

каналізаційно-очисних споруд, прибережних захисних смуг, санітарного стану водоохоронних зон, а також забруднення територій населених пунктів і засмічення річок побутовими та іншими відходами. Перевищення нормативних значень ГДК по басейну ріки Дністер спостерігається по: азоту амонійному, БСК₅, ХСК, сульфатах (в р. Зубра), залізу (загальному), нітриах, фосфатах.

Ключові слова: Дністер, якість води, джерела забруднення.

УДК 613.22(282)(477.85)

САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ И ГИДРОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДЫ ВВЕРХОВЬЯХ РЕКИ ДНЕСТР

**Е.В. Лотоцкая, В.А. Кондратюк, Г.А.
Крицкая, В.В. Лотоцкий**

*ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет
имени И.Я. Горбачевского МОЗ Украины»*

В результате проведенного анализа состояния воды в верховье р. Днестр в пределах Львовской области с целью обобщения основных мероприятий по оценке и улучшению ее состояния как источника хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования установлено, что она подвергается значительному негативному влиянию за счет загрязнения почвы, атмосферы, изменения ландшафтной структуры и техногенной перегрузки территории, неэффективной работы канализационно-очистных сооружений, прибрежных защитных полос, санитарного состояния водоохранных зон, а также загрязнение территорий населенных пунктов и рек бытовыми и другими отходами. Превышение нормативных

УДК 579.871.08. 577.112.385.4.08

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ДЕЙТЕРИЯ НА КЛЕТКИ ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ

***О. В. Мосин, **И. И. Игнатюв**

**Московский государственный университет прикладной биотехнологии; **Научно-исследовательский Центр медицинской биофизики (НИЦМБ), София, Болгария; **Европейская академия естественных наук (Ганновер, ФРГ)*

Введение

Одним из интереснейших биологических феноменов является способность некоторых микроорганизмов расти в питательных средах с тяжелой водой (D₂O) [1]. D₂O обладает высоким экологическим потенциалом вследствие отсутствия радиоактивности, что способствует ее использованию в качестве изотопного индикатора в химии, биологии и медицине [2]. В природных водах соотношение D/H составляет 1 : 5500 (в предположении, что весь дейтерий находится в форме D₂O) [3]. В действительности дейтерий присутствует в форме D₂O лишь в концентрированных растворах. При небольших концентрациях в воде он присутствует в форме "полутяжелой"

значений ПДК по бассейну реки Днестр наблюдается по: азоту аммонийному, БПК₅, ХПК, сульфатах (в р. Зубра), железу (общему), нитритах, фосфатах.

Ключевые слова: Днестр, качество воды, источники загрязнения

SANITARY AND HYDROCHEMICAL CHARACTERISTICS OF WATER IN THE HEADWATERS OF THE RIVER DNISTER

**O.V. Lototska, V.A. Kondratiuk, G.A.
Krytska, V.V. Lototskiy**

*SHEI "Ternopil State Medical University by I. Ya.
Horbachevsky Health Ministry of Ukraine"*

A result of conducted analysis of water in the headwaters of the river dnister within the Lviv region in order to generalize the main measures of evaluation and improvement of its condition as a source of drinking and cultural and community water found that it suffers from a severe negative impact due to soil and atmosphere contamination, changes in landscape structure and technogenic overload area due to inefficient sewage treatment plants, coastal protection strips, sanitary condition of water protection zones and pollution of populated areas and contamination of rivers and other household waste timber forest along streams in the mountains. Exceeding norms in the MAC in the Dniester river basin observed by: ammonia nitrogen, BOD₅, COD, sulfate (in the river Zubra), iron (total), nitrite, phosphate.

Keywords: Dnister, water quality, sources of pollution

Впервые поступила в редакцию 06.02.2014 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования.

ионов различие подвижностей в H_2O и D_2O составляет около 18 % [6]. Константы диссоциации (K_a) слабых кислот и оснований снижаются в D_2O по сравнению с H_2O , а растворимость и растворяющая способность D_2O для многих неорганических и органических веществ, как правило, ниже, чем у H_2O , хотя известны и обратные факты.

Систематическое изучение воздействия D_2O на клетки животных, растений и микроорганизмов в нашей стране начато сравнительно недавно [7]. Эксперименты показали, что D_2O действует негативно на жизненные функции организмов, замедляет клеточный метаболизм и ингибирует митоз в стадии профазы; это происходит даже при использовании обычной природной воды с повышенным содержанием D_2O или HDO [8]. Клетки животных способны выдерживать до 30 % D_2O , растений – 50 % D_2O , микроводорослей – 70 % D_2O , а клетки простейших и микроорганизмов – 95 % D_2O [9].

С развитием новых биотехнологических подходов появилась возможность использовать в качестве биомоделей для научных целей и прикладных исследований, в т.ч. для направленного синтеза D-меченных природных соединений, адаптированные к D_2O клетки микроорганизмов и микроводорослей. Традиционным методом при этом является выращивание микроорганизмов в средах, содержащих максимальные концентрации D_2O и дейтерированных субстратов, например, [D]метанол [10]. В процессе роста клеток в D_2O в них синтезируются молекулы биологически важных природных соединений (ДНК, белки, аминокислоты, нуклеозиды, пигменты, углеводы, жирные кислоты), атомы водорода при углеродных скелетах которых полностью замещены на дейтерий. Их выделяют из дейтерированной биомассы, полученной на средах с высокими концентрациями D_2O и дейтерированными субстратами, используя комбинацию физико-химических методов выделения – гидролиз, осаждение и экстракцию органическими растворителями и хроматографическую очистку методом колоночной хроматографии с применением различных сорбентов. Такие дейтерированные молекулы претерпевают структурно-адаптационные модификации, необходимые для нормального функционирования клетки в D_2O .

Биологическая адаптация к D_2O интересна не только с научной точки зрения, но она также позволяет получать уникальный дейтерированный биологический материал для диагностических биомедицинских целей, а также решения задач молекулярной организации клетки методом ЯМР-спектроскопии [11]. Тенденции к применению дейтерия в качестве изотопной метки обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации дейтерия в молекуле методами высокого разрешения: спектроскопией ЯМР [12], ИК-спектроскопией [13] и масс-спектрометрией [14]. Это позволило за последние годы существенно повысить эффективность проведения многочисленных биомедицинских исследований с D_2O 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 D-меченных природных соединений в условиях максимально дейтерированных сред с D_2O . Целью работы являлось изучение изотопных эффектов D_2O в клетках различных таксономических групп микроорганизмов и микроводорослей, осуществляющих митотрофный, хемогетеротрофный, фотоорганогетеротрофный и фотосинтетический пути ассимиляции углеродных субстратов.

Экспериментальная часть. Объекты исследования и методы

Объектами исследования являлись две хемогетеротрофные грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* и *Brevibacterium methylicum*, последняя способна к митотрофии, 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 митотрофных бактерий, ассимилирующий метанол по РМФ-циклу фиксации углерода.

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

3. *Halobacterium halobium* ET 1001, фотоорганогетеротрофный каротиноидсодержащий штамм экстремальных галобактерий, синтезирующий трансмембранный белок бактериородопсин.

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

Для приготовления питательных сред применяли D_2O (99,8 ат. % D), DCl (95,5 ат. % D) и [D]метанол (97,5 ат. % D), полученные из Российского научно-исследовательского центра "Изотоп" (Санкт-Петербург, РФ). Неорганические соли и D, L- глюкозу (Reanal, Венгрия) предварительно перекристаллизовывали в D_2O , D_2O дистиллировали в присутствии $KMnO_4$ с последующим контролем изотопной чистоты 1H ЯМР-спектроскопией на приборе Bruker WM-250 ("Bruker Daltonics", ФРГ) (рабочая частота 70 МГц, внутренний стандарт Me_4Si).

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

1. Минимальная среда M9 для выращивания факультативных митотрофных бактерий *B. methylicum*, на основе ступенчато-увеличивающихся концентраций D_2O (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98 об. %¹ D_2O) и 2% метанолом/

¹ Здесь и далее использованы проценты по объему, об. %

[D]метанолом (г/л): KH_2PO_4 – 3; Na_2HPO_4 – 6; NaCl – 0,5; NH_4Cl – 1.

2. Среда ГС1 для выращивания хемогетеротрофной бактерии *B. subtilis* (на основе 99,8% D_2O): глюкоза 120; гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum* – 25; NH_4NO_3 – 30; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 20; CaCO_3 – 20.

3. Среда ГС2 для выращивания фотоорганогетеротрофной галобактерии *H. halobium* (на основе 99,8% D_2O): NaCl – 250; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 20; KCl – 2; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,065; цитрат натрия – 0,5; гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum* – 20, витамины (биотин $1 \cdot 10^{-4}$; фолиевая кислота – $1,5 \cdot 10^{-4}$; витамин B_{12} – $2 \cdot 10^{-5}$).

4. Среда Тамия для выращивания фотосинтезирующей зеленой микроводоросли *C. vulgaris* (на основе 99,8% D_2O): KNO_3 – 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,5; KH_2PO_4 – 1,25; FeSO_4 – 0,003; микроэлементы ($\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – $3 \cdot 10^{-4}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,065; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $4 \cdot 10^{-5}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – $5 \cdot 10^{-5}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – $5 \cdot 10^{-6}$).

Стартовым материалом для выращивания хемогетеротрофных бактерий и галобактерий являлась дейтеро-биомасса факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum*, полученная в условиях многоступенчатой адаптации на твердых (2 %-й агар) средах М9 с D_2O . Полученную 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) ($\text{pH} = 7,0$) и использовали в качестве источника дейтерированных ростовых субстратов для адаптации и выращивания хемоорганогетеротрофных бактерий *B. subtilis* и галобактерий *H. halobium*.

Выращивание грамположительных бактерий *B. subtilis* проводили на ГС1 среде при 34°C в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл с наполнением средой до 50 мл в условиях интенсивной аэрации в орбитальном шейкере 380-S (100 об/мин) ("Biograd", Польша), используя в качестве источников дейтерированных субстратов D_2O и гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum*, полученной

на максимально дейтерированной среде. Галобактерии *H. halobium* выращивали в аналогичных условиях на ГС2-среде при 37°C при освещении лампами дневного света ЛДС-40-2 (40 Вт) (ООО "Альфа-Электро", Россия). Выращивание микроводоросли *C. vulgaris* проводили на синтетической среде Тамия при 32°C в фотореакторе с барботажем CO_2 . Рост оценивали по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твердых агаризованных сред с D_2O , а также по величине ОП суспензии клеток, измеренной на спектрофотометре Beckman-DU6 ("Beckman Coulter", США) при $\lambda = 620$ нм. После 6–7 суток культивирования клетки отделяли центрифугированием (10000 об/мин, 20 мин) на центрифуге Т-24 ("Heracles", ФРГ). Биомассу промывали D_2O и экстрагировали смесью органических растворителей хлороформ–метанол–ацетон = 2 : 1 : 1, об.% для отделения 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. Из культуральных жидкостей (КЖ) выделяли секретируемые дейтерированные аминокислоты и рибонуклеозиды. [D]рибоксин выделяли из КЖ *B. subtilis* адсорбцией активированным углем (12 ч., 4°C), экстракцией 0,3 М NH_4 -форматным буфером ($\text{pH} = 8,9$) и перекристаллизацией в 80 %-ном этаноле ($[\alpha]_{\text{D}^{20}} = +1,61^\circ$, выход 3,1 г/л (80 %)). БР выделяли из фракции пурпурных мембран *H. halobium* по методу Остерхельта, усовершенствованному авторами [15].

Гидролиз дейтерированных белков биомассы проводили при 110°C в течение 24 ч в запаянных стеклянных ампулах в 50-ти кратном избытке 6 н DCl (в D_2O), используя 10 мг сухой дейтеро-биомассы. Реакционную массу суспендировали в горячей D_2O , фильтровали. Гидролизат упаривали в роторном испарителе РВО-64 (Венгрия) при 60°C . Остатки DCl удаляли в эксикаторе путем выдерживания над твердым NaOH . Для проведения гидролиза внутриклеточных углеводов 50 мг сухой делипидизован-

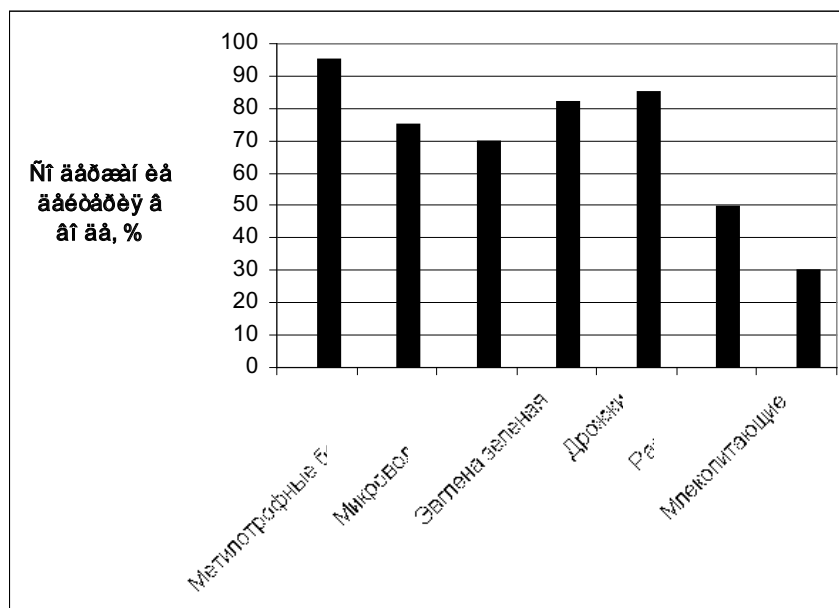


Рис. 1. Выживаемость клеток изученных микроорганизмов в воде с различными содержаниями дейтерия (по данным экспериментальных исследований авторов)

ной дейтеро-биомассы помещали в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мл D₂O и 1,6 мл 25 %-ной H₂SO₄ и кипятили с обратным водяным холодильником в течении 90 мин. По охлаждении реакционную смесь суспендировали в 50 мл D₂O и нейтрализовали 2 н. раствором Ba(OH)₂ (в D₂O) до pH = 7,0. Выпавший осадок BaSO₄ отделяли центрифугированием (15000 об/мин, 5 мин), супернатант декантировали и упаривали в роторном испарителе при 60 °C.

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

Анализ углеводов осуществляли на жидкостном хроматографе Knauer (ФРГ), снабженным насосом Gilson (ФРГ) и рефрактометром Waters K 401 (ФРГ); неподвижная фаза: Separon NH₂, 10 мкм; подвижная фаза: CH₃CN–H₂O, (75 : 25 об. %); скорость подачи: 0,6 мл/мин.

Жирные кислоты анализировали на хроматографе Beckman Gold System (США), снабженным насосом Model 166 и детектором Model 126 (США); неподвижная фаза: Ultrasphere ODS 5 мкм; 4,6 x 250 мм; подвижная фаза: линейный градиент 5 mM KH₂PO₄–CH₃CN; 100 % в течении 50 мин; скорость подачи: 0,5 мл/мин; детекция при λ = 210 нм.

Масс-спектры FAB регистрировали на импульсном масс-спектрометре VG-70 SEQ ("Fisons VG Analytical", США) с цезиевым источником Cs+ на глицериновой матрице с ускоряющим напряжением 5 кВ и ионным током 0,6–0,8 мА. 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 напряже-

нии 70 эВ и температуре катодного источника 180–200 °C по ранее разработанной нами методике [16]. Расчет уровней дейтерированности молекул проводили по соотношению вкладов пиков молекулярных ионов [M]⁺ дейтерированных соединений, выделенных с D₂O-средах и контроля, полученного в H₂O-среде.

Результаты и обсуждение

При воздействии воды на биологические объекты их реакция изменяется в зависимости от изотопного состава воды и величины изотопных эффектов, определяемых разницей констант скоростей химических реакций kh/kd в H₂O и D₂O. Самые большие изотопные эффекты с соотношением $kh/kd = 6–8$ наблюдаются в D₂O для C–H/C–D, N–H/N–D и O–H/O–D связей. Изотопные эффекты оказывают влияние не только на физико-химические свойства, но и на биологические свойства D₂O. Эксперименты с D₂O показали (рис. 1), что водоросли и микроводоросли способны расти на 70 и 75 % D₂O, растения на 50 % D₂O, дрожжи на 85 % D₂O, метилотрофные бактерии – 75 % D₂O, хемогетеротрофные бактерии – 82 % D₂O, археобактерии – 95 % D₂O, клетки млекопитающих – 30 % D₂O.

В ходе эксперимента были получены адаптированные к максимальным концентрациям D₂O клетки, относящихся к различным таксономическим группам микроорганизмов, реализующих метилотрофный, хемогетеротрофный, фотоорганогетеротрофный и фотосинтетический пути ассимиляции углеродных субстратов – факультативные метилотрофные бактерии *B. methylicum*, хемогетеротрофные бактерии *B. subtilis*, галобактерии *H. halobium* и микроводоросли *C. vulgaris*.

Выбор ассимилирующих метанол факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* был связан с разработкой новых биотехнологий получения метилотрофной дейтеро-биомассы на [D]метаноле и D₂O и ее дальнейшего использования как источника

Таблица 1

Изотопный состав ростовых сред и характеристики роста метилотрофных бактерий *B. methylicum* в процессе адаптации к D₂O

№ опыта	Компоненты среды, об. %				Лag-период, ч	Выход микробной биомассы, % от контроля	Время генерации, ч
	H ₂ O	D ₂ O	мета-нол	[D] мета-нол			
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

Примечание: Данные опытов 1–10 приведены при выращивании бактерий в минимальных средах M9, содержащих 2 % метанол/[D]-метанол и указанные концентрации D₂O. Данные опыта 10' приведены для адаптированных к максимальному содержанию дейтерия в среде бактерий при выращивании в среде с максимальными концентрациями D₂O. В качестве контроля использовали опыт 1, где применяли обычную воду и метанол.

дейтерированных ростовых субстратов для выращивания других штаммов-продуцентов.

Выбор фотоорганогетеротрофных галобактерий *H. halobium* был обусловлен перспективами дальнейшего выделения ретинолсодержащего трансмембранного белка бактериородопсина (БР) – хромопротеида из 248 аминокислотных остатков, содержащего в качестве хромоформной группы эквимолекулярную смесь 13-*цис*- и полностью 13-*транс*-ретинольного C_{20} -каротиноида – аналога витамина А, связанного с остатком Lys-216 и определяющего пурпурно-красный цвет галобактерий [17]. БР выполняет в клетках галобактерий роль АТФ-зависимой транслоказы, создающей электрохимический градиент протонов H^+ на поверхности клеточной мембраны, энергия которого используется клеткой для синтеза АТФ в анаэробном фотосинтетическом фосфорилировании.

Использование хемогетеротрофных бактерий *B. subtilis* определялось необходимостью препаративного выделения продуцируемого этой бактерией дейтерированного рибонуклеозида – рибоксина (уровень дейтерированности 62,5 ат. % D) для медицинской диагностики, а использование фотосинтезирующей микроводоросли *C. vulgaris* было связано с исследованием биосинтеза в D_2O дейтерированных хлорофилловых и каротиноидных пигментов (уровень дейтерированности 95–97 ат. % D) для их последующего использования для реконструкции искусственных мембран.

Для адаптации клеток к D_2O использовали ступенчато увеличивающийся градиент концентрации D_2O , поскольку предполагалось, что постепенное привыкание организма к дейтерию будет оказывать благоприятный эффект на ростовые и физиологические параметры. Стратегия адаптации к D_2O показана в табл. 1 на примере метилотрофных бактерий *B. methylicum*, дейтеро-биомасса которых использовалась в дальнейших экспериментах в качестве дейтерированных ростовых субстратов для выращивания хемогетеротрофных и фотоорганогетеротрофных бактерий.

Стратегия адаптации к D_2O заключалась в рассеивании исходных клеток микроорганизмов на чашках Петри с твердыми агаризованными средами с 2 %-м агаром со ступенчатом увеличении концентрации D_2O в них (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 . На конечном этапе на максимально дейтерированной среде с 98 %-ной D_2O были выделены отдельные клеточные колонии, представляющие собой потомство одной единственной клетки, устойчивой к действию D_2O . Затем колонии переносили в жидкие питательные среды такого же состава, приготовленные на основе D_2O 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 *lag*-периода, времени

клеточной генерации и выходов микробной биомассы, а также по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твердых агаризованных сред с D_2O и подсчету клеток.

Все адаптированные к D_2O клетки сохранили способность размножаться в D_2O -средах с сохранением биосинтетических способностей к синтезу аминокислот, белков и нуклеозидов. Общей особенностью адаптированных к D_2O клеток микроорганизмов при росте в D_2O -средах было увеличение *lag*-периода и времени клеточной генерации при уменьшении выходов микробной биомассы. Значения этих параметров коррелировали с уровнями содержания D_2O в ростовых средах, с фиксированием самых низких значений в максимально дейтерированной среде (опыты 9, 10, табл. 1). В отличие от адаптированных к D_2O микроорганизмов, рост исходных микроорганизмов в максимально дейтерированных средах с D_2O ингибировался дейтерием. Выходы биомассы в максимально дейтерированных средах составили 85–90 % для разных таксономических групп микроорганизмов. Адаптированные микроорганизмы имели несколько сниженные уровни накопления микробной биомассы и увеличенные времена клеточной генерации при росте в D_2O -средах.

Полученный результат в опытах по адаптации метилотрофных бактерий *B. methylicum* к D_2O позволил использовать гидролизаты метилотрофной дейтеро-биомассы, полученной в процессе многоступенчатой адаптации к D_2O , в качестве дейтерированных ростовых субстратов для выращивания 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 % [18]. При разработке питательных сред на основе дейтеро-биомассы метилотрофных бактерий *B. methylicum* 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 [19]. Причем эта способность сохраняется при росте на средах, содержащих D_2O и [D]метанол. Чтобы обеспечить высокие выходы этих соединений и минимизировать реакции обратного изотопного (H–D) обмена в аминокислотных остатках молекул белков, гидролиз дейтеро-биомассы проводили автоклавированием в 0,5 н DCI (в D_2O).

Учитывая способы ассимиляции углеродных субстратов, адаптацию хемогетеротрофных *B. subtilis* и галобактерий *H. halobium* проводили путем рассеивания исходных бактерий до отдельных колоний на соответствующих твердых (2 %-ный агар) питательных ГС1 и ГС2 средах на основе 99,8 % D_2O и гидролизата дейтеро-биомассы *B. methylicum* и последующей селекцией колоний по признаку устойчивости к D_2O . В отличие от D_2O D-субстраты из гидролизата дейтеро-биомассы не

оказывали существенного влияния на параметры роста исследуемых микроорганизмов. Выход [D]рибоксина, зафиксированный при росте *B. subtilis* на максимально дейтерированной ГС1-среде составил 3,9 г/л при уровне ассимиляции глюкозы из КЖ 40 г/л. Фракционирование [D]рибоксина из КЖ штамма продуцента производили адсорбцией/десорбцией на поверхности активированного угля, экстракцией 0,3 М/л NH_4 -формиатным буфером (рН = 8,9) с последующей перекристаллизацией в 80 %-ном этаноле и колоночной ионообменной хроматографии на катионообменнике AG50WX 4, уравновешенным 0,3 М NH_4 -формиатным буфером с 0,045 М/л NH_4Cl . Уровень дейтерированности рибоксина по данным масс-спектрометрии FАВ составил пять атомов дейтерия (62,5 ат. % D) с включением трех атомов дейтерия в рибозный и двух атомов дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы.

Для адаптации к D_2O микроводоросли *C. vulgaris* использовали жидкие минеральные среды Тамия, содержащие 25, 50, 75 и 98 % D_2O . В случае с *C. vulgaris* и *H. halobium* и использовали освещение лампами дневного света ЛБ-40, поскольку оба микроорганизма развиваются в присутствии света. Выделенные селекцией отдельные колонии клеток, устойчивые к D_2O , выращивали в жидких средах аналогичного состава с 99,8 ат. % D_2O для наработки дейтеро-биомассы.

При выращивании *H. halobium* в ГС2-среде в клет-

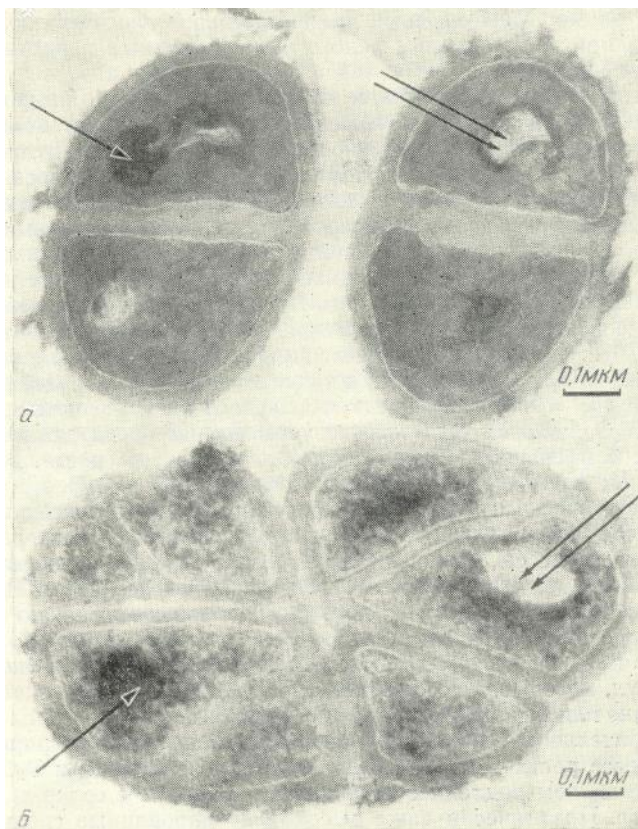


Рис. 2. Электронные микрофотографии клеток бактерии *Micrococcus lysodeikticus*: (а) – протонированные клетки; (б) – дейтерированные клетки, полученные с тяжеловодородной среды [20].

ках синтезировался каротиноидсодержащий фиолетовый пигмент, по спектральному соотношению белкового и хромофорного фрагментов молекулы D_{280}/D_{568} 1,5 : 1 идентичный природному БР. Рост галобактерий в D_2O -среде ингибировался незначительно по сравнению с контрольной протонированной средой, что существенно упрощает оптимизацию условий наработки дейтерированной биомассы галобактерий, заключающейся в выращивании галобактерий в дейтерированной среде с 20 %-ным гидролизатом дейтеро-биомассы *B. methylicum*, выделением фракции пурпурных мембран, отделением низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, каротиноидов и липидов с последующим растворением белка в 0,5 %-ном додецилсульфате натрия (ДДС-Na) и осаждением метанолом. Суммарный уровень дейтерированности БР, рассчитанный по уровням дейтерированности аминокислот белкового гидролизата, составил 95 ат. % D.

Проведенные нами исследования свидетельствуют, что способность к адаптации к D_2O 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 приспосабливается к присутствию дейтерия в среде. Так, из изученных объектов наиболее примитивными в эволюционном плане (строение клеточной мембраны, биохимия, устойчивость к внешним факторам среды) являются галобактерии, относящиеся к археобактериям, стоящие обособленно как от прокариотических, так и от эукариотических микроорганизмов, обнаруживающих повышенную устойчивость к D_2O и практически не нуждающиеся в адаптации к D_2O , что нельзя сказать о микроводорослях, которые, будучи эукариотами, труднее всех адаптируются к D_2O и проявляют ингибирование роста в 70–75 % D_2O .

В процессе адаптации к D_2O немаловажную роль играет состав питательной среды, поскольку причинами ингибирования роста клеток и их гибели могут стать изменения соотношения синтезируемых метаболитов: аминокислот, белков и углеводов в D_2O -средах. Отмечено, что адаптация к D_2O проходит легче в комплексных средах, содержащих белково-витаминный концентрат (БВК) дрожжей, при постепенном увеличении содержания дейтерия в среде, так как чувствительность к D_2O разных жизненно важных систем различна. Как правило, даже высокодейтерированные среды содержат протоны от 0,2–10 % H. Остаточные протоны в момент адаптации к D_2O облегчают перестройку к изменившимся условиям, предпочитительно 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

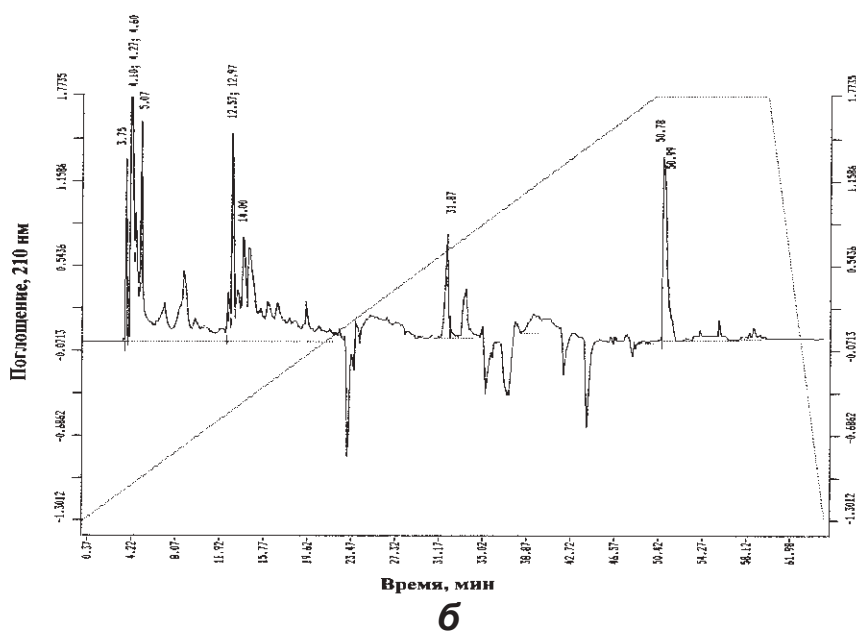


Рис. 3. Профили жирных кислот протонированных (а) и дейтерированных (б) клеток бактерии *B.*

subtilis, выделенных с максимально дейтерированной D₂O-среды (ГС1-среда); хроматограф Beckman Gold System (США), детектор Model 126 (США); неподвижная фаза: Ultrasphere ODS 5 мкм; 4,6 x 250 мм; подвижная фаза: линейный градиент 5 мМ КН₂РО₄–ацетонитрил (показан пунктиром); скорость элюции: 0,5 мл/мин; детекция при λ = 210 нм. Пики на хроматограммах с временами удерживания 3,75 мин (вместо 3,74 мин 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 жирным кислотам

Таблица 2

Аминокислотный состав белкового гидролизата *B. subtilis*, полученный с максимально дейтерированной среды* и уровни дейтерированности молекул

Амино-кислота	Выход, % от сухого веса 1 г биомассы	Величина молекулярного иона производных аминокислот [М] ^{***}	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	-	-

Примечания:

* Данные получены на ГС1-среде с 99,8 % D₂O и 2 % гидролизатом дейтеро-биомассы *B. methylicum*; ** Данные получены для метиловых эфиров N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот; ** При подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при карбоксильных СООН- и амино NH₂ группах молекул аминокислот не учитывались из-за лёгкости изотопного (H-D) обмена; *** Прочерк означает отсутствие данных.

Таблица 3

Качественный и количественный состав внутриклеточных углеводов *B. subtilis* при росте в максимально дейтерированной среде* и уровни дейтерированности молекул

Углевод	Содержание в биомассе, в % от сухого веса 1 г биомассы		Уровни дейтерированности молекул, ат. %
	Протонированный образец (контроль)	Образец, полученный в 99,8 %-ной D ₂ O	
Глюкоза	20,01	21,40	80,6
Фруктоза	6,12	6,82	85,5
Рамноза	2,91	3,47	90,3
Арабиноза	3,26	3,69	90,7
Мальтоза	15,30	11,62	-
Сахароза	8,62	не детектировалась	

Примечание: *Данные получены на ГС1 среде с 99,8 % D₂O и 2 % гидролизатом дейтеро-биомассы *B. methylicum*.

различаются по прочности и энергии от аналогичных водородных связей. Несколько большая прочность связи D–O по сравнению с H–O обуславливает различия в кинетике реакций в D₂O и H₂O. По теории абсолютных скоростей разрыв C–H-связей происходит быстрее, чем C–D-связей, подвижность иона D⁺ меньше, чем подвижность H⁺, константа ионизации D₂O несколько меньше константы ионизации H₂O [23]. Эти факторы приводят к замедлению скоростей ферментативных реакций в D₂O [24]. Однако существуют и такие реакции, скорость которых в D₂O выше, чем в H₂O. В основном это реакции, катализируемые ионами D₃O⁺ или H₂O⁺ или OD⁻ и OH⁻.

Отмечено, что вследствие изотопных эффектов дейтерия в D₂O синтезируются молекулы с другими структурно-функциональными свойствами и активностью, чем молекулы, образованные с участием водорода. Эти различия также могут стать причиной различий в синтезах нуклеиновых кислот, которые могут приводить 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 жирных кислот, также могут изменяться в присутствии D₂O. В клетках бактерий мембрана является одним из важнейших инструментов регуляции метаболизма, объединяющая в себе аппараты биосинтеза полисахаридов, трансформации энергии, снабжении клетки питательными веществами и участвующая в биосинтезе белков, нуклеиновых кислот и жирных кислот. Очевидно, при адаптации к D₂O мембраны играют важную роль. Однако окончательно не выяснено, что происходит с мембранами, как они реагируют на замену H⁺ на D⁺ и какое это имеет значение для выживания клеток в D₂O-среде, лишенной протонов.

Сравнительный анализ состава жирных кислот дейтерированных клеток хемогетеротрофной бактерии *B. subtilis*, полученных при росте в максимально дейтерированной D₂O-среде (ГС1-среда), осуществлённый методом ВЭЖХ, показал существенные различия в количественном составе жирных кислот по сравнению с контролем, полученным на обычной воде (рис. 3 а,б). Характерно, что в образце, полученном в D₂O-среде,

соединения, имеющие времена удерживания 33,38; 33,74; 33,26 и 36,03 мин, не детектируются (рис. 3 б). Полученный результат, по видимому, объясняется тем, что клеточная мембрана является одной из первых органелл клетки, испытывающей воздействие D₂O, и тем самым компенсирует реологические параметры мембраны (вязкость, текучесть, структурированность) изменением не только количественного, но и качественного состава жирных кислот. Аналогичная ситуация наблюдалась и с разделением других природных соединений (белки, аминокислоты, углеводы), выделенных из дейтерированной биомассы с D₂O-среды.

Анализ аминокислот белковых гидролизатов и внутриклеточных углеводов, выделенных из клеток *B. subtilis*, также выявил заметные различия в биосинтезе этих природных соединений в максимально дейтерированной D₂O-среде (ГС1-среда). Белковый гидролизат *B. subtilis* представлен пятнадцатью идентифицированными аминокислотами (за исключением пролина, который детектировался при λ = 440 нм) при выходах аминокислот, сопоставимых с потребностями используемых бактерий в источниках углерода и аминного азота (табл. 2). Индикатором, определяющим высокую эффективность включения дейтерия в белковый гидролизат, служат высокие уровни дейтерированности молекул аминокислот, которые варьируют от 49 ат. % D для лейцина/изолейцина до 97,5 ат. % D для аланина.

Фракция внутриклеточных углеводов *B. subtilis* при росте в максимально дейтерированной D₂O-среде (ГС1-среда) в табл. 3 (нумерация приведена по последовательности их элюции с колонки), представлена моносахаридами (глюкоза, фруктоза, рамноза, арабиноза), дисахаридами (мальтоза, сахароза), а также четырьмя другими неидентифицированными углеводами с временами удерживания 3,08 мин (15,63 %), 4,26 мин (7,46 %), 7,23 мин (11,72 %) и 9,14 мин (7,95 %) (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 в H₂O, за исключением сахарозы, которая в дейтерированном образце не детектировалась (табл. 3).

Уровни дейтерированности углеводов составили от 90,7 ат.% D для арабинозы до 80,6 ат.% D для глюкозы.

Заключение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что эффекты, наблюдаемые при клеточной адаптации к D₂O, относятся к комплексному многофакторному воздействию, влияющего на многие системы организма. Наблюдаемые изменения клеток при росте на D₂O сопровождались изменениями физиологических и морфологических параметров клетки, а также соотношения синтезируемых белков, аминокислот, углеводов и жирных кислот и, по видимому, обусловлены структурно-функциональной перестройкой в процессе адаптации к D₂O. Суммируя полученные данные можно сделать вывод, что чувствительность различных клеточных систем к D₂O отличны. С точки зрения физиологии наиболее чувствительными к замене H⁺ на D⁺ являются аппарат биосинтеза 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 D₂O, как адаптацию к неспецифическому фактору, действующему одновременно на функциональное состояние большого числа систем: метаболизм, пути ассимиляции углеродных субстратов, биосинтетические процессы, структуру и функции макромолекул. Нам представляется целесообразным выбор микроорганизмов в качестве биомоделей в этих исследованиях, поскольку они очень хорошо адаптируются к внешним условиям и способны выдерживать высокие концентрации D₂O в ростовых средах.

Литература

1. Мосин О.В. Дейтерий, тяжелая вода, эволюция и жизнь / О.В. Мосин // Водоочистка, водоподготовка, водоснабжение. – 2009. – № 8. – P. 64 – 70.
2. Kushner D.J. Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds / D.J. Kushner, A. Baker, T.G. Dunstall // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1999. – V. 77, N 2. – P. 79 – 88.
3. Lis G. High-Precision Laser Spectroscopy D/H and ¹⁸O/¹⁶O Measurements of Microliter Natural Water Samples / G. Lis, L.I. Wassenaar, M.J. Hendry // Anal. Chem. – 2008. – V. 80, N 1. – P. 287 – 293.
4. Лобышев В.Н. Изотопные эффекты D₂O в биологических системах / В.Н. Лобышев, Л.П. Калиниченко. – М.: Наука, 1978. – 215 с.
5. Vertes A. Physiological effects of heavy water. Elements and isotopes: formation, transformation, distribution / A. Vertes. – Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. – 2004. – 112 p.
6. Кишенбаум И. Тяжелая вода / И. Кишенбаум // в кн: Физические свойства и методы анализа: Пер. с англ. М.: Атомиздат. – 1953. – 98 с.
7. Денько Е.И. Действие тяжелой воды (D₂O) на клетки животных, растений и микроорганизмы / Е.И. Денько // Усп. совр. биол. – 1973. – Т. 70, № 4. – P. 41 – 49.
8. 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. – Т. 6, № 52. – P. 167 – 169.

9. Мосин О.В. Изотопные эффекты дейтерия в клетках бактерий и микроводорослей / О.В. Мосин, И. Игнатов // Вода: химия и экология. – 2012. – № 3. – P. 83 – 94.
10. Рост бактерии *Bacillus subtilis* на высокодейтерированной среде / О.В. Мосин, Л.А. Казаринова, К.А. Преображенская [и др.] // Биотехнология. – 1996. – № 4. – P. 19 – 27.
11. Crespi H.L. Fully deuterated microorganisms: tools in magnetic resonance and neutron scattering. Synthesis and Applications of Isotopically Labeled Compounds / H.L. Crespi // in: Proceedings of an International Symposium. T. Baillie, J.R. Jones eds. Amsterdam: Elsevier. – 1989. – P. 329 – 332.
12. LeMaster D.M. Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins / D.M. LeMaster // Ann. Rev. Biophys. Chem. – 1990. – V. 19. – P. 243 – 266.
13. MacCarthy P. Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate experiment / P. MacCarthy // J. Chem. Educ. – 1985. – V. 62, N 7. – P. 633 – 638.
14. Масс-спектрометрическая оценка уровня включения ²H и ¹³C в молекулы аминокислот бактериальных объектов / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, Т.А.Егорова [и др.] // Биоорг. химия. – 1996. – Т. 22, № 10-11. – P. 856 – 869.
15. Electron impact mass-spectrometry in bioanalysis of stable isotope labeled bacteriorhodopsin / O.V. Mosin, E.N. Karnaukhova, A.B. Pshenichnikova [et al.] // in: 6th Intern. Conf. on Retinal proteins. Leiden, the Netherlands: Springer Verlag. – 1994. – 115 p.
16. Изучение биосинтеза аминокислот штаммом *Brevibacterium methylicum* при росте на средах, содержащих тяжелую воду и дейтерометанол / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, Т.А.Егорова [и др.] // Биотехнология. – 1996. – № 3. – P. 3 – 12.
17. 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. – P. 34 – 42.
18. Mosin O.V. Biosynthesis of ²H-labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 1998. – V. 62, N 2. – P. 225 – 229.
19. Метилотрофные бактерии – источники изотопномеченых ²H- и ¹³C-аминокислот / Д.А. Складнев, О.В. Мосин, Т.А.Егорова [и др.] // Биотехнология. – 1996. – № 5. – P. 25 – 34.
20. Ерёмин В.А. Выращивание бактерий *Micrococcus lysodeikticus* на дейтерированной среде / В.А. Ерёмин, Л.Н. Чекулаева // Микробиология. – 1978. – Т. 14. – P. 125 – 136.
21. Мосин О.В. Методы получения белков и аминокислот, меченных стабильными изотопами ²H, ¹³C и ¹⁵N / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, В.И. Швец // Биотехнология. – 1996. – № 3. – P. 12 – 32.

22. Cioni P. Effect of Heavy Water on Protein Flexibility / P. Cioni, G.B. Strambini // *Biophysical J.* – 2002. – V. 82, N 6. – P. 3246 – 3253.

23. Мосин О.В. Исследование физиологической адаптации бактерий на тяжёловодородной среде / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, В.И. Швец // *Биотехнология.* – 1999. – № 8. – P. 16 – 23.

24. Cleland W.N. Isotope Effects on Enzyme-Catalyzed Reactions / W.N. Cleland, M.H. O'Leary, D.D. Northrop. – Baltimore, London, Tokyo: University Park Press, 1976. – 303 p.

УДК 579.871.08. 577.112.385.4.08

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ДЕЙТЕРИЯ НА КЛЕТКИ ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ

***О. В. Мосин, **И. И. Игнатов**

**Московский государственный университет прикладной биотехнологии; **Научно-исследовательский Центр медицинской биофизики (НИЦМБ), София, Болгария; **Европейская академия естественных наук (Ганновер, ФРГ)*

Изучена адаптация к дейтерию (D) клеток различных таксономических групп прокариотических и эукариотических микроорганизмов, реализующих метилотрофные, хемогетеротрофные, фотоорганогетеротрофные и фотосинтетические способы ассимиляции углеродных субстратов при росте на средах с тяжёлой водой (D₂O). Разработан метод ступенчатой адаптации клеток к D₂O, заключающийся в их рассеве на чашках Петри с твёрдыми (2 %-ный агар) питательными средами при ступенчатом увеличении градиента концентрации D₂O (от 0 до 98 % D₂O) и последующей селекции устойчивых к D₂O клеток. В результате этой техники на максимально дейтерированной среде с 98 % D₂O получены адаптированные к D₂O клетки, биологический материал которых вместо атомов водорода содержит атомы дейтерия с уровнем дейтерированности молекул 92–97,5 ат.% D. Использование адаптированных к D₂O клеток и выделенных из них дейтерированных природных соединений (белки, аминокислоты, нуклеозиды, пигменты, углеводы, жирные кислоты) может найти дальнейшее применение в биофизических исследованиях и биомедицинских технологиях.

Ключевые слова: дейтерий, тяжёлая вода, изотопные эффекты, адаптация, бактерии, микроводоросли.

УДК 579.871.08, 577.112.385.4.08

БИОЛОГІЧНИЙ ВПЛИВ ДЕЙТЕРІЮ НА КЛІТИНИ ПРОКАРІОТ І ЕУКАРІОТ

***О. В. Мосін, **І. І. Ігнатов**

**Московський державний університет прикладної біотехнології; **Науково-дослідний Центр медичної біофізики (НДЦМБ), Софія, Болгарія; **Європейська академія природничих наук (Ганновер, ФРН)*

Вивчена адаптація до дейтерію (D) клітин різних таксономічних груп прокариотичних та еукариотичних мікроорганізмів, які реалізують метилотрофні, хемогетеротрофні, фотоорганогетеротрофні і фотосинтетичні

способи асиміляції вуглецевих субстратів при рості на середовищах з важкою водою (D₂O). Розроблений метод східчастої адаптації клітин до D₂O, який полягає в їхньому розсіві на чашках Петрі із твердими (2 %-ний агар) живильними середовищами при східчастому збільшенні градієнта концентрації D₂O (від 0 до 98 % D₂O) і наступній селекції стійких до D₂O клітин. У результаті цієї техніки на максимально дейтерованому середовищі із 98 % D₂O отримані адаптовані до D₂O клітини, біологічний матеріал яких замість атомів водню містить атоми дейтерію з рівнем дейтерованості молекул 92–97,5 ат.% D. Використання адаптованих до D₂O клітин і виділених з них дейтерованих природних сполук (білки, амінокислоти, нуклеозиди, пігменти, вуглеводні, жирні кислоти) може знайти подальше застосування в біофізичних дослідженнях і біомедицинських технологіях.

Ключові слова: дейтерій, важка вода, ізотопні ефекти, адаптація, бактерії, микроводорослі.

BIOLOGICAL INFLUENCE OF DEUTERIUM ON PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC CELLS

***O. V. Mosin, ** I.I. Ignatov**

**Moscow the state university of applied biotechnology; ** the Research Center of medical biophysics (RCMB), Sofia, Bulgaria; ** the European academy of natural sciences (Hanover, Germany)*

Adaptation to deuterium (D) of cells of various taxonomic groups of prokaryotic and eucaryotic microorganisms realizing methylotrophical, chemoheterotrophical, photoorganotrophical, and photosynthetic ways of assimilation of carbon substrates (methylotrophic bacteria, halobacteria, green microalgae) are investigated at growth on media with heavy water (D₂O). The method of step by step adaptation technique of cells to D₂O is developed, consisting in plating of cells on 2 % agarose nutrient media containing increasing gradient of concentration of D₂O (from 0 up to 98 % D₂O) and the subsequent selection of stable to D₂O cells. Obtained from growth media with a low gradient of D₂O concentration, cells were further transferred on growth media with higher gradient of D₂O concentration, up to 98 % D₂O. In the result of that technique it were obtained adapted to maximum concentration of D₂O cells, biological material of which instead of hydrogen contained deuterium with levels of enrichment 92–97,5 ат.% D. Usage of cells adapted to D₂O and deuterated natural compounds (protein, amino acids, nucleosides, pigments, carbohydrates, fatty acids, extracted from them, can find further application in biophysical researches and biomedical technologies.

Key words: deuterium, heavy water, adaptation, isotopic effects, bacteria, microalgae.

Впервые поступила в редакцию 05.11.2013 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования.