

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ В ПРОЦЕССЕ ОЧИСТКИ ВОДЫ ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ЦЕНОЗОМ

© 2002 И.Ф. Шаталаев, И.В. Фомин,¹ П.П. Пурыгин, Ю.П. Зарубин²

Метод электрофореза в полиакриламидном геле был использован для изучения состава и динамики молекулярных форм малатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы и каталазы иммобилизованного ценоза в процессе обработки сточных вод на нефтеперерабатывающем заводе. Было установлено, что активность множественных молекулярных форм изученных ферментов непосредственно зависит от условий обработки на производстве. Перспективен биомониторинг модельных гидроэкосистем по динамике молекулярных форм ферментов анаэробно-аэробного метаболизма.

Введение

В лабораторных и опытно-промышленных испытаниях показана возможность и перспективность биологической очистки промышленных сточных вод иммобилизованным на синтетических волокнах ценозом в анаэробно-аэробных условиях [1, 2]. В настоящее время метод успешно внедряется в различных регионах, в том числе и в Поволжье. Для контроля работы сооружений биологической очистки с применением иммобилизованного ценоза требуются надежные, информативные способы оценки функционального состояния экосистемы, характеризующие процессы ее метаболизма.

В данной работе представлены результаты изучения динамики и активности молекулярных форм (МФ) таких ключевых ферментов обмена, как малатдегидрогеназа (МДГ, КФ 1.1.1.37), глутаматдегидрогеназа (ГДГ, КФ 1.4.1.2) и каталаза (КФ 1.11.1.6) в процессе очистки сточных вод нефтеперерабатывающего завода ПО "Самаранефтеоргсинтез" иммобилизованным ценозом.

Методика исследований

Исследования проводили на действующих сооружениях, работающих в проточном режиме без аэрации на первой ступени и с микроаэрацией на второй ступени

¹ Шаталаев Иван Федорович, Фомин Игорь Викторович, кафедра химии фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета, 443001, Самара, ул. Арцыбушевская, 171.

² Пурыгин Петр Петрович, Зарубин Юрий Павлович, кафедра органической химии Самарского государственного университета, 443011, Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

очистки. Пробы иммобилизованной биомассы отбирали на входе, в центре и выходе из первой ступени, в центре второй ступени, а также в отстойниках после первой и второй ступеней очистки.

Ферментные образцы получали следующим способом: 1.0–1.5 г сырой биомассы трехкратно отмывали 0.1 М фосфатным буфером с pH 7.0 от фоновых загрязнений, центрифугировали при 5000g 10 мин. Осадок дезинтегрировали в механическом дезинтеграторе в течение 5 мин при 4 °С. Затем переносили его в колбу, добавляли 5 мл фосфатного буфера и тритона X-100 в конечной концентрации 20 мг/мл. Колбу помещали на магнитную мешалку для солюбилизации ферментов на 2 ч при 37 °С. Гомогенат центрифугировали при 8000g 10 мин. В супернатанте определяли МФ МДГ, ГДГ и каталазы методом электрофореза в плоских блоках полиакриламидного геля. В работе использовали реактивы и материалы для диск-электрофореза ("Reanal", Венгрия).

Анализируемые образцы в объеме 50 мкл в смеси с 40% раствором сахарозы наносили на линию старта, в качестве электродного буфера использовали 1 М трис-ЭДТА-боратный буфер с pH 9.2. Электрофорез проводили при величине тока 5.0 мА/см в первые 30 мин, а затем 10.0 мА/см до окончания электрофореза. МФ МДГ и ГДГ выявляли феназинметасульфат-тетразолиевой реакцией в средах следующего состава.

Для МФ МДГ: водные растворы НАД (1 мг/мл) — 40 мл, нитросиний тетразолиевый (1 мг/мл) — 25 мл, 1 М раствор малата натрия с pH 7.0 — 10 мл, феназинметасульфат (1 мг/мл) — 4 мл, 0.2 М трис-HCl буфер с pH 7.1 — до 100 мл. Инкубировали 2 ч при 37 °С, МФ МДГ выявлялись в виде темно-синих зон.

Для МФ ГДГ: водные растворы НАД (1 мг/мл) — 40 мл, нитросиний тетразолиевый (1 мг/мл) — 30 мл, L-глутамат натрия 1 М раствор с pH 7.0 — 5 мл, феназинметасульфат (1 мг/мл) — 2 мл, 0.1 М фосфатный буфер с pH 7.0 — до 100 мл. Инкубировали 3 ч при 37 °С, МФ ГДГ выявлялись в виде темно-синих зон.

Для каталазы: блоки геля выдерживали 10 мин в дистиллированной воде, затем погружали на 10 мин в 0.03% раствор пероксида водорода, промывали водой и помещали в смесь, состоящую из 10% раствора железа хлорида и 10% раствора калия феррицианида (1:1), на 8 мин. Зоны, содержащие каталазу, имели вид желтых полос на темно-зеленом фоне берлинской лазури. Общую активность каталазы определяли модифицированным методом Баха [3–5].

Относительную активность МФ исследуемых ферментов устанавливали путем прямой денситометрии на анализаторе фореграмм АФ-1 (ПО "Львовприбор", Украина). Количество белка в образцах определяли биуретовой реакцией.

Результаты исследований и их обсуждение

На входе в первую ступень в анаэробных условиях МДГ выявляется в виде трех активных зон — МДГ-1, МДГ-2 и МДГ-3. Зоны МДГ-1 и МДГ-3 включают по одной МФ, в то же время МДГ-2 представлена в составе четырех МФ. К центру первой ступени очистки общая активность МДГ возрастает в 1.5 раза, причем число МФ МДГ-2 увеличивается с четырех до шести. На выходе из первой ступени общая активность фермента продолжает расти, а область МДГ-2 представлена уже семью МФ. Микроаэрация на второй ступени очистки приводила к росту общей активности МДГ, число МФ оставалось равным девяти. В отстойниках после первой и второй ступеней общая активность фермента заметно снижается, число МФ уменьшается до шести.

Установлена следующая динамика относительной активности МФ МДГ: возрастание МДГ-1 к выходу из биореактора и некоторое снижение МДГ-3. Относительная активность МДГ-2 остается на уровне входа. На второй ступени отмечено заметное падение активности МДГ-3 и незначительная активация МДГ-1 и МДГ-2. Следует отметить снижение активности МДГ-1 и МДГ-2 в отстойниках при одновременном увеличении таковой МДГ-3 (табл. 1).

Таблица 1
Динамика относительной активности МФ МДГ иммобилизованного ценоза

МФ МДГ	Относительная активность, %					
	первая ступень				вторая ступень	
	вход	центр	выход	отстойник	центр	отстойник
МДГ-1	6.3	7.4	9.5	3.8	6.7	1.0
МДГ-2	62.7	63.0	63.5	53.4	70.0	49.0
МДГ-3	31.0	29.6	27.0	42.8	23.3	50.0

МДГ — аэробный фермент, участвует в переносе восстановленных эквивалентов через мембранные системы и в целом характеризует функциональное состояние экосистемы, кислородный режим и окислительную мощность биореактора [6]. В предыдущем сообщении нами высказывались предположения о локализации МДГ-3 в толще мембран, а МДГ-1 и МДГ-2 — на внутренней поверхности мембран и цитозоле клеток активного ила. Там же экспериментально подтверждено преобладание МДГ-3 в окислительных процессах очистки сточных вод активным илом в аэробных условиях.

Данные экспериментов показывают, напротив, снижение активности МДГ-3 в процессе очистки и активацию ее во вторичных отстойниках, что может быть следствием или недостатка кислорода в биореакторе, или ингибирования избытком субстрата. Основная же активность фермента концентрируется в области МДГ-2, причем в процессе очистки число МФ МДГ-2 возрастает до семи без видимых изменений в относительной активности. Такая динамика МФ свидетельствует в целом о неблагоприятных условиях для МДГ иммобилизованного ценоза, лимитированных содержанием кислорода в сточной воде. К тому же доступ кислорода в биореактор затруднен вследствие образования на поверхности пленки из нефти.

ГДГ представлена пятью МФ, причем на входе в первую ступень основная активность концентрируется в области ГДГ-5. К центру биореактора и на выходе из него отмечается значительная инактивация ГДГ-1 и ГДГ-5 при одновременном росте активности ГДГ-2 и ГДГ-3. На второй ступени очистки наблюдали продолжение роста активности ГДГ-2 и ГДГ-3 и активацию ГДГ-4. Активность ГДГ-1 ниже таковой входа в первую ступень, а активность ГДГ-5 падает до минимума. Заслуживает внимания факт резкой перестройки в соотношении активности МФ ГДГ в отстойниках: двух-пятикратная активация ГДГ-5 и ингибирование МФ ГДГ-1, ГДГ-2 и ГДГ-3 (табл. 2).

Установлена следующая динамика общей активности ГДГ в процессе очистки: максимальная на входе в первую ступень, постепенное падение к выходу из биореактора и достижение активности входа в отстойнике. На второй ступени в центре биореактора активность ГДГ на уровне таковой выхода из первой ступени, отмечена активация фермента во вторичном отстойнике.

ГДГ — фермент анаэробного метаболизма — является ведущим дезаминирующим ферментом белков и аминокислот. Аминогруппы последних переносятся на

Таблица 2

Динамика относительной активности МФ ГДГ иммобилизованного ценоза

МФ ГДГ	Относительная активность, %					
	первая ступень				вторая ступень	
	вход	центр	выход	отстойник	центр	отстойник
ГДГ-1	12.0	8.2	6.1	3.8	8.7	1.0
ГДГ-2	18.0	27.7	35.8	7.4	38.8	5.5
ГДГ-3	15.8	18.5	20.0	10.0	22.2	14.0
ГДГ-4	14.5	13.5	14.0	19.3	23.0	32.0
ГДГ-5	39.7	34.1	24.1	59.5	8.1	47.5

2-кетоглутаровую кислоту с образованием глутамата, а под действием ГДГ вновь превращается в 2-кетоглутаровую кислоту [7]. Обратимость этой реакции имеет фундаментальное значение в обменных процессах, что определяет важность ее исследования в экосистемах.

Анализ изменений в соотношениях активности МФ ГДГ позволяет предположить, что ГДГ-4 и ГДГ-5 проявляют максимальную активность в анаэробных условиях. Этот факт заслуживает внимания, поскольку именно в этих областях концентрируется основная масса фермента; более низкомолекулярные формы активны в анаэробно-аэробных условиях.

Общая активность каталазы на выходе из первой ступени очистки в 1.5–2 раза превосходит таковую на входе, затем снижается в отстойниках до уровня входа.

На второй ступени активность каталазы вновь достигает уровня выхода из первой ступени, во вторичном отстойнике примерно равна таковой отстойника после первой ступени.

На электрофореграммах каталаза представлена двумя МФ — К-1 и К-2. Однако на выходе из первой ступени в области К-2 выявлена еще одна МФ каталазы. Рост активности каталазы в процессе очистки указывает на накопление пероксидных соединений, а выявление еще одной МФ на выходе из первой ступени очистки можно объяснить или диссоциацией К-2 на протомеры, или синтезом адаптивной МФ каталазы.

Проведенные исследования свидетельствуют о существенном преобладании в биореакторах анаэробных процессов над аэробными, торможением ферментов окислительного фосфорилирования и цикла трикарбоновых кислот. Это, в свою очередь, приводит к снижению эффективности работы биореакторов, на что указывает качество очистки сточных вод (табл. 3).

Результаты экспериментов позволили рекомендовать коррекцию технологии очистки, предполагающую анаэробные условия на входе в первую ступень, микроаэрацию в центре, аэрацию на выходе из первой ступени и аэрацию во всем объеме биореактора на второй ступени. По истечении 15 сут адаптации экосистемы эксперименты были продолжены.

После коррекции технологии по мере очистки сточных вод на первой ступени активность МДГ возрастала, причем отмечена почти двукратная активация МДГ-3 при неизменной активности МДГ-2 и понижении таковой у МДГ-1. Аэрация на второй ступени привела к росту активности МДГ-3 и МДГ-1. В отстойниках наблюдали 2–4-кратную активацию МДГ-1 и некоторое снижение активности МДГ-2 и МДГ-3 (табл. 4). Следует отметить, что в области МДГ-2 в образцах ценоза обоих биореакторов выявлялось только четыре МФ.

Таблица 3

Показатели работы биореактора до и после коррекции технологии очистки

Показатель	До коррекции	После коррекции
ХПК, мг O ₂ /л	240.0	132.0
БПК ₅ , мг O ₂ /л	28.7	18.0
БПК _{полн} , мг O ₂ /л	33.5	24.0
Прозрачность, см	5.4	8.2
Содержание, мг/л:		
кислород	1.5	4.8
поверхностно-активные вещества	3.5	2.2
фенол	0.012	0.009
нефтепродукты	2.7	1.8
взвешенные вещества	72.0	28.0
сульфаты	337.0	287.0
сероводород	отс.	отс.
нитриты	0.4	0.3
нитраты	0.9	0.9
азот аммонийный	41.0	38.0
фосфаты (P ₂ O ₅)	0.6	0.1
медь	0.008	0.008
железо	1.6	0.7

Таблица 4

Динамика относительной активности МФ МДГ

МФ МДГ	Относительная активность, %					
	первая ступень				вторая ступень	
	вход	центр	выход	отстойник	центр	отстойник
МДГ-1	4.2	2.7	1.0	20.0	9.0	17.1
МДГ-2	80.5	76.2	70.8	65.6	62.0	59.8
МДГ-3	15.3	21.1	28.2	14.4	29.0	23.1

ГДГ представлена также пятью МФ. Установлено некоторое понижение общей активности ГДГ к выходу из первой ступени со следующими изменениями в отношении активности МФ в разных точках биореактора: активация ГДГ-1 от входа к центру и незначительное снижение к выходу, активация ГДГ-2 и ГДГ-3, падение активности ГДГ-4 и ГДГ-5. В центре второй ступени отмечена активация ГДГ-2, ГДГ-3 и снижение таковой у ГДГ-5. В отстойниках основная активность сконцентрирована в области ГДГ-4 и ГДГ-5 (табл. 5).

Каталаза по молекулярному составу и активности в целом соответствует таковой до коррекции технологии, однако необходимо отметить увеличение общей активности каталазы на выходе из первой ступени и наличие только двух МФ каталазы — К-1 и К-2.

Данные качества воды на выходе из вторичного отстойника представлены в табл. 3.

На основании проведенных исследований можно заключить, что состав и динамика МФ ферментов в процессе очистки сточных вод иммобилизованным на стекловолокне ценозом являются результатом окислительно-восстановительных реак-

Таблица 5

Динамика относительной активности МФ ГДГ

МФ ГДГ	Относительная активность, %					
	первая ступень				вторая ступень	
	вход	центр	выход	отстойник	центр	отстойник
ГДГ-1	9.5	12.0	10.8	8.1	7.7	6.1
ГДГ-2	5.5	11.3	13.8	13.2	21.2	11.4
ГДГ-3	12.8	7.1	24.1	3.6	20.2	10.2
ГДГ-4	18.4	19.0	14.5	17.3	20.7	22.8
ГДГ-5	53.8	50.6	37.8	57.8	30.2	49.5

ций, характеризующих потребность экосистемы в субстратах. Молекулярные формы, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся по ряду свойств, обеспечивают контроль скорости и направления метаболических процессов в экосистеме при очистке сточных вод. Увеличение числа МФ МДГ и каталазы на первой ступени очистки, очевидно, связано с общей неблагоприятной ситуацией и направлено на стабилизацию экосистемы, развитие которой лимитировано содержанием кислорода в биореакторе. Коррекция технологии привела к динамическому равновесию анаэробно-аэробных процессов обмена и стабилизации экосистемы.

Литература

- [1] Никовская Г.Н., Гвоздяк П.И., Шамолина И.И. Иммунизация деструктора алкилбензолсульфоната *Pseudomonas alcaligenes* TR на синтетических волокнах // Биотехнология. 1990. № 2. С. 53–56.
- [2] Унгуриану Д.В., Ионец И.Г. Анаэробная обработка сточных вод с помощью прикрепленной микрофлоры // Биотехнология. 1990. № 2. С. 48–50.
- [3] Гааль Э., Медьеша Г., Верецкей Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 448 с.
- [4] Генетика изоферментов / Л.И. Корочкин, О.Л. Серов, А.И. Пудовкин и др. М.: Наука, 1977. 275 с.

COMPOSITION AND ACTIVITY OF MOLECULAR FORMS OF SOME OXIDOREDUCTASES IN THE PROCESS OF SEWAGE TREATMENT WITH IMMOBILIZED CENOSIS

© 2002 I.F. Shatalaev, I.V. Fomin,³ P.P. Purygin, Yu.P. Zarubin⁴

The method of electrophoresis in polyacrylamide gel is used to study the composition and dynamics of molecular forms of malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase and catalase of immobilised cenosis during processing sewage at an oil refining factory. It is shown that multiple molecular enzymes forms activity directly depends on the treatment conditions. Perspectives of model hydroecosystems biomonitoring on anaerobic-aerobic metabolism enzymes molecular forms dynamics are discussed.

Поступила в редакцию 9/XII/2002.

³ Shatalaev Ivan Fyodorovich, Fomin Igor' Viktorovich, Dept. of Chemistry of Farmaceutical Faculty, Samara State Medicinal University, Samara, 443001, Russia.

⁴ Purygin Pyotr Petrovich, Zarubin Yury Pavlovich (zarubin@ssu.samara.ru), Dept. of Organic Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.