образованные с участием водорода, и поэтому обладающие другой активностью и физико-химическими свойствами. Эти различия также могут стать причиной различий в синтезах нуклеиновых кислот, которые могут приводить, в свою

очередь к структурным различиям и функциональным изменениям в клетке и её органеллах. Так, структурно-динамические свойства клеточной мембраны, которые в большинстве зависят от качественного и количественного состава липидов, также могут изменяться в присутствии  $D_2O$ . В клетках бактерий мембрана является одним из важнейших инструментов регуляции



**Рис. 2.** Липидные профили протонированных (а) и дейтерированных (б) клеток бактерии *B. subtilis*, выделенных с  $D_2O$ -среды; хроматограф Beckman Gold System (США), детектор Model 126 (США); неподвижная фаза: Ultrasphere ODS 5 мкм;  $4,6 \times 250$  мм; подвижная фаза: линейный градиент 5 мМ  $KH_2PO_4$ -ацетонитрил (показан пунктиром); скорость элюции: 0,5 мл/мин; детекция при  $\lambda=210$  нм. Пики на хроматограммах с временами удерживания 3,75 (вместо 3,74 в контроле); 4,10; 4,27; 4,60 (вместо 4,08; 4,12; 4,28 в контроле); 5,07 (вместо 4,98 в контроле); 12,57; 12,97 (вместо 12,79; 13,11; 13,17 в контроле); 14,00 (вместо 14,59 в контроле); 31,87 (вместо 31,83 в контроле); 33,38; 33,74; 33,26; 36,03; 50,78; 50,99 (вместо 51,03; 51,25 в контроле) соответствуют индивидуальным внутриклеточным липидам.

метаболизма, объединяющая в себе аппараты биосинтеза полисахаридов, трансформации энергии, снабжении клетки питательными веществами и участвующая в биосинтезе белков, нуклеиновых кислот и липидов. Очевидно, при адаптации к ТВ мембраны играют важную роль. Однако до сих пор не выяснено, что происходит с мембранами, как они реагируют на замену  $H^+$  на  $D^+$  и какое это имеет значение для выживания клеток в  $D_2O$ -среде, лишенной протонов. Сравнительный анализ липидного состава дейтерированных клеток грамположитель-

Таблица 4

Аминокислотный состав белкового гидролизата *B. subtilis*, полученный с максимально дейтерированной среды с 98 %  $D_2O$  и 2 % дейтеро-биомассой *B. methylicum*, и уровни дейтерированности молекул

Аминокислота	Выход, % от сухого веса 1 г биомассы	Величина молекулярного иона производных аминокислот $[M]^+$ *	Количество включенных атомов дейтерия в углеродный скелет молекулы**	Уровень дейтерированности молекул, % от общего количества атомов водорода***
Глицин	9,69	324	2	90,0
Аланин	13,98	340	4	97,5
Валин	3,74	369	4	50,0
Лейцин	7,33	383	5	49,0
Изолейцин	3,64	383	5	49,0
Фенилаланин	3,94	420	8	95,0
Тирозин	1,82	669	7	92,8
Серин	4,90	355	3	86,6
Треонин	5,51	не детектировался	-	-
Метионин	2,25	не детектировался	-	-
Аспарагин	9,59	396	2	66,6
Глутаминовая кислота	10,38	411	4	70,0
Лизин	3,98	632	5	58,9
Аргинин	5,27	не детектировался	-	-
Гистидин	3,72	не детектировался	-	-

\* Данные получены для метиловых эфиров N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот

\*\* При подсчёте уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при карбоксильных  $COOH$ - и амино  $NH_2$  группах молекул аминокислот не учитывались из-за лёгкости изотопного ( $H$ - $D$ ) обмена

\*\*\* Прочерк означает отсутствие данных

ной хемогетеротрофной бактерии *B. subtilis*, полученных при росте на ТВ, осуществлённый на хроматографе Beckman Gold System с детектором Model 126 (США) (неподвижная фаза: Ultrasphere ODS 5 мкм;  $4,6 \times 250$  мм; подвижная фаза: линейный градиент 5 мМ  $KH_2PO_4$ -ацетонитрил; скорость элюции: 0,5 мл/мин; детекция при  $\lambda=210$  нм), показал существенные различия в количественном составе мембранных липидов по сравнению с липидами, полученными на обычной воде (рис. 2а,б). Характерно, что в образце, полученном в ТВ, соединения, имеющие времена удерживания 33,38; 33,74; 33,26 и 36,03 мин не детектируются (рис. 2б). Полученный результат на рис. 2б, по видимому, объясняется тем, что клеточная мембрана является одной из первых органелл клетки, которая испытывает воздействие ТВ, и тем самым компенсирует реологические параметры мембраны (вязкость, текучесть, структурированность) изменением не только количественного, но и качественного состава липидов. Аналогичная ситуация наблюдалась и с разделением других природных соединений (белки, аминокислоты, углеводы), выделенных из дейтерированной биомассы.

Анализ гидролизатов белка и внутриклеточных углеводов, выделенных из клеток *B. subtilis*, также выявил различия в биосинтезе на  $D_2O$ . Белковый гидролизат *B. subtilis* представлен пятнадцатью идентифицированными аминокислотами (за исключением пролина, который детектировался при  $\lambda=440$  нм) при выходах аминокислот, сопоставимых с потребностями используемых бактерий в источниках углерода и аминного азота (табл. 4). При этом индикатором, определяющим высокую эффективность включения дейтерия в белковый гидролизат, служат высокие уровни дейтерированности молекул аминокислот, которые варьирует от 49 % для лейцина/изолейцина до 97,5 % для аланина. Смесь внутриклеточных углеводов *B. subtilis*, приведенных в табл. 5 (нумерация приведена по последовательности их элюции с колонки), составляли моносахариды (глюкоза, фруктоза, рамноза, арабиноза), дисахариды (мальтоза, сахароза), а также четыре других неидентифицированных углевода с временами удерживания 3,08 (15,63 %), 4,26 (7,46 %), 7,23 (11,72 %) и 9,14 (7,95 %) мин (не показаны). Выход глюкозы в дейтерированном образце составляет 21,4 % от сухого веса, то есть выше, чем фруктозы (6,82 %), рамнозы (3,47 %), арабинозы (3,69 %) и мальтозы (11,62 %). Их выходы существенно не отличались от контроля на  $H_2O$ , за исключением сахарозы, которая в дейтерированном образце не детектировалась.

Таблица 5

Качественный и количественный состав внутриклеточных углеводов *B. subtilis* при росте на D<sub>2</sub>O

Углевод	Содержание в биомассе, в % от сухого веса 1 г биомассы	
	Протонированный гидролизат*	Гидролизат, полученный в 98 % D <sub>2</sub> O
Глюкоза	20,01	21,40
Фруктоза	6,12	6,82
Рамноза	2,91	3,47
Арабиноза	3,26	3,69
Мальтоза	15,30	11,62
Сахароза	8,62	не детектировалась

\* В качестве контроля использовали гидролизат биомассы *B. subtilis*, полученный в H<sub>2</sub>O-среде.

## Заключение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что эффекты, наблюдаемые при клеточной адаптации к D<sub>2</sub>O, являются комплексными многофакторными феноменами, действующими на многие системы организма. Наблюдаемые изменения клеток при росте на D<sub>2</sub>O сопровождались торможением роста дейтерированных клеток и обусловлены структурно-функциональной перестройкой в процессе адаптации к ТВ. Суммируя полученные данные можно сделать вывод, что чувствительность различных клеточных систем к ТВ отличны. С точки зрения физиологии наиболее чувствительными к замене H<sup>+</sup> на D<sup>+</sup> являются аппарат биосинтеза макромолекул и дыхательная цепь, т. е. именно те клеточные системы, которые используют высокую подвижность протонов и высокую скорость разрыва водородных связей. Последний факт позволяет рассматривать адаптацию к ТВ, как адаптацию к неспецифическому фактору, действующему одновременно на функциональное состояние большого числа систем: пути ассимиляции углеродных субстратов, биосинтетические процессы, транспорт веществ, структуру и функции макромолекул. Многого предстоит ещё сделать в изучении феномена клеточной адаптации к ТВ, но уже сейчас очевидно, что изменяя содержание дейтерия в воде, возможно регулировать ход биологических процессов.

## Литература

1. Мосин О.В. Дейтерий, тяжелая вода, эволюция и жизнь // Водочистка, водоподготовка, водоснабжение. 2009. № 8. С. 64-70.

- Brickwedde F. G. Harold Urey and the discovery of deuterium // *Physics Today*. 1982. V. 35. P. 34.
- Lewis G.N. Concentration of 2H Isotope / Lewis G.N., MacDonald R.T. // *The Journal of Chemical Physics*. 1932. V. 1 (6). P. 341.
- Kushner D.J. Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds / Kushner D. J., Baker A., Dunstall T.G. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1999. V. 77 (2). P. 79–88.
- Thomson J. F. Biological effects of deuterium. New York: Pergamon Press, 1963. 133 p.
- Vertes A. Physiological effect of heavy water. Elements and isotopes: formation, transformation, distribution. Dordrecht.: Kluwer Acad. Publ., 2004. 112 p.
- Crespi H.L. Fully deuterated microorganisms: tools in magnetic resonance and neutron scattering. Synthesis and Applications of Isotopically Labeled Compounds. Proceedings of an International Symposium. Baillie T, Jones JR eds. Elsevier, Amsterdam. 1989. P. 329-332.
- LeMaster D.M. Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins // *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 1990. V. 19. P. 243-266.
- MacCarthy P. Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate experiment // *J. Chem. Educ.* 1985. V. 62 (7). P. 633.
- Lis G. High-Precision Laser Spectroscopy D/H and <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O Measurements of Microliter Natural Water Samples / Lis G., Wassenaar L.I., Hendry M.J. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80 (1). P. 287-293.
- Мосин О.В. Масс-спектрометрическая оценка уровня включения <sup>2</sup>H и <sup>13</sup>C в молекулы аминокислот бактериальных объектов / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, Т.А. Егорова, В.И. Швец // *Биоорганическая химия*. 1996. Т. 22. № 10-11. С. 856-869.
- Мосин О.В. Изучение биосинтеза аминокислот штаммом *Brevibacterium methylicum* при росте на средах, содержащих тяжелую воду и дейтерометанол / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, Т.А. Егорова, А.М. Юркевич, В.И. Швец // *Биотехнология*. 1996. № 3. С. 3-12.
- Шатенштейн А.И. Изотопный анализ воды, 2 изд., М.: Изд-во. 1957. 91 с.
- Казавчинский Я.З. Тяжелая вода, теплофизические свойства, М.: Атомиздат, 1963. 89 с.
- Кишенбаум И. Тяжелая вода. Физические свойства и методы анализа: Пер. с англ. М.: Атомиздат, 1953. 154 с.
- Мосин О.В. Рост бактерии *Bacillus subtilis* на высокодейтерированной среде / О.В. Мосин, Л.А. Казаринова, К.А. Преображенская, Д.А. Складнев, Д.В. Чеботаев,

- А.М. Юркевич, В.И. Швец // Биотехнология. 1996. № 4. С. 19-27.
17. Денько Е.И. Действие тяжёлой воды ( $D_2O$ ) на клетки животных, растений и микроорганизмы. // Усп. совр. биол. 1970. Т. 70. № 4. С. 41.
18. Стом Д.И. Влияние воды с измененным количеством дейтерия на красного калифорнийского гибрида (*Eusenia fetida Andrei Bouche*) / Д.И. Стом, А.Л. Пономарева, О.Ф. Вятчина // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. 2006. № 6 (52) С. 167-169.
19. Мосин О.В. Исследование физиологической адаптации бактерий на тяжёловодородной среде / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, В.И. Швец // Биотехнология. 1999. № 8. С. 16-23.
20. Mosin O.V. Biosynthesis of  $^2H$ -labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* / Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I. // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 1998. V. 62. № 2. P. 225-229.
21. Складнев Д.А. Метилотрофные бактерии – источники изотопномеченых  $^2H$  и  $^{13}C$ -аминокислот / Д.А. Складнев, О.В. Мосин, Т.А. Егорова, С.В. Еремин, В.И. Швец // Биотехнология. 1996. № 5. С. 25-34.
22. Мосин О.В. Включение дейтерированных ароматических аминокислот в молекулу бактериородопсина *Halobacterium halobium* / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, В.И. Швец // Прикл. биохим. микробиол. 1999. Т. 35. № 1. С. 34-42.
23. Мосин О.В. Исследование методов биотехнологического получения аминокислот, белков и нуклеозидов, меченных стабильными изотопами  $^2H$  и  $^{13}C$  с высокими уровнями изотопного обогащения. Автореф. Дис. канд.хим.наук. М.: МГАТХТ им. М.В. Ломоносова. 1996. 26 с.
24. Ерёмин В.А. Выращивание бактерий *Micrococcus lysodeikticus* на дейтерированной среде / В.А. Ерёмин, Л.Н. Чекулаева // Микробиология. 1978. Т. 14. С. 125-136.
25. Мосин О.В. Методы получения белков и аминокислот, меченных стабильными изотопами  $^2H$ ,  $^{13}C$  и  $^{15}N$ . / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, В.И. Швец // Биотехнология. 1996. № 3. С. 12-32.
26. Cioni P. Effect of Heavy Water on Protein Flexibility / Cioni P., Strambini G.B. // Biophysical J. 2002. V. 82. № 6. P. 3246-3253
27. Лобышев В.Н. Изотопные эффекты  $D_2O$  в биологических системах / В.Н. Лобышев, Л.П. Калиниченко. М.: Наука, 1978. 215 с.
28. Cleland W.N. Isotope Effects on Enzyme-Catalyzed Reactions / Cleland W.N., O'Leary M.H, Northrop D.D. University Park Press, Baltimore, London, Tokyo, 1976. 303 p.



O.V. Mosin, I. Ignatov

## ISOTOPE EFFECTS OF DEUTERIUM IN BACTERIAL AND MICROALGAE CELLS AT GROWTH ON HEAVY WATER ( $D_2O$ )

Isotope effects of deuterium in cells of various taxonomic groups of microorganisms realizing methylotrophical, chemo heterotrophical, photo organotrophical, and photosynthetic ways of assimilation of carbon substrates (methylotrophic bacteria, halobacteria, green microalgae) are investigated at growth on heavy water ( $D_2O$ ) media. The method of step by step adaptation technique of cells to heavy water is developed, consisting in plating of cells on 2 % agarose nutrient media

containing increasing gradient of concentration of heavy water (from 0; 24,5; 49,0; 73,5 up to 98 %  $D_2O$ ) and the subsequent selection of stable to  $D_2O$  cells. Obtained from growth media with a low gradient of concentration of  $D_2O$ , cells were further transferred on growth media with higher gradient of  $D_2O$  concentration, up to 98 %  $D_2O$ . As the result adapted to maximum concentration of  $D_2O$  cells were obtained. They represent biological material of which instead of hydrogen contained deuterium. The

effects observed at growth of cells was shown to possess a complex multifactorial character and are connected to changes of physiological parameters – magnitude of log-phase, time of cellular generation, output of biomass, a parity of synthesized amino acids, proteins, carbohydrates and lipids, and an evolutionary level of the organization of investigated object as well.

**Key words:** deuterium, heavy water, adaptation, bacteria, microalgae