

Основан в 1967 г. как журнал
«Космическая биология и медицина»

С 1974 по 1991 г. выходил под названием
«Космическая биология и авиакосмическая медицина»

Включен в перечень рецензируемых научных журналов, рекомендованных
Высшей аттестационной комиссией для опубликования основных научных результа
диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук

AVIAKOSMICHESKAYA I EKOLOGICHESKAYA MEDITSINA. 2011. V. 45. № 3

Главный редактор И.Б.Ушаков

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

В.М.Баранов, И.В.Бухтияров, О.Л.Виноградова, А.И.Григорьев,
Б.И.Давыдов, И.В.Иванов, Е.А.Ильин (*зам. главного редактора*),
А.С.Капланский, А.А.Меденков, С.О.Николаев,
В.Б.Носков, Н.А.Разсолов, Ю.Е.Синяк, М.Н.Хоменко,
А.А.Шипов (*ответственный секретарь*)

Учредитель и издатель

**Учреждение Российской академии наук
Государственный научный центр
Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем
Российской академии наук**

ВЛИЯНИЕ ЛЕГКОИЗОТОПНОЙ ВОДЫ НА РОСТ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ

Н.М.Назаров, Ю.Е.Синяк, Е.Н.Ефременко*, Н.А.Степанов*, Е.Ю.Малых

Учреждение РАН Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем, Москва
*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

*Исследовали влияние легкоизотопной воды на рост микроорганизмов на примере бактериальной культуры *Pseudomonas esterophilus*.*

В качестве питательной среды использовали минеральные соли и этилацетат – источник углеродного питания, растворенные в легкоизотопной воде с ррт 35 и 70, а в качестве контроля – аналогичные компоненты, растворенные в дистиллированной воде.

Исследования показали прирост в экспоненциальной фазе роста по сравнению с контролем концентрации бактериальных клеток статической культуры в легкоизотопной воде с ррт 35 – на 87,3, а с ррт 70 – на 35,2 % и число клеточных делений за 1 ч – на 6,7 и 3,3 % соответственно.

Таким образом, показано, что легкоизотопная вода стимулирует метаболическую активность и соответственно количественный рост бактериальных клеток.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2011. Т. 45. № 3. С. 63–66

Биогенные химические элементы, формирующие биосферу Земли, представлены как «легкими», так и «тяжелыми» стабильными изотопами. Кислород в природной воде существует в виде 3 изотопных модификаций – ^{16}O , ^{17}O , ^{18}O .

Концентрация изотопов кислорода (атомных %) в природной воде составляет ^{16}O – 99,76, ^{17}O – 0,04, ^{18}O – 0,1981 – для пресной воды и 0,1995 (атомных %) – для морской воды (соленость – 35 %). Концентрации изотопов водорода в природной воде составляют: ^1H – 99,985, дейтерия $\text{D}(^2\text{H})$ – 0,015 атомных %. Изучение физических свойств природной питьевой воды (протиевая вода H_2O) и воды, обогащенной дейтерием (тяжелая вода – D_2O), выявило различие по таким показателям, как атомный вес, температура кипения, плавления, плотность, теплоемкость и другим свойствам. Например, температура кипения протиевой воды равна 100 °C, а тяжелой – дейтериевой 101,4 °C; температура замерзания $^1\text{H}_2\text{O}$ – 0 °C, а D_2O – 3,8 °C. Тяжелая вода (99,2 %) имеет сладковатый вкус и металлический привкус [2]. Растворимость солей в тяжелой воде ниже, чем в протиевой. Энергия дейтериевых связей отличается от водородных – C-H и в 7 раз слабее, чем C-D; N-H в 8,5 раза слабее, чем N-D; O-H в 10,6 раза слабее, чем O-D [13].

Из-за физико-химической неравноценности «легких» и «тяжелых» изотопов в обменных процессах живой и неживой природы доминируют «легкие» изотопы, что вызывает изменение соотношений изотопных модификаций в окружающей среде.

«легкие» изотопы, что вызывает изменение соотношений изотопных модификаций в окружающей среде.

Огромная роль в поддержании относительного постоянства изотопного состава атмосферы Земли принадлежит воде Мирового океана. В работе [8] впервые рассмотрен вопрос о формировании оптимального изотопного состава биогенных химических элементов на борту пилотируемых космических аппаратов. Для суждения об этом необходимы более глубокие исследования влияния на живой организм стабильных изотопов различных модификаций с учетом возможного воздействия неблагоприятных факторов космического полета.

В ранних работах показано, что содержание дейтерия в воде в значительной мере снижает метаболическую активность биологических объектов [1]. Токсическое действие «тяжелой» воды исследовано в большем объеме, и при достижении 50 %-ной концентрации ее в организме наступает гибель животных [2]. При непродолжительном эксперименте замена «тяжелой» воды на «легкую» позволяет вернуть животных к жизни [3].

Первая работа по изучению биологических свойств воды с пониженным содержанием дейтерия выполнена в 1961 г. [5]. Было обращено внимание на биологическую активность талой снеговой воды, предположительно содержащей дейтерий в концентрации ниже обычной на 20–25 % [6].

Замачивание семян пшеницы в облегченной по дейтерию и кислороду воде увеличивало интенсивность их роста на 41 % по сравнению с обычной водой [9], а урожай редиса оказался на 230 % выше контрольного. При поливе высших растений водой с пониженным содержанием дейтерия и тяжелого изотопа кислорода получено увеличение биомассы семян арабидопсиса и брассики на 150–200 % в течение полного цикла онтогенеза, а также отмечено наличие антимутогенных свойств. В работе [14] было показано, что после γ -облучения увеличивается выживаемость мышей, употреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия.

Выполненные работы с легкоизотопной водой проведены главным образом на высокоорганизованных биологических объектах [15].

Целью данной работы явилось исследование влияния легкоизотопной воды на рост и соответственно метаболическую активность микроорганизмов.

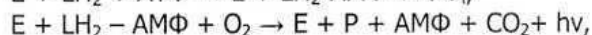
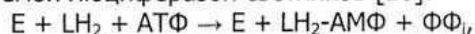
При анализе различных функциональных показателей бактериальной клетки – роста, метаболической и синтетической активности, могут быть использованы микробиологические, биохимические и морфолого-цитологические методы. Микробиологические методы основаны на определении жизнеспособности клеток путем их высевания на питательные среды и подсчете выросших колоний. Однако этот способ трудоемок, требует значительного

числа повторений для получения достоверных результатов. Морфолого-цитологические методы позволяют получать лишь качественную информацию. Биохимические методы основаны на энзимологии и могут быть применимы только в том случае, когда образование продукта из субстрата осуществляется сложными полиферментными системами. Приведенные методы не дают полной информации об общей метаболической активности клетки, которую можно оценить по концентрации внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ), так как известно, что вся запасаемая энергия в живых клетках независимо от источника ее поступления сохраняется в полезной форме в виде АТФ. АТФ обеспечивает функционирование всех биохимических систем, а при уменьшении метаболической активности его количество снижается. Одним из наиболее перспективных является биoluminesцентный метод определения АТФ [7, 10].

Методика

Биoluminesцентный метод определения АТФ является наиболее информативным и высокочувствительным. В основе метода лежит реакция, катализируемая люциферазой светляков.

Схема биoluminesцентной реакции, катализируемой люциферазой светляков [10]:



где E – люцифераза; LH_2 – люциферин; $\Phi\Phi_1$ – неорганический пирофосфат; P – продукт реакции – оксилуциферин.

Помимо люциферазы и люциферина необходимым компонентом реакции является АТФ. Квантовый выход реакции равен 1. При образовании одной молекулы оксилуциферина выделяется 1 квант света, что позволяет определять концентрацию АТФ до 10^{-12} – 10^{-14} М.

Скорость реакции равна интенсивности света, которая измеряется на приборе люминометре Micro luminometre 3560. Для измерения содержания АТФ в клетках их разрушают с помощью диметилсульфоксида [11]. Концентрация АТФ, определяемая биoluminesцентным методом, вычисляется по известной формуле [7].

Число клеточных делений за 1 ч (константа скорости деления) определяется по известной формуле [12].

Результаты и обсуждение

Бактериальная культура *Pseudomonas esterophilus* выращена в аэрируемых колбах с одноразовым внесением минеральной питательной среды без удаления продуктов обмена. Состав среды: KH_2PO_4 – 2,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; NaCl – 0,5; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,125; $FeSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,002 г/л, pH – 7,2 ед. Ис-

точником углеродного питания культуры служил этилацетат (300 мг/л), а азотного – аммонийная соль и аммиак (250 мг/л).

Используемая бактериальная культура *Pseudomonas esterophilus* является аэробным хемогетеротрофом [4]. Известно, что при наличии всех питательных веществ рост микроорганизмов зависит также от концентрации водородных ионов, температуры, осмотического давления, концентрации кислорода. Однако в данной работе показано, что рост и соответственно биокаталитическая активность исследуемой культуры определяется не только названными факторами, но также и изотопным составом воды питательной среды.

Исследовалась питательная среда на основе 2 видов легкоизотопной воды с концентрацией ppm 35 и 70. Контролем служила аналогичная питательная среда на дистиллированной воде. Общее число микроорганизмов в исследуемой воде, наряду с биолюминесцентным методом, определяли путем посева на мясо-пептонный агар. Результаты анализа выражены количеством бактерий в 1 мл исследуемой воды.

Влияние 2 видов легкоизотопной воды, обогащенной минеральными солями и этилацетатом – источником углеродного питания на количественный рост бактериальной культуры *Pseudomonas esterophilus* ($\alpha = 0,90$)

Исследуемая вода	Концентрация бактериальных клеток в 1 мл	Прирост бак. клеток в % по сравнению с контролем	Число клеточных делений за 1 ч	Прирост числа клеточных делений за 1 ч в % по сравнению с контролем
Дистиллированная (контроль), $n = 6^*$	$(0,071 \pm 0,01) \times 10^6$	–	0,89	–
Легкоизотопная ppm = 35, $n = 3^*$	$(0,133 \pm 0,02) \times 10^6$	87,3	0,95	6,7
Легкоизотопная ppm = 70, $n = 5^*$	$(0,096 \pm 0,01) \times 10^6$	35,2	0,92	3,3

Примечание. *n – количество повторностей в эксперименте.

Определение скоростей роста и деления микроорганизмов осуществляли в экспоненциальной фазе, так как она характеризуется постоянной скоростью деления клеток, которая зависит от вида бактерий и состава питательной среды. В таблице представлены результаты исследований по влиянию легкоизотопной воды, обогащенной минеральными солями и органическим компонентом – этилацетатом (300 мг/л), на рост статистической бактериальной культуры *Pseudomonas esterophilus*. Изучено влияние легкоизотопной воды 2 видов: с ppm 35 и 70. В таблице указаны концентрации бактериальных клеток в 1 мл и их прирост в % в сравнении с контролем, в котором компоненты питательной среды растворены в дистиллированной воде. В лег-

коизотопной воде с ppm 35 концентрация бактериальных клеток по сравнению с контролем превышает на 87,3 %, а число клеточных делений за 1 ч (константа скорости деления) – на 6,7 %.

В опыте на легкоизотопной воде с ppm 70 прирост бактериальных клеток по сравнению с контролем составляет 35,2 %, а прирост числа клеточных делений за 1 ч составляет 3,3 %.

Таким образом, на примере бактериальной культуры *Pseudomonas esterophilus* показано, что в питательной среде на легкоизотопной воде с ppm 35 и 70 концентрации выросших микроорганизмов и скорости их деления в разной степени превышают контрольные образцы на дистиллированной воде, что указывает на стимулирование легкоизотопной водой метаболической активности, что приводит к количественному росту бактериальных клеток.

Литература

1. Брандт В. Тяжелая вода и ее биологическое значение // Усп. совр. биол. 1935. Т. 4. № 2. С. 240–247.
2. Гансен К. Изучение биологического действия тяжелой воды на теплокровных животных // Физиол. журн. 1936. Т. 21. № 5–6. С. 725–726.
3. Лобышев В.И., Калиниченко Л.П. Изотопные эффекты воды в биологических системах. М., 1978. С. 215.
4. Назаров Н.М., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. и др. Биотрансформация органических веществ иммобилизованной ассоциативной бактериальной культурой // Авиакосм. и экол. мед. 2004. Т. 38. № 5. С. 42–46.
5. Родимов Б.И. Снеговая вода – стимулятор роста и продуктивности животных и растений // Сельское хозяйство Сибири (Омск). 1961. № 7. С. 66.
6. Родимов Б.И. Действие снеговой воды на живые организмы // Сельскохозяйственное производство Сибири и Дальнего Востока. Омск, 1965. № 4. С. 56–57.
7. Синецын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. М., 1994. С. 205.
8. Сняк Ю.Е., Григорьев А.И. Оптимальный изотопный состав биогенных химических элементов на борту пилотируемых космических аппаратов // Авиакосм. и экол. мед. 1966. Т. 30. № 4. С. 26–30.
9. Сняк Ю.Е., Левинских М.А., Гайдадымов В.Б. и др. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия на культивирование высших растений *Arabidopsis Thaliana* и *Brassica* // Матер. Рос. конф. «Организм и окружающая среда: жизнеобеспечение и защита человека в экстремальных условиях» (26–29 сентября, 2000). М., 2000. С. 90–92.

10. Угарова Н.Н., Бровко Л.Ю. Биolumинесцентный анализ и биolumинесценция. М., 1981. С. 340.
11. Угарова Н.Н., Бровко Л.Ю., Трдатян И.А., Райнина Е.И. Биolumинесцентный метод анализа в микробиологии // Прикладная биохимия и микробиология. 1987. № 1. С. 14–24.
12. Шлегель Г. Общая микробиология. М., 1972. С. 179.
13. Bild W., Stefanescu I., Haulica I. et al. Research concerning the radioprotective and immunostimulating effects of deuterium-depleted water // Rom. J. Physiol. 1999. Jul. – Dec. V. 36 (3–4). P. 205–218.
14. Kritchevsky D. Deuterium in biology // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1960. V. 84. P. 575–581.

Поступила 30.03.11

EFFECT OF LIGHT-ISOTOPE WATER ON GROWTH OF BACTERIAL CULTURE

**N.M.Nazarov, Yu.E.Sinyak, E.N.Efremenko,
N.A.Stepanov, E.Yu.Malyukh**

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia).
2011. V. 45. № 3. P. 63–66

*The stimulating effect of light-isotope water on microbial growth was demonstrated in bacterial culture *Pseudomonas esterophilus*.*

Nutrient medium was prepared of mineral salts and ethyl acetate as a source of carbon dissolved in light-isotope water with ppm 35 and 70; the control medium contained same components dissolved in distilled water.

The investigation showed an increase in the number of bacterial cells in the exponential stage of growth in static culture in light-isotope water as compared with the control.

Specifically, accretion made up 87.3 and 35.2% in light-isotope water with ppm 35 and 70, respectively. In an hour, the number of cell divisions increased by 6.7% and 3.3 %, respectively.

Therefore, light-isotope water stimulates the metabolic activity and, consequently, growth of bacterial cells.