

АДАПТАЦИЯ БАКТЕРИЙ К ТЯЖЁЛОЙ ВОДЕ

О. В. МОСИН

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В.

Ломоносова, 117571, Москва, просп. Вернадского, д. 86.

В настоящее время во всем мире растет интерес к получению природных соединений, меченных стабильными изотопами (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O и другие), которые необходимы для разнопрофильных биохимических и диагностических целей, структурно-функциональных исследований, а также для изучения процессов метаболизма клетки [1-5]. Тенденции к применению стабильных изотопов по сравнению с их радиоактивными аналогами обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации метки в молекуле методами высокого разрешения: спектроскопией ЯМР [6, 7], инфракрасной [8, 9] и лазерной спектроскопией [10], масс-спектрометрией [11]. Это позволило за последние годы повысить эффективность проведения многочисленных биологических исследований *de novo*, а также изучать структуру и механизм действия биологически активных соединений (БАС) на молекулярном уровне. Большое значение в этом аспекте имеют природные соединения, содержащие дейтериевую метку, которые удобнее всего получать с использованием микроорганизмов. Именно поэтому разработка путей препаративного получения дейтериймеченых БАС является актуальной задачей для современной биотехнологии. Стоимость биотехнологически полученных изотопномеченых соединений водорода значительно ниже, чем химически синтезированных, что представляет интерес для поиска новых штаммов-продуцентов БАС, устойчивых к высоким концентрациям дейтерия в ростовых средах и для дальнейшего изучения их свойств.

С развитием новых биотехнологических подходов появилась возможность использовать полученные в результате мутагенеза или геной инженерии штаммы-продуценты для направленного синтеза дейтериймеченых соединений [12, 13]. Традиционным подходом при этом остаётся культивирование бактерий на средах,

содержащих максимальные концентрации тяжёлой воды или других дейтерированных субстратов, например, [U- ^2H]метанола [14-17]. Однако подобные процессы редко применяются в биотехнологии, вследствие наличия ряда трудностей, связанных с адаптацией и культивированием микроорганизмов на средах с максимальными концентрациями $^2\text{H}_2\text{O}$. Поэтому целый ряд вопросов, которые касаются принципиальной возможности использования различных штаммов-продуцентов БАС для роста и биосинтеза на высокодейтерированных средах, остаются до конца невыясненными.

Важной проблемой, требующей скорейшего разрешения, является изучение процессов физиологической адаптации клетки к $^2\text{H}_2\text{O}$. Известно, что высокие концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовой среде могут вызвать ингибирование жизненно-важных функций роста и развития многих микроорганизмов [18]. Несмотря на негативный биостатический эффект, оказываемый тяжёлой водой на клетки, некоторые бактерии устойчивы к высоким концентрациям тяжёлой воды в среде [19], в то время как растительные клетки могут нормально развиваться при концентрациях не более 50-75% $^2\text{H}_2\text{O}$ [20], а клетки животных не более 35% $^2\text{H}_2\text{O}$ [21]. Явление адаптации к $^2\text{H}_2\text{O}$ интересно не только само по себе, но оно также позволяет получать уникальный биологический материал, очень удобный для решения задач молекулярной организации клетки с помощью метода ЯМР-спектроскопии. Эти данные послужили основой для выбора объектов исследования в наших экспериментах. Ими являлись генетически маркированные штаммы-продуценты аминокислот, белков и нуклеозидов, относящиеся к различным таксономическим родам микроорганизмов: факультативные метилотрофные бактерии *Brevibacterium methylicum*, облигатные метилотрофные бактерии *Methylobacillus flagellatum*, галофильные бактерии *Halobacterium methylicum* и бациллы *Bacillus subtilis*.

Целью настоящей работы было исследование процесса физиологической адаптации этих продуцентов БАС при росте на средах, содержащих максимальные концентрации тяжёлой воды. Поскольку биосинтетический потенциал используемых штаммов при росте на тяжелой воде к началу проведения данной работы был изучен недостаточно, представляло интерес исследование их способности к синтезу целевых продуктов в условиях максимально дейтерированных сред. Исследования по адаптации к $^2\text{H}_2\text{O}$ метилотрофных бактерий *B. methylicum* заложили основу для использования компонентов их (^2H)меченой биомассы, полученной в ходе многоступенчатой адаптации к $^2\text{H}_2\text{O}$ в качестве ростовых факторов для культивирования других микробных продуцентов БАС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили генетически маркированные штаммы-продуценты аминокислот, белков и нуклеозидов, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов:

1. *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В 5652, лейцинзависимый штамм факультативных метилотрофных бактерий, продуцент фенилаланина.
2. *Methylobacillus flagellatum* КТ, изолейцинзависимый штамм облигатных метилотрофных бактерий, продуцент лейцина.
3. *Bacillus subtilis* В-3157, полиауксотрофный по гистидину, тирозину, аденину и урацилу штамм грамотрицательных бактерий, продуцент инозина.
4. *Halobacterium halobium* ЕТ 1001, пигментсодержащий штамм галофильных бактерий, способный синтезировать бактериородопсин.

Для приготовления питательных сред и адаптации бактерий использовали $^2\text{H}_2\text{O}$ (99.9% ^2H), и ^2HCl (95.5% ^2H) и $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанол (97.5% ^2H), полученные из Российского научно-исследовательского центра “Изотоп” (Санкт-Петербург, РФ). По необходимости $^2\text{H}_2\text{O}$ очищали от вредных примесей, перегоняя её над перманганатом калия [22].

Стартовым материалом для культивирования галофильных бактерий и бацилл служила (^2H)меченая биомасса метилотрофных бактерий, полученная в условиях многостадийной адаптации на твердых агаризованных средах (2% агар) с 2% $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанолом, содержащих ступенчато увеличивающиеся концентрации тяжелой воды (от 0 до 98% $^2\text{H}_2\text{O}$). Полученную таким образом (^2H)меченую биомассу *B. methylicum* (выход составил 100 г по влажному весу с 1 л. среды) автоклавировали в 0.5 н. растворе ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$) (08 ати, 30 мин), нейтрализовали 0.1 н. КОН (рН 7.0) и использовали далее в качестве источника ростовых факторов для адаптации и культивирования бацилл и галофильных бактерий.

В настоящей работе использовали следующие питательные среды (количества компонентов приведены в г/л):

1. Минимальная среда М9, на основе различных концентраций $^2\text{H}_2\text{O}$ (см. табл. 1 и табл. 2) и добавками 0.5-2% метанола (в зависимости от физиологической потребности бактерий) или $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанола: KH_2PO_4 3; Na_2HPO_4 6; NaCl 0.5; NH_4Cl 1. Среду использовали для культивирования метилотрофных бактерий.

2. Гидролизная среда 1 (ГС1) для культивирования бацилл (на основе 100% $^2\text{H}_2\text{O}$): глюкоза 120; (^2H)меченая биомасса *B. methylicum* 25; NH_4NO_3 30; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 20; мел

20.

3. Гидролизная среда 2 (ГС2) для культивирования галофильных бактерий (на основе 100% $^2\text{H}_2\text{O}$): NaCl 250; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 20; KCl 2; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0.065; цитрат натрия 0.5; (^2H)меченая биомасса *B. methylicum* 20.

Культивирование метилотрофных бактерий и бацилл проводили при 37°C в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл с наполнением средой до 50 мл в условиях интенсивной аэрации по методикам [14] и [15], используя в качестве источников дейтерия $^2\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанол. В случае с галофильными бактериями их культивирование проводили на $^2\text{H}_2\text{O}$ -среде при освещении лампами дневного света ЛБ-40. После 6-7 суток культивирования клетки отделяли центрифугированием (10000 об/мин, 20 мин). В культуральных жидкостях анализировали секретируемые аминокислоты и нуклеозиды.

Для выделения фракции суммарных белков биомассы клетки дважды промывали дистиллированной водой с последующим центрифугированием (10000 об/мин, 20 мин), экспонировали ультразвуком при 22 кГц (3 x 15 мин) и центрифугировали. Липиды и пигменты экстрагировали смесью органических растворителей хлороформ-метанол-ацетон (2:1:1) по методу Блайя и Дайера [23]. Полученный осадок высушивали до постоянного веса (10-12 мг) и использовали его в качестве фракции суммарных белков биомассы.

Суммарные белки биомассы гидролизовали в запаянных стеклянных ампулах в 50-ти кратном избытке 6 н. ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$). Ампулы выдерживали при 110° в течение 24 ч. После этого реакцию массу суспендировали в горячей дистиллированной воде, фильтровали. Гидролизат упаривали в роторном испарителе при 40°C . Остатки дейтеросоляной кислоты удаляли путем выдерживания в эксикаторе над твердым NaOH.

Для проведения гидролиза внутриклеточных полисахаридов 50 мг сухой делипидизованной биомассы помещали в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мл дистиллированной воды и 1.6 мл 25% $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ и кипятили с обратным водяным холодильником в течении 90 мин. По охлаждении реакцию смесь суспендировали в одном объёме горячей дистиллированной воды и нейтрализовали 2 н. раствором $\text{Ba}(\text{OH})_2$ до pH 7.0. Выпавший осадок сульфата бария отделяли центрифугированием (15000 об/мин, 5 мин), супернатант декантировали и упаривали в роторном испарителе при 40°C .

Рост бактерий оценивали по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твёрдых агаризованных сред, а также по величине оптической плотности суспензии клеток, измеренной на спектрофотометре Beckman-DU6 (США) при 540 нм в

кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках Silufol UV-254 (Чехо-Словакия) или на пластинках с закреплённым слоем силикагеля фирмы Merck (Германия) в системах растворителей: изопропанол-аммиак, (7:3) (А) для аминокислот и н-бутанол-уксусная кислота-вода, (2:1:1), (Б) для инозина.

Определение содержания глюкозы в культуральной жидкости проводили глюкозооксидазным методом [24].

Секретируемые фенилаланин и инозин определяли на приборе Beckman DU-6 (США). Фенилаланин определяли при 540 нм в образцах культуральной жидкости, объёмом 10 мкл после обработки препаратов культуральной жидкости нингидрином, инозин - при 249 нм в образцах культуральной жидкости, объёмом 20 мкл.

Аминокислотный анализ гидролизатов суммарных белков биомассы проводили на приборе Biotronic LC 5001 (ФРГ); 230 x 3,2 мм; рабочее давление 50-60 атм; скорость подачи натрийцитратного буфера 18.5; нингидрина 9.25 мл/ч; детекция при 570 нм и 440 нм (для пролина).

Анализ углеводов осуществляли на жидкостном хроматографе Knauer (ФРГ), снабжённым насосом Gilson (ФРГ) и рефрактометром Waters К 401 (ФРГ); неподвижная фаза: Separon NH₂, 10 мкм; 10 x 250 мм; подвижная фаза: ацетонитрил-вода, (75:25); скорость подачи: 0.6 мл/мин.

Липиды анализировали на хроматографе Beckman Gold System (США), снабжённым насосом Model 166 (США) и детектором Model 126 (США); неподвижная фаза: Ultrasphere ODS 5 мкм; 4.6 x 250 мм; подвижная фаза: линейный градиент 5 мМ КН₂РО₄-ацетонитрил; 100% в течении 50 мин; скорость подачи: 0.5 мл/мин; детекция при 210 нм.

Уровни включения дейтерия в аминокислоты белковых гидролизатов определяли методом масс-спектрометрии электронного удара в виде метиловых эфиров N-диметиламинафталин-5-сульфонильных (дансильных) производных аминокислот на приборе MB-80A (Hitachi, Япония) при ионизирующем напряжении 70 эВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Адаптация облигатных метилотрофных бактерий *M. flagellatum*.

Для проведения адаптации к тяжёлой воде были использованы представители двух различных таксономических групп метилотрофных бактерий, взятых из коллекции ГОСНИИ Генетики: лейцинпродуцирующий штамм облигатных метилотрофных бактерий *Methylobacillus flagellatum*, ассимилирующий метанол по 2-кето-3-дезоксидеокси-6-

фосфоглюконатальдозазному варианту рибулозо-5-монофосфатного (РМФ) цикла фиксации углерода [25] и фенилаланинпродуцирующий штамм факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum*, ассимилирующий метанол по РМФ-циклу фиксации углерода [26]. Для культивирования и адаптации данных штаммов метилотрофных бактерий использовали минимальные среды М9, содержащие в качестве источников дейтерия $^2\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанол. В зависимости от физиологической потребности того или иного штамма бактерий в углеродном субстрате использовали 0.5-2% концентрации метанола в ростовых средах. Для компенсации ауксотрофности по лейцину и изолейцину эти аминокислоты добавляли в ростовые среды в протонированном виде в концентрациях 10 мг/л. В обычных условиях культивирования на протонированных средах уровни накопления фенилаланина и лейцина в культуральных жидкостях штаммов-продуцентов достигали величины 0.8 и 1.0 г/л соответственно.

Табл. 1

Влияние изотопного состава среды на рост штамма *M. flagellaum*

Номер Время опыта генер. часы	Компоненты среды, %				Величина лаг-фазы часы	Выход биомассы % от конт- роля	
	H_2O	$^2\text{H}_2\text{O}$	метанол	$[\text{U-}^2\text{H}]$ метанол			
1	99.0	0	1.0	0	0	100	1.1
2	99.0	0	0.5	0.5	0.2	91.0	0.8
3	99.0	0	0	1.0	0.8	81.0	1.0
4	49.5	49.5	1.0	0	2.4	76.0	1.4
5	49.5	49.5	0.5	0.5	5.7	75.0	1.2
6	49.5	49.5	0	1.0	6.7	70.0	1.3
7	24.5	74.5	1.0	0	5.6	29.0	1.4

Для проведения адаптации был выбран ступенчатый режим увеличения концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах в присутствии 0.5-1% метанола/ $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанола, так как мы предположили, что постепенное привыкание организма к дейтерию будет оказывать благоприятный эффект на параметры роста и общее самочувствие культуры (табл. 1). При этом штамм *M. flagellatum* обнаружил повышенную чувствительность к

$^2\text{H}_2\text{O}$: ингибирование скорости роста бактерий наблюдалось при концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в среде 74.5%, в то время как $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанол не оказывал существенного влияния на скорость роста культуры. Так, на среде, содержащей 74.5% $^2\text{H}_2\text{O}$ выход микробной биомассы составил 29%, что в 3.4 раза ниже, чем в контрольных экспериментах, когда использовали обычную воду и метанол (табл. 1, опыт 1), в то время как выход микробной биомассы на водной среде с 1% $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанолом был снижен всего лишь в 1.2 раза. В связи с тем, что роста бактерий на более высокой концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ достичь не удалось в дальнейших экспериментах использовали биомассу *M. flagellatum*, полученную со среды, содержащей 74.5% $^2\text{H}_2\text{O}$.

Адаптация факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum*.

Попытки адаптировать штамм *B. methylicum* к росту на максимально дейтерированной среде при сохранении способности к биосинтезу фенилаланина привели к положительному результату. К данному штамму метилотрофных бактерий был применён специальный подход по адаптации, который заключался в серии из нескольких адаптационных пассажей исходной культуры на твёрдых агаризованных средах с 2% $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанолом при ступенчатом увеличении концентрации тяжёлой воды в них (от 0 до 98% $^2\text{H}_2\text{O}$), как показано в табл. 2. При этом последовательно отбирали отдельные колонии, выросшие на средах, содержащих дейтерий. Затем их пересеивали на среды с большей степенью дейтерированности, включая среду с 98% $^2\text{H}_2\text{O}$ (степень выживаемости бактерий на конечной максимально дейтерированной среде составила не более 50%). За ходом адаптации следили по изменениям продолжительности лаг-фазы, времени клеточной генерации и выходов микробной биомассы, а также по максимальному уровню накопления фенилаланина в культуральной жидкости (рис. 1).

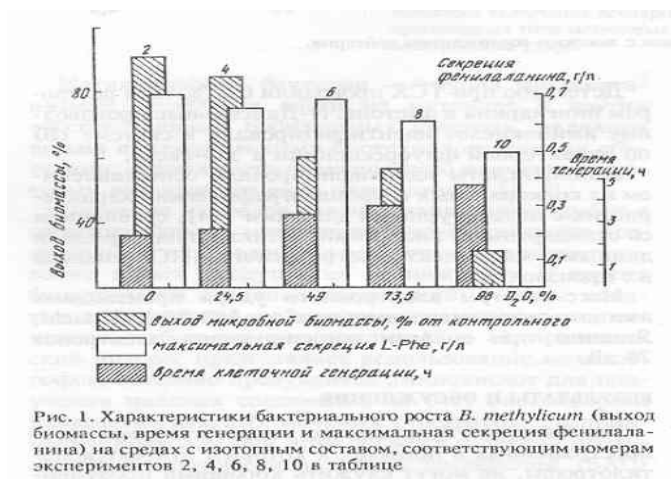
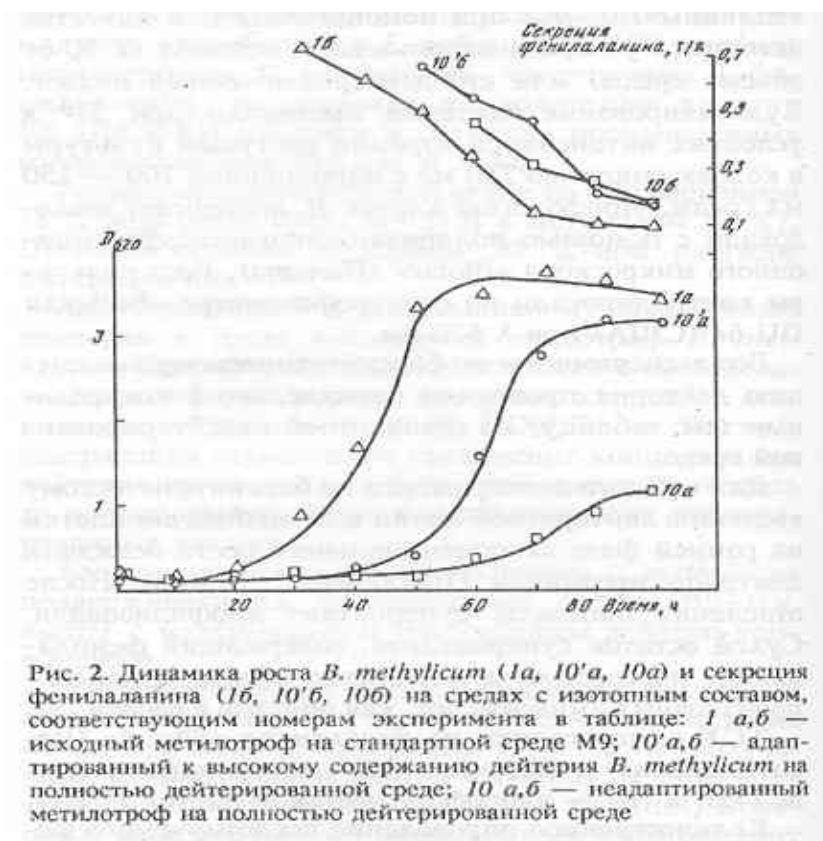


Рис. 1. Характеристики бактериального роста *B. methylicum* (выход биомассы, время генерации и максимальная секреция фенилаланина) на средах с изотопным составом, соответствующим номерам экспериментов 2, 4, 6, 8, 10 в таблице

В отсутствие дейтериймеченных субстратов продолжительность лаг-фазы не превышала 20 ч, в то время как с увеличением концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах до 98% продолжительность лаг-фазы увеличивалась до 60 часов (таблица 2, опыт 10). Отмечено, что длительность времени клеточной генерации с увеличением концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовых средах постепенно увеличивается, достигая 4,9 часов на среде с 98% $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2% $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанолом (табл. 2, опыт 10). В отличие от тяжелой воды, $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанол не вызывал существенного ингибирования роста и не оказывал влияния на выходе микробной биомассы. Напротив, на максимально дейтерированной среде выход микробной биомассы был снижен в 3.3 раза по сравнению с контролем. Важно то, что выход микробной биомассы и уровень накопления фенилаланина в культуральной жидкости при росте адаптированного к $^2\text{H}_2\text{O}$ микроорганизма в максимально дейтерированной среде изменяются по сравнению с контрольными условиями на 13 и 5%, т. е. незначительно (табл. 2, опыт 10').



Адаптированные к $^2\text{H}_2\text{O}$ клетки сохранили способность синтезировать и экзогенно продуцировать фенилаланин в ростовую среду. Причём общей особенностью биосинтеза фенилаланина в $\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$ -средах было увеличение его продукции на ранней фазе экспоненциального роста *V. methylicum*, когда выход микробной биомассы был незначителен (рис. 2). Во всех экспериментах наблюдалось ингибирование биосинтеза

фенилаланина на поздней фазе экспоненциального роста и снижение его концентрации в ростовых средах. Согласно данным по микроскопическому исследованию растущей популяции микроорганизмов, подобный характер динамики секреции фенилаланина не коррелировал с качественными изменениями ростовых характеристик культуры на различных стадиях роста, что служило подтверждением морфологической однородности микробной популяции. Скорее всего, накопленный в процессе роста фенилаланин ингибировал ферменты собственного пути биосинтеза. Кроме того, не исключена возможность, что при ферментации без рН-статирования может происходить как обратное превращение секретируемого фенилаланина в интермедиаторные соединения его биосинтеза, так и ассимиляция фенилаланина клеткой для обеспечения собственных метаболических потребностей, что отмечено в других работах [27, 28]. Данные по исследованию культуральной жидкости методом ТСХ показали, что кроме фенилаланина штамм *B. methylicum* синтезирует и накапливает в культуральной жидкости (на уровне 5-6 ммоль) другие аминокислоты (аланин, валин, лейцин, изолейцин), присутствие которых также подтверждалось масс-спектрометрическим анализом метиловых эфиров их DNS-производных.

Табл. 2

Влияние изотопного состава среды на рост штамма *B. methylicum* и уровень накопления фенилаланина в культуральной жидкости (КЖ)

Номер Уровень опыта накопле-	Компоненты среды, %				Величина Выход Время ген.			
	H ₂ O	² H ₂ O	метанол	[U- ² H]метанол	часы	% от кон	контроля	
1	98	0	2	0	20	100	2.2	100
2	98	0	0	2	30	92.3	2.4	99.1
3	73.5	24.5	2	0	32	90.6	2.4	96.3
4	73.5	24.5	0	2	34	85.9	2.6	97.1
5	49.0	49.0	2	0	40	70.1	3.0	98.0
6	49.0	49.0	0	2	44	60.5	3.2	98.8
7	24.5	73.5	2	0	45	56.4	3.5	90.4
8	24.5	73.5	0	2	49	47.2	3.8	87.6
9	0	98.0	2	0	58	32.9	4.4	42.5
10	0	98.0	0	2	60	30.1	4.9	37.0
10'	0	98.0	0	2	40	87.0	2.9	95.0

Так как данный штамм метилотрофных бактерий удалось адаптировать к ²H₂O,

исследование принципиальной возможности использования гидролизатов его биомассы для культивирования других штаммов продуцентов представлялось весьма актуальным. Следует подчеркнуть, что усваиваемость биомассы метилотрофов клетками эукариот составляет 85-99%, а производительность метилотрофов, измеренная по уровню конверсии метилового спирта достигает 50% [29]. При этом учитывалось, что метилотрофные бактерии при росте на метаноле способны синтезировать большое количество полноценных белков (до 55% от веса сухого вещества) [30], а также некоторое количество полисахаридов (до 10%) [31], причем эта способность сохраняется при росте на средах, содержащих $^2\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанол. Для выделения этих соединений из (^2H)меченой биомассы метилотрофных бактерий было необходимо проводить её гидролиз. Для этого использовали два метода гидролиза биомассы - щадящий гидролиз путём автоклавирования в 0.5 н. растворе ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$) (30 мин, 08 атм) и исчерпывающий гидролиз биомассы в 6 н. ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$) (24 часа, 110 °С). В предварительных экспериментах было показано, что по-первому варианту гидролиза биомассы реализуется гораздо большая питательность суспензии метилотрофных бактерий по сравнению с гидролизом в 6 н. ^2HCl . Поэтому мы отдали предпочтение этому методу проведения гидролиза биомассы.

Табл. 3

Качественный и количественный состав аминокислот, выделенных из белковых гидролизатов *B. methylicum*

Аминокислота	Содержание в белке, % от сух. веса 1 г биомассы	
	протонированный гидролизат	гидролизат, полученный 98% $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2% $[\text{U-}^2\text{H}]$ метанола
Глицин	8.03	9.69
Аланин	12.95	13.98
Валин	3.54	3.74
Лейцин	8.62	7.33
Изолейцин	4.14	3.64
Фенилаланин	3.88	3.94
Тирозин	1.56	1.82
Аспарагиновая кислота	7.88	9.59
Глутаминовая кислота	11.68	10.38
Лизин	4.37	3.98
Гистидин	3.43	3.72
Треонин	4.81	5.51
Метионин	4.94	2.25
Аргинин	4.67	5.27

Вследствие того, что используемые в работе бактериальные штаммы были представлены их ауксотрофными по определенным аминокислотам формами, было необходимо оценить сколько данных аминокислот содержится в гидролизатах биомассы и каковы уровни их дейтерированности. В гидролизате биомассы, полученной с $^2\text{H}_2\text{O}$ -среды было зафиксировано небольшое снижение содержания лейцина, изолейцина, глутаминовой кислоты, лизина и метионина по сравнению с биомассой, полученной на обычной воде (табл. 3). Содержания аланина, аспарагиновой кислоты, треонина и аргинина в дейтерированном белке, напротив, немного превышают контрольные показатели, снятые в H_2O . Таким образом, достигнутый результат в опытах по адаптации *B. methylicum* к $^2\text{H}_2\text{O}$, позволил использовать гидролизаты его (^2H)меченой биомассы, полученной в ходе многоступенчатой адаптации к $^2\text{H}_2\text{O}$ в качестве ростовых субстратов для выращивания бацилл *Bacillus subtilis*, а также штамма галофильных бактерий *Halobacterium halobium*. При этом, показателем, позволяющим надеяться на высокую эффективность включения дейтерия в продукты, синтезируемые данными бактериальными штаммами, служит высокий уровень дейтерированности аминокислот суммарного белка этих бактерий, измеренный на метиловых эфирах DNS-производных аминокислот, за исключением лейцина и метаболически родственных с ним аминокислот, сниженные уровни дейтерированности которых объясняются эффектом ауксотрофности данного метилотрофного штамма в лейцине (табл. 4).

Табл. 4

Уровни дейтерированности аминокислот суммарных белков *B. methylicum*, полученных в ходе многоступенчатой адаптации к $^2\text{H}_2\text{O}$

Метиловые эфиры дансилпроизводных аминокислот	Величина молекулярного иона (M^+)	Количество включенных атомов дейтерия	Уровень дейтерированности аминокислот, %
Dns-Gly-OMe	324.0	1.8	90.0
Dns-Ala-OMe	340.3	3.9	97.5
Dns-Val-OMe	368.5	4.0	50.0
Dns-Leu-OMe	383.4	4.9	49.0
(Dns-Ile-OMe)			
Dns-Phe-OMe	419.6	7.6	95.0
Dns-Tyr-OMe	668.5	6.5	92.8
Dns-Ser-OMe	354.8	2.6	86.6
Dns-Thr-OMe	-	-	не определяли
Dns-Met-OMe	-	-	не определяли

Dns-Asp-OMe	396.4	2.0	66.6
Dns-Glu-OMe	411.0	3.5	70.0
Dns-Lys-OMe	632.4	5.3	58.9
Dns-Arg-OMe	-	-	не определяли
Dns-Hs-OMe	-	-	не определяли

Адаптация бацилл *B. subtilis*.

В следующих опытах была исследована способность к росту на $^2\text{H}_2\text{O}$ бациллярного штамма *B. subtilis*, продуцента инозина. Рост данного штамма лучше всего происходил на ГС 1 среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу, а в качестве источника ростовых факторов гидролизаты (^2H)меченой биомассы метилотрофных бактерий *B. methylicum*.

Данный штамм удалось адаптировать к дейтерию путём посева на твёрдую агаризованную среду ГС 1 со 100% $^2\text{H}_2\text{O}$. Он сразу обнаружил нормальный рост в присутствии $^2\text{H}_2\text{O}$. При культивировании адаптированного *B. subtilis* на жидкой ГС 1 среде, уровень накопления инозина в культуральной жидкости снижается по-сравнению с исходным штаммом. Например, при росте исходного штамма *B. subtilis* на среде, содержащей обычную воду и протонированную биомассу уровень накопления инозина в культуральной жидкости достигал величины 17 г/л после пяти суток культивирования (рис. 3). Вместе с тем уровень накопления инозина на ГС 1 среде, был снижен в 4.4 раза по сравнению с исходным штаммом на протонированной среде. Сниженный уровень продукции инозина на в этих условиях коррелирует со степенью конверсии глюкозы, которая на $^2\text{H}_2\text{O}$ ассимилировалась не полностью, о чём свидетельствовали значительные количества накопленной в культуральной жидкости глюкозы после ферментации. Поэтому было интересно оценить содержание глюкозы в гидролизатах биомассы *B. subtilis*. В состав гидролизатов внутриклеточных сахаров данного штамма входят глюкоза, фруктоза, рамноза, арабиноза, мальтоза и сахароза (табл. 5). Важно, что содержание глюкозы в дейтерированной биомассе достигает 21.4%, т. е. значительно выше, чем для других сахаров. Содержания других сахаров в анализируемых образцах существенно не отличаются от таковых для H_2O , за исключением сахарозы, которая в дейтерированном образце не детектируется (табл. 5).

Табл. 5

Качественный и количественный состав сахаров, выделенных из гидролизатов биомассы *B. subtilis*.

Сахар биомассы полученный	Содержание в биомассе, в % от сухого веса 1 г	
	протонированный гидролизат	гидролизат, со 100% $^2\text{H}_2\text{O}$
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	-

Адаптация галофильных бактерий *H. halobium*.

В случае с *H. halobium* адаптацию проводили как на агаре, содержащим 100% $^2\text{H}_2\text{O}$ с добавлением гидролизатов (^2H)меченой биомассы *B. methylicum*, путём рассева штамма до отдельных колоний, так и на жидкой ГС 2 среде. В обычных для этой культуры условиях культивирования (37 °С, на свету) в клетках синтезировался фиолетовый пигмент по всем характеристикам не отличающийся от нативного бактериородопсина.

Проведённые исследования подтвердили, что способность к адаптации к $^2\text{H}_2\text{O}$ у разных родов и видов бактерий различная и может варьировать на примере метилотрофных бактерий в пределах даже одной таксономической группы. Из этого можно заключить, что адаптация к $^2\text{H}_2\text{O}$ определяется как таксономической специфичностью микроорганизмов, так и особенностями их 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 самыми примитивными в эволюционном плане являются галофильные бактерии, относящиеся к археобактериям, практически не нуждающиеся в адаптации к $^2\text{H}_2\text{O}$, чего нельзя сказать о метилотрофных бактериях, которые труднее адаптируются к $^2\text{H}_2\text{O}$. Для всех изученных микроорганизмов рост на высокодейтерированных средах сопровождался снижением ростовых характеристик а также уровня продукции секретлируемых БАС. Полученные для изученных

микроорганизмов данные в целом подтверждают устойчивое представление о том, что адаптация к $^2\text{H}_2\text{O}$ является фенотипическим явлением, поскольку адаптированные к тяжелой воде клетки возвращаются к нормальному росту и биосинтезу в протонированных средах после некоторого лаг-периода. По-видимому, метаболизм адаптированных клеток не претерпевает существенных изменений в $^2\text{H}_2\text{O}$. В то же время эффект обратимости роста на $^2\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ - средах теоретически не исключает возможности того, что этот признак стабильно сохраняется при росте в H_2O , но маскируется при переносе клеток на дейтерированную среду. Однако, здесь необходимо подчеркнуть, что для проведения адаптации играет немаловажную роль состав среды культивирования. При этом не исключено, что при проведении адаптации на минимальных средах, содержащих $^2\text{H}_2\text{O}$ образуются формы бактерий, ауксотрофные по определенным ростовым факторам, например аминокислотам, и вследствие этого бактериальный рост ингибируется. В то же время адаптация к $^2\text{H}_2\text{O}$ происходит лучше всего именно на комплексных средах, содержащих широкий набор ростовых факторов и аминокислот, компенсирующих потребность бактерий в этих соединениях. Можно также предположить, что клетка реализует лабильные адаптивные механизмы, которые способствуют функциональной реорганизации работы жизненно-важных систем в $^2\text{H}_2\text{O}$. Так, например, нормальному биосинтезу и функционированию в $^2\text{H}_2\text{O}$ таких биологически активных 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 [32]. Различия в нуклеарной массе атома водорода и дейтерия косвенно могут служить причиной различий в синтезах нуклеиновых кислот, которые могут приводить в свою очередь к структурным различиям и, следовательно, к функциональным изменениям в клетке. Вероятнее всего, что ферментативные функции и структура синтезируемых белков также изменяются при росте клеток на $^2\text{H}_2\text{O}$, что может отразиться на процессах метаболизма и деления клетки. Некоторые исследователи сообщают, что после обратного изотопного (^1H - ^2H)-обмена ферменты не прекращают своей функции, но изменения в результате изотопного замещения за счет первичного и вторичного изотопных эффектов, а также действие $^2\text{H}_2\text{O}$ как растворителя (большая структурированность и вязкость по сравнению с H_2O) приводили к изменению скоростей и специфичности ферментативных реакций в $^2\text{H}_2\text{O}$ [33].

Структурно-динамические свойства клеточной мембраны, которые в большинстве

В общих чертах, при попадании клетки в дейтерированную среду из неё не только исчезает протонированная вода за счет реакции обмена $\text{H}_2\text{O} - {}^2\text{H}_2\text{O}$, но и происходит очень быстрый изотопный (${}^1\text{H}$ - ${}^2\text{H}$)-обмен в гидроксильных, карбоксильных, сульфгидрильных и аминогруппах всех органических соединений, включая нуклеиновые кислоты, липиды, белки и сахара. Известно, что в этих условиях только С-Н связь не подвергается изотопному обмену и вследствие этого только соединения со связями типа С- ${}^2\text{H}$ могут синтезироваться *de novo* [34]. Кроме вышеобозначенных эффектов, возможное изменение соотношения основных метаболитов в процессе адаптации к тяжелой воде также может негативно сказываться на рост клетки. Также не исключено, что эффекты, наблюдаемые при адаптации к ${}^2\text{H}_2\text{O}$ связаны с образованием в ${}^2\text{H}_2\text{O}$ конформаций молекул с иными структурно-динамическими свойствами, чем конформаций, образованных с участием водорода, и поэтому имеющих другую активность и биологические свойства. Так, по теории абсолютных скоростей разрыв С ${}^2\text{H}$ -связей может происходить быстрее, чем СН-связей, подвижность иона ${}^2\text{H}^+$ меньше, чем подвижность H^+ , константа ионизации ${}^2\text{H}_2\text{O}$ несколько меньше константы ионизации H_2O [35]. Суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что чувствительности различных клеточных систем к ${}^2\text{H}_2\text{O}$ отличны. С точки зрения физиологии, наиболее чувствительными к замене H^+ на ${}^2\text{H}^+$ могут оказаться аппарат биосинтеза макромолекул и дыхательная цепь, т. е., именно те клеточные системы, которые используют высокую подвижность протонов и высокую скорость разрыва водородных связей.

Нам представляется выбор бактерий в качестве модельных объектов для данных исследований наиболее целесообразным, так как прокариоты как организмы, стоящие на более низких ступенях развития живого, наиболее лабильны в генетическом аспекте и тем самым быстрее реагируют и приспосабливаются к изменчивым факторам среды. В заключение следует подчеркнуть, что для того чтобы сделать более конкретные выводы о природе и механизме адаптации клеток к тяжелой воде, необходимы экспериментальные данные по физиологии и биохимии адаптированных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Young V. R., Yu Y. M., Krempl M. Protein and amino acid turnover using the stable isotopes ${}^{15}\text{N}$, ${}^{13}\text{C}$, and ${}^2\text{H}$ as probes.: in New techniques in nutritional research, eds., H. R. G. Whitehead, A. J. Prentice, A. J.- Academic Press. - New York, 1990. - V. 9. - P. 17-72.

2. Harbison G. S., Smith S. O., Pardoen J. A., Mulder P. P. J., Lugtenburg J., Herzfeld R., Mathies R., Griffin R. G. // *Biochemistry*. - 1984. - V. 23. - P. 2662-2667.
3. Ames J. B., Ros M., Raap J., Lugtenburg J., Mathies R. A. // *Biochemistry*. - 1992. - V. 31. - P. 5328-5335.
4. Fischer M. R., de Groot H. J. M., Raap J., Winkel C., Hoff A. J., Lugtenburg J. // *Biochemistry*. - 1992. - V. 31. - P. 11038-11043.
5. LeMaster D. L., Richards F. M. // *Anal. Biochem.* - 1982. - V. 122. - P. 238-247.
6. McIntosh L. P., Dahlquist F. W. // *Quarterly Reviews of Biophysics*. - 1990. - V. 23. - P. 1-38.
7. Fesik S. W., Zuiderweg E. R. P. // *Quarterly Reviews of Biophysics*. - 1990. - V. 23. - N. 2. - P. 97-131.
8. Rothschild, K. J., Braiman, M. S., He, Yi-Wu., Marti, T., Khorana, H. G. // *J. of Biol. Chem.* - 1990. - V. 28. - P. 16985-16991.
9. Haris P. I., Robillard G. T., Vandijk A. A., Chapman D. // *Biochemistry*. - 1992. - V. 31. - N. 27. - P. 6279-6284.
10. Argade, P. V., Rothschild, K. J., Kawamoto, A. H., Herzfeld, J., Herlihy, W. C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1981. - V. 78. - N 3. - P. 1643-1646.
11. Raap J., Winkel C., de Wit A. H. M., van Houten A. H. H., Hoff A. J., Lugtenburg J. // *Anal. Biochem.* - 1990. - V. 191. - P. 9-18.
12. Karnaukhova, E. N., Reshetova, O. S., Semenov, S. Y., Skladnev, D. A., and Tsygankov, Y. D. // *Amino Acids*. - 1994. - V. 6. - P. 165-176.
13. Busujima U. K., Shimiba S., Narita K., Okada S. // *Chem. Pharm. Bull.* - 1988. - V. 36. - P. 1828-1832.
14. Мосин О. В., Карнаухова Е. Н., Пшеничникова А. Б., Складнев Д. А., Акимова О. Л. // *Биотехнология*. - 1993. - N 9. - С. 16-20.
15. Мосин О. В., Складнев Д. А., Егорова Т. А., Юркевич А. М., Швец В. И. // *Биотехнология*. - 1996. - N 3. - С. 3-12.
16. Мосин О. В., Складнев Д. А., Егорова Т. А., Юркевич А. М., Швец В. И. // *Биотехнология*. - 1996. - N 4. - С. 27-35.
17. Складнев Д. А., Мосин О. В., Егорова Т. А., Ерёмин С. В., Швец В. И. // *Биотехнология*. - 1996. - N 5. - С. 25-34.
18. Crespi H. L. Biosynthesis and uses of per-deuterated proteins. in: *Synt. and Appl. of Isot. Label. Compd.* // Ed. R. R. Muccino. - Elsevier. - Amsterdam, 1986 - P. 111-112.
19. Katz J, Crespi H.L. // *Pure Appl. Chem.* - 1972. - V.32. - P. 221-250.
20. Daboll H. F., Crespi H. L., Katz J. J. // *Biotechnology and Bioengineering*. - 1962. - V. 4. -

P. 281-297.

21. *Crespy H. L.* Stable Isotopes in the Life Sciences. - International atomic energy agency. - Vienna. - 1977. - P. 111-121.
22. *Кейл Б.* Лабораторная техника органической химии. - М.: Мир, 1966. - С. 504.
23. *Bligh E.G., Dyer W.J.* // *Can. J. Biochem. Physiol.* - 1959. - V. 37. - N. 8. - P. 911-918.
24. *Полюдек-Фабини Р., Бейрих Т.* // *Органический анализ.* - Л. Химия. - 1981. - С. 515-516.
25. *Kletsova L. V., Chibisova E. S., Tsygankov Y. D.* // *Arch. Microbiol.* - 1988. - V. 149. - P. 441-446.
26. *Nesvera J., Patek M., Hochmannova J., Chibisova E., Serebrijski I., Tsygankov Y., Netrusov A.* // *Appl. Microb. Biotechnol.* - 1991. - V. 35. - P. 777-780.
27. *Ворошилова Э. Б., Гусятинер М. М., Жданова Н. И.* // *Биотехнология.* - 1989. - N 2. - С. 137-141.
28. *Максимова Н. П., Олехнович И. Н.* Регуляция биосинтеза ароматических аминокислот у метилотрофных бактерий: Биохимия и физиология метилотрофов. - Пущино, 1987. - С. 77-85.
29. *Colby J., Dalton H.* // *Ann. Rev. Microbiol.* - 1979. - V. 33. - P. 481-517.
30. *Мосин О. В., Складнев Д. А., Егорова Т. А., Швец В. И.* // *Биоорганическая химия.* - 1996. - Т. 22. - N 10-11. - С. 856-869.
31. *Никонова Е. С., Доронина Н. В., Троценко Ю. А.* // *Приклад. биохим. и микробиол.* - 1986. - Т. 22. - С. 557-561.
32. *Barksdale A. D., Rosenberg A.* // *Methods Biochem. Anal.* - 1982. - V. 28. - P. 1-25.
33. *Tuchsen E., Woodward C. K.* // *J. Mol. Biol.* - 1985. - V. 185. - P. 421-430.
34. *Perrin C. L., Arrhenius G. M. L.* // *J. Am. Chem. Soc.* - 1982. - V. 104. - P. 6693-6699.
35. *Covington A. K., Robinson R. A., Bates R. G.* // *J. Phys. Chem.* - 1966. - V. 70. - P. 3820-3829