

УДК 627.15.57

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ L-ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПРОЦЕССЕ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ИММОБИЛИЗОВАННЫМ МИКРОЦЕНОЗОМ

Шаталаяев И.Ф., Фомин И.В., Расцветова Н.В.

*ФГОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет Министерства
здравоохранения РФ», Самара, e-mail: shatalaev@list.ru*

Проведено исследование структуры, гетерогенности, общей и относительной активности L-глутаматдегидрогеназы (ГДГ) иммобилизованного микроценоза биореакторов. Обнаружены основная форма фермента и минорные, представляющие, по-видимому, конформационные изомеры, незначительно отличающиеся по относительной электрофоретической подвижности. Увеличения гетерогенности ГДГ в процессе развития экосистем не выявлено. Установлено явное предпочтение реакции окислительного дезаминирования глутамата во вторичных отстойниках и в головных отсеках биореакторов. Переход сточных вод в аэрируемые участки сопровождается изменением соотношения активности молекулярных форм ГДГ в пользу восстановительного аминирования 2-оксoglutarate. Предпочтение реакции окислительного дезаминирования глутамата при относительном анаэробии подтверждено в сериях экспериментов в условиях, лимитированных содержанием кислорода. Данные о составе и соотношении активности МФ ГДГ иммобилизованных микроценозов могут быть использованы для организации контроля очистки сточных вод в биореакторах.

Ключевые слова: глутаматдегидрогеназа (ГДГ), иммобилизованные микроценозы, гидроэкосистемы

MOLECULAR FORMS OF L-GLUTAMATE DEHYDROGENASE IN THE WASTEWATER TREATMENT PROCESS IMMOBILIZED MICROCENOSIS

Shatalaev I.F., Fomin I.V., Rastsvetova N.V.

Samara State Medical University, Samara, e-mail: shatalaev@list.ru

The study of structure, heterogeneity, general and relative activity of L-glutamate dehydrogenase (GDH) immobilized microcencosis bioreactors. Detected major and minor form of the enzyme, representing, presumably, conformational isomers, which differ slightly from the relative electrophoretic mobilities. Increasing heterogeneity in the GFG raz-vitiya ecosystems have been identified. Established a clear preference for the oxidative deamination of glutamate in the secondary sedimentation tanks and head compartments bioreactors. Go wastewater in aerated areas soprovozhdaet-sya change in the ratio of activity of molecular forms of GDH in favor reductive amination of 2-oxoglutarate. Preference oxidative deamination of glutamate at a relative anaerobiosis pod-tverzhdeno in a series of experiments in conditions whether mitirovannyh-oxygen content. Data on the composition and ratio of activity MF GDH immobilized microbial community may be used for the organization of the control of sewage treatment in bioreactors.

Keywords: glutamate dehydrogenase (GDH), immobilized microbial community, hydroecosystems

Неуклонное увеличение использования водных ресурсов сопровождается возрастающим влиянием антропогенных факторов на режим водоемов и водные экосистемы. Прогнозы интенсивности водопотребления показывают, что антропогенный пресс на гидроэкосистемы будет продолжаться и в отдаленной перспективе может привести к непредвиденным последствиям. Биологическая очистка городских и промышленных сточных вод практически во всех странах мира на 90% производится в аэротенках. Городские станции аэрации и сооружения биологической очистки сточных вод промышленных производств в середине прошлого столетия были единственной преградой глобального загрязнения внешних и внутренних водоемов. Однако уже через 20 – 30 лет интенсивной эксплуатации аэротенков возникли серьезные проблемы, касающиеся утилизации избыточного активного ила. Огромные площади земли изъяты из оборота в связи с шламированием отра-

ботанного активного ила, который зачастую содержит недоокисленные адсорбированные соединения органического и неорганического характера с различной степенью токсичности. Проблема усугубляется проникновением недоокисленных соединений в верхние горизонты подземных вод и угрозой попадания в скважинные воды.

В настоящее время в лабораторных, опытно-промышленных и промышленных испытаниях показана возможность и перспективность биологической очистки городских и промышленных сточных вод иммобилизованным на синтетических волокнах ценозом в анаэробно-аэробных условиях [3–5]. Разработанные методы внедряются в различных регионах России. Перспективность метода заключается в том, что снимается основная проблема биологической очистки в аэротенках – отсутствие избыточного активного ила и исключение шламирования илов. Иммобилизованный на синтетических волокнах микроценоз в итоге представляет

собой смешанную популяцию бактерий, простейших, грибов, колловраток и водорослей, образующих пищевую цепь. В ценозе образуется несколько трофических уровней: первый представлен гетеротрофными бактериями, высокая окислительная способность которых обуславливает их ведущую роль в биодеградации загрязнителей; на втором уровне находятся жгутиконосцы, ресничные инфузории и колловратки; третий уровень представлен сосущими инфузориями. Количество организмов каждого трофического уровня зависит от таких факторов, как состав поступающей сточной воды, температуры, pH, концентрации кислорода и др. В зависимости от технологических параметров образуется замкнутая модельная гидроэкосистема – биореактор.

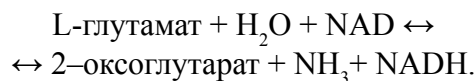
Опыт эксплуатации биореакторов показал, что эффективность их работы зависит от многочисленных факторов, из которых следует выделить кислородный режим. Большинство разработанных методов биологической очистки сточных вод иммобилизованным ценозом на синтетических носителях предполагает анаэробно-аэробные условия с преобладанием анаэробных процессов окисления загрязнителей. Иммобилизация клеток-деструкторов загрязнителей на носителях – несомненно, новое, перспективное и сложное направление в биотехнологии. Конструирование таких биоценозов требует специалистов высокой квалификации, владеющих фундаментальными знаниями микробиологии, гидробиологии, биохимии и других смежных дисциплин.

Применяемые в настоящее время традиционные методы определения и контроля функционального состояния модельных и природных гидроэкосистем не дают исчерпывающей информации о молекулярных и субмолекулярных механизмах стабилизации последних. В связи с этим особое значение приобретают исследования, направленные на изучение состава молекулярных форм ключевых ферментов метаболизма микроценозов гидроэкосистем, их роли в реанимации при техногенных, особенно экстремальных воздействиях на водные экосистемы.

Для организации непрерывного биомониторинга природных и модельных гидроэкосистем, в частности, процессов биологической очистки воды в биореакторах, требуются надежные, информативные способы оценки функционального состояния иммобилизованных микроценозов, характеризующие процессы метаболизма и окислительную мощность биореакторов в целом. Одним из таких ферментов является глутаматдегидрогеназа (ГДГ).

Глутаматдегидрогеназа (L-глутамат: NAD-оксидоредуктаза дезаминирующая,

1.4.1.2., ГДГ) катализирует обратимое превращение L-глутамата в 2-оксоглутарат:



ГДГ является ведущим дезаминирующим ферментом метаболизма белков и аминокислот. Аминогруппы последних переносятся на 2-оксоглутаровую кислоту с образованием глутамата. Под действием ГДГ глутамат вновь превращается в 2-оксоглутаровую кислоту. Обратимость реакции имеет фундаментальное значение в синтезе аминокислот, обмене белков и углеводов, включении промежуточных продуктов метаболизма в цикл трикарбоновых кислот. Ключевое положение ГДГ в процессах метаболизма определяет важность исследования состава, степени гетерогенности и динамики активности ее молекулярных форм (МФ) в ценозах модельных и природных гидроэкосистем, тем более что биосинтетические пути глутамата предположительно одинаковы для всех живых систем, в том числе и для микробных сообществ гидроэкосистем.

Цель работы. Определить состав молекулярных форм, общую и относительную активность L-глутаматдегидрогеназы иммобилизованного микроценоза биореакторов.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на действующих сооружениях биологической очистки сточных вод НПЗ, работающих в проточном режиме без аэрации на первой ступени и с микроаэрацией на второй ступени 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 5000 об/мин 10 мин. Осадок дезинтегрировали в механическом дезинтеграторе в течение 5 мин при 4°C. 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 фермента на 2 ч при 37°C. Гомогенат центрифугировали при 8000 об/мин 10 мин. В супернатанте определяли МФ ГДГ 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 первые 30 мин, а затем 10,0 мА/см до окончания электрофореза. МФ ГДГ выявляли фенолметасульфат-тетразолиевой реакцией в среде следующего состава: водные растворы НАД (1 мг/мл) – 40 мл, нитросинего