УДК 547:661.52:576.8

ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ НЕКОТОРЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ МИКРОСООБЩЕСТВ МОДЕЛЬНЫХ ГИДРОЭКОСИСТЕМ

© 2009 А.И. Агапов, Н.И. Шаталаев, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев
Самарский государственный медицинский университет
Статья получена 20.09.2009

Приведены данные исследований фракционного состава белков, активности молекулярных форм глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы микросообществ модельных гидроэкосистем по фазам развития и при действии ряда токсикантов. Показана возможность применения полученных результатов для биомониторинга гидроэкосистем.

Ключевые слова: *микросообщества, биомониторинг гидроэкосистем, токсиканты*

Исследованию белкового состава отдельных видов гидробионтов, популяций и сообществ микроорганизмов посвящено значительное число работ. Очевидно, что информация о содержании общего количества белка, фракционном составе дает возможность оценить степень влияния антропогенных факторов и стрессовых ситуаций на механизмы реализации генетической информации и наследственность [1]. Наиболее серьезные и полные исследования ферментов пентозофосфатного цикла гидробионтов проведены на пресноводных и морских популяциях [2]. Исследованию глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-ФД) посвящено значительное число работ. Показано, что величина отношения активности пускового фермента Гл-6-ФД к суммарной активности ферментов метаболизма пентозофосфатов может быть неспецифическим биоиндикационным параметром для количественной оценки физиологического состояния популяций гидробионтов и оценки влияния окружающей среды [3, 4].
Литературные данные свидетельствуют о важности пентозофосфатного окисления гексоз и вместе с тем, о незначительном объеме информации по Гл-6-ФД и ее молекулярных форм (МФ) в микросообществах гидроэкосистем. Эта информация крайне необходима для оценки роли пентозофосфатного пути окисления гексоз и степени ее интегрированности с другими путями метаболизма в естественно развивающихся модельных и природных гидроэкосистемах и при действии антропогенных факторов [5].

Агапов Альберт Иванович, доктор биологических наук, профессор кафедры общей, бионеорганической и биоорганической химии.
Шаталаев Никита Иванович, аспирант. E-mail: cyric@proezd.net
Воронин Александр Васильевич, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры химии фармацевтического факультета. E-mail: dimmu2000@mail.ru
Шаталаев Иван Федорович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) занимает одно из ключевых положений в обменных процессах микросообществ активного ила, поэтому данные об активности фермента позволяют судить о скорости функционирования цикла Кребса. В доступной литературе практически отсутствует информация по использованию данных о динамике активности и структурной организации СДГ в мониторинге экосистем. Эти данные могут быть использованы в качестве интегрального показателя оценки физиологического и функционального состояния микросообществ модельных и природных гидроэкосистем. Высокая чувствительность СДГ к действию ксенобиотиков может быть положена в основу одного из методов биомониторинга последних [6].

Цель настоящей работы – исследование фракционного состава белков, структурных особенностей, динамики относительной активности молекулярных форм Гл-6-ФД и СДГ гидроэкосистем активного ила по фазам развития, при моделировании залповых сбросов сточных вод и их компонентов.

Материал и методы исследования. В качестве модельных гидроэкосистем использовали активный ил регенераторов сооружений биологической очистки нефтеперерабатывающего завода. После удаления фоновых загрязнений ил помещали в аэратор периодического действия, исходная концентрация биомассы составляла 0,8-1,0 г/л. Источником углерода в среде являлась глюкоза в концентрации 1 г/л. Фазы развития экосистемы контролировали по показателям оптической плотности и сухому остатку биомассы. На разных фазах имитировали залповые сбросы сточных вод и их компонентов. Получение ферментных образцов, электрофорез, определение молекулярной массы белковых фракций, выявление МФ Гл-6-ФД и СДГ, определение их активности проводили по методикам, описанным в литературе [6].

Результаты и их обсуждение. На всех фазах развития модельной гидроэкосистемы были выявлены три основные фракции белка: первая – «быстромигрирующая» с молекулярной массой 14500-15000; а также две фракции – 43000-50000 и 58000-60000. Из литературных источников известно, что молекулярная масса белков большинства бактерий имеет сравнительно малую величину – до 90000-100000, что согласуется с полученными нами данными. Было отмечено значительное уменьшение количества белка во всех фракциях от фазы адаптации к фазе лог-роста и стационарной фазе – до 70% от первоначальной величины в фазе адаптации.

Необходимо отметить, что в фазе лог-роста происходило увеличение активности неспецифических дегидрогеназ – в 2,5-3,0 раза по сравнению с фазой адаптации. Очевидно, что такие изменения в составе фракций белка обусловлены интенсивным синтезом специфических ферментов в фазе лог-роста и на переходе стационарной фазе. На всем протяжении стационарной фазы и до фазы заката экосистемы количество белка в трех фракциях оставалось на уровне количества фазы лог-роста. В таблице 1 представлены данные о фракционном составе белков микросообществ модельной гидроэкосистемы при имитации залповых сбросов сточных вод нефтехимических производств, их компонентов и соединений Pb, Zn.

Таблица 1. Фракционный состав белков микросообществ модельных гидроэкосистем

Сточные воды, компоненты	Биомасса: сточная вода; концентрация мг/ г биомассы	Контроль		Опыт	
		общий белок, %	количество фракций белка	общий белок, %	количество фракций белка
сточные воды НПЗ	1:10	8,32	3	8,12	-
производство СЖК	1:20	7,31	3	8,05	-
производство АСП	1:20	7,31	3	7,10	2
производство карбамида	1:20	7,31	3	7,60	-
СМС «Прогресс»	50,0	7,62	3	7,63	3
	100,0	7,62	3	7,92	1
	150,0	7,62	3	7,56	-
углеводороды	150,0	8,32	3	8,16	1
диизобутил-п-крезол	200,0	8,32	3	7,85	3
гидрохинон	18,0	6,18	3	6,30	2
о-крезол	100,0	6,18	3	6,05	2
фенол	100,0	6,18	3	6,25	2
диизобутил-п-крезол + СМС «Прогресс»	200,0+150,0	8,32	3	8,00	1
свинца ацетат	11,0-19,0	6,92	3	6,54	-
цинка ацетат	18,0-32,0	6,92	3	7,00	-

Примечание: НПЗ – нефтеперерабатывающий завод; СЖК – синтетические жирные кислоты; АСП – алкилсалицилатные присадки

Действие синтетического моющего средства «Прогресс» в интервале концентраций 50,0-150,0 мг/г биомассы вызывало «уход» всех трех фракций белка с электрофореграмм, при этом общее количество белка сохранялось на одинаковом уровне. Аналогичные результаты были получены при имитации залповых сбросов сточных вод цехов производства синтетических жирных кислот и карбамида. Действие солей металлов: свинца и цинка нитрата в концентрациях 11,0-19,0 и 18,0-32,0 мг/г биомассы соответственно при экспозиции 60 мин вызывало эффект «ухода» белковых фракций с электрофореграмм.

Аэробная стабилизация гидроэкосистемы в течение 24-72 ч после мощного действия токсичных соединений сопровождалась выявлением на электрофореграммах до семи фракций белка с молекулярной массой от 5000 до 20000. Полученные данные подтверждают выводы других авторов о синтезе низкомолекулярных белков в ответ на действие стрессовых концентраций токсикантов.

Представляются интересными качественные и количественные изменения белковых фракций при воздействии на модельную гидроэкосистему диизобутил-п-крезола, который является пищевым и техническим антиоксидантом. Экспозиция 1 час с вышеуказанным соединением приводила к увеличению количества белка во всех фракциях до 40% по сравнению с контролем. Совместное действие диизобутил-п-крезола с СМС «Прогресс» в концентрации 150,0 мг/г биомассы не вызывало уменьшения количества общего белка, однако обнаруживалась только одна белковая фракция.

С увеличением концентрации токсичных компонентов в гидроэкосистемах белки гидробионтов постепенно теряют способность фиксировать специфические красители, что является следствием глубоких изменений структуры белка, величины заряда. Эти данные могут быть положены в основу метода биотестирования токсичности сточных вод промышленных производств.

В фазе адаптации модельных гидроэкосистем активного ила Гл-6-ФД представлена четырьмя активными зонами, причем в третьей зоне выявлено две МФ. В начале фазы лог-роста установлено пять активных зон фермента, при этом количество МФ возрастает с пяти до девяти со следующим распределением по зонам: первая зона – две МФ, вторая – одна, третья – три, четвертая – две и пятая зона активности – одна МФ. В стационарной фазе число МФ составляет семь и остается без изменения вплоть до фазы отмирания (рис. 1).

В водной среде моделей экосистем в фазе адаптации Гл-6-ФД не обнаруживается. В начале фазы лог-роста и до фазы замедленного роста выявлено до семи экзогенных зон вышеуказанного фермента. Наиболее выражена активность низкомолекулярных форм. К стационарной фазе число экзогенных МФ фермента уменьшается до шести, а в конце стационарной фазы выявлено только три МФ Гл-6-ФД. По электрофоретической подвижности экзогенные МФ Гл-6-ФД соответствуют значениям электрофоретической подвижности эндоферментов. Необходимо отметить, что в водной среде на протяжении всего цикла развития экосистемы не выявлена пятая зона активности.

Полученные данные подтверждают наличие пентозофосфатного пути окисления гексоз в моделях микросообществ гидроэкосистем, интенсивность которого возрастает по мере развития экосистемы до стационарной фазы. Изоферментный профиль Гл-6-ФД, изменение его гетерогенности и выявление в фазе лог-роста дополнительной зоны активности позволяют предположить наличие механизмов «тонкой» регуляции пентозофосфатного цикла, осуществляемых наиболее динамичными в развивающейся экосистеме низкомолекулярными формами фермента. Максимальная гетерогенность Гл-6-ФД наблюдается в фазе лог-роста. Это может быть объяснено нарастанием разнообразия метаболитов в данной фазе, достижением гомеостаза экосистемы и подготовкой к ее стабилизации.

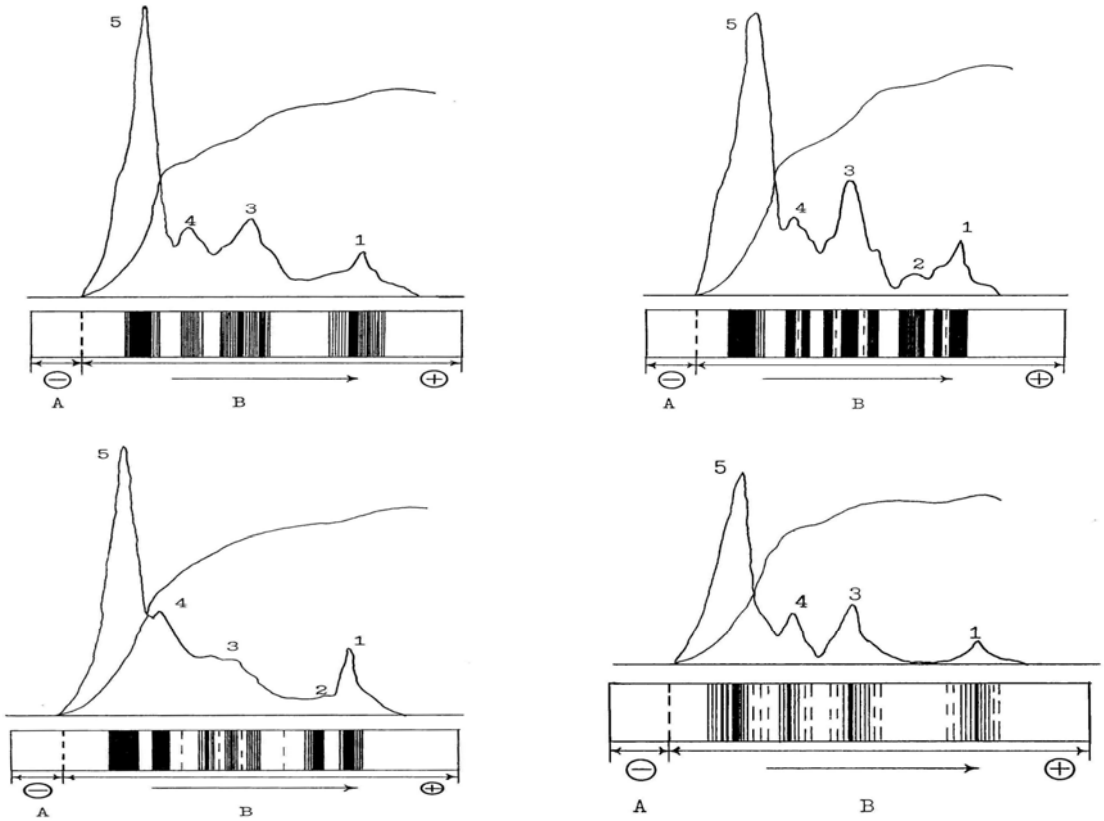

Рис. 1. Электрофореграммы МФ ГЛ-6-ФД микросообществ модельных гидроэкосистем по фазам развития. Слева направо: фаза адаптации, фаза лог-роста, стационарная фаза, фаза отмирания. А – концентрирующий гель; В – разделяющий гель; 1-5 – зоны активности

Небезынтересен факт выявления низкомолекулярных форм фермента в водной среде. Наибольшее их число и максимальная активность установлены в фазе лог-роста, затем с развитием экосистемы и переходом в стационарную фазу, активность снижается, также уменьшается и количество экзогенных МФ. Пока преждевременно утверждать истинные ли это экзогенные формы или результат автолиза клеток. Однако отсутствие в водной среде высокомолекулярной формы Гл-6-ФД-5 позволяет предположить первое. К тому же пик активности МФ ферментов приходится на фазу лог-роста, в которой клетки практически не подвергаются автолизу.

Одним из основных механизмов адаптации гидробионтов к действию стрессоров может быть избирательный синтез МФ ключевых ферментов метаболизма. Наши исследования полностью подтверждают указанный механизм. Моделирование залповых сбросов сточных вод НПЗ и их

компонентов приводило к частичному или полному блокированию пентозофосфатного цикла. Реанимация и аэробная стабилизация в течение 24-72 ч сопровождалась синтезом множества низкомолекулярных активных фракций фермента. Наиболее вероятной стрессовой ситуацией для гидроэкосистем является внезапное уменьшение концентрации кислорода в водной среде. Серия экспериментов по установлению изменения гетерогенности МФ Гл-6-ФД в условиях лимитирования экосистемы кислородом показала следующее (табл. 2).

Полученные данные однозначно указывают на увеличение гетерогенности МФ Гл-6-ФД микросообществ гидроэкосистем в условиях лимитирования кислородом, причем, увеличение числа МФ фермента достигается за счет низкомолекулярных форм. Отмечено некоторое снижение относительной активности Гл-6-ФД-4 и Гл-6-ФД-5 по сравнению с контролем при одновременном увеличении таковой у низкомолекулярных форм в первые 3-4 ч после прекращения аэрации. Такое изменение соотношения активности МФ фермента в целом не приводит к снижению эффективности пентозофосфатного цикла. Далее с уменьшением содержания кислорода в экосистеме активность МФ Гл-6-ФД уменьшается, заметны деструктивные процессы в составе зон фермента.

Таблица 2. МФ Гл-6-ФД по фазам развития в условиях лимитирования гидроэкосистемы кислородом

Фазы развития		Количество МФ в зонах активности				
		Гл-6-ФД-1	Гл-6-ФД-2	Гл-6-ФД-3	Гл-6-ФД-4	Гл-6-ФД-5
адаптация	контроль	1	-	2	1	1
	опыт	1	2	2	1	1
лог-рост	контроль	2	1	3	2	1
	опыт	2	2	3	2	1
стабилизация	контроль	1	1	3	1	1
	опыт	3	3	3	1	1

СДГ в фазе адаптации модельных гидроэкосистем представлена в составе шести МФ, основная активность фермента локализована в зонах СДГ-2 и СДГ-6. Переход экоситемы в фазу лог-роста сопровождается увеличением числа МФ до семи, также выявляется минорная МФ в области СДГ-6. С переходом в стационарную фазу активность минорной флормы становится незначительной и число МФ становится равным шести. Следует отметить значительные изменения в активности МФ с переходом в стационарную фазу – двухкратное увеличение активности в СДГ-2 и уменьшение таковой в зоне СДГ-6 более чем в 2,5 раза. В стационарной фазе и фазе заката экосистемы активность СДГ-6 достигала уровня активности в фазе адаптации и лог-роста.

Установлены резкие изменения в активности низкомолекулярных форм фермента к завершению стационарной фазы: десятикратная инактивация СДГ-2 и увеличение активности в зонах СДГ-3 и СДГ-4 в 2-3,5 раза. В фазе отмирания вся активность локализуется в области СДГ-3 и СДГ-4 – относительная активность составляет 26,76 и 65,69% соответственно; а число МФ уменьшается до пяти (табл. 3).

Таблица 3. Состав и активность МФ СДГ модельных гидроэкосистем по фазам развития

Адаптация			Лог-рост			Стационарная			Отмирание		
МФ	ОЭП	ОА,%	МФ	ОЭП	ОА,%	МФ	ОЭП	ОА,%	МФ	ОЭП	ОА,%
1	0,95	6,26	1	0,96	7,80	1	0,96	8,08	1	0,98	1,67
2	0,93	26,35	2	0,92	38,87	2	0,89	3,10	2	0,93	2,68
3	0,62	6,03	3	0,61	9,22	3	0,60	10,64	3	0,59	26,76
4	0,51	5,52	4	0,48	5,47	4	0,47	14,85	4	0,36	65,69
5	0,38	8,59	5	0,36	5,95	5	0,41	7,16	5	-	-
6	0,22	47,25	6	0,21	31,18	6	0,26	58,85	6	-	-
7	-		7	0,10	1,52	7	-		7	0,12	3,21

Примечание: ОЭП – относительная электрофоретическая подвижность; ОА – относительная активность

Полученные данные подтверждают наличие цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и электронтранспортной цепи (ЭТЦ) в микросообществах активного ила модельных гидроэкосистем, интенсивность которых возрастает по мере развития последних. Изоферментный профиль, изменение гетерогенности и активности МФ позволяют предположить наличие тонких механизмов регуляции данных обменных циклов. Максимальная гетерогенность СДГ установлена в фазе лог-роста и на переходе в стационарную фазу, что может быть объяснено нарастанием разнообразия метаболитов в этих фазах, достижением гомеостаза и подготовкой экосистемы к стабилизации.

В водной среде моделей экосистем фермент не обнаружен в фазах адаптации и лог-роста, в стационарной фазе выявлены зоны активности в области СДГ-2 и СДГ-3. В фазе отмирания выявлена одна зона активности в СДГ-2. Выявление в водной среде МФ СДГ может быть объяснено или автолизом клеток микросообщества экосистемы или транспортом низкомолекулярных форм фермента через клеточную стенку.

Отсутствие высокомолекулярных форм СДГ в водной среде на всех фазах развития позволяет предположить второе.

В сериях экспериментов по моделированию залповых сбросов сточных вод нефтеперерабатывающего производства, а также солей свинца полностью подтвердили механизм адаптации микросообществ гидроэкосистем – синтез стрессзависимых белков. Моделирование залповых сбросов сточных вод приводило к частичному или полному блокированию ЦТК и ЭТЦ. Реанимация и аэробная стабилизация гидроэкосистем в течение 24-72 ч сопровождалась синтезом множества низкомолекулярных форм СДГ. Моделирование залпового сброса сточных вод, содержащих свинца ацетат в концентрации 3-5 мг/г биомассы приводило к блокированию ЦТК. Реанимация и аэробная стабилизация гидроэкосистемы в течение 48 ч сопровождалось синтезом множества МФ СДГ, однако исходная эффективность ЦТК не была восстановлена. Действие фенола в концентрации 20 мг/г биомассы приводило почти к 2-х-кратной активации фермента. Установленный факт может объясняться дегидрированием фенола в аэробных условиях и образованием п-бензохинона, являющегося акцептором электронов в реакции окисления сукцината. Лимитирование экосистем кислородом приводило к частичной деструкции фракций фермента, значительному снижению активности высокомолекулярных форм СДГ и в целом к снижению эффективности ЦТК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Руднева, И.И.* Антропогенное изменение белкового состава у морских организмов// Доклады АН СССР. – 1983. – 271, № 2. – С. 502-505.
2. *Кудрявцева, Г.В.* Эколого-физиологические особенности и роль пентозофосфатного пути обмена углеводов в адаптациях гидробионтов. – Дисс. на соиск. уч. степ. д. биол. н. // Ленинград. – 1989. – 385 с.
3. *Белобров, П.И.* Изучение взаимодействия ферментов в системе: гексокиназа-глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа-оксиредуктаза-люцифераза / *П.И. Белобров, В.А. Воеводин, В.А. Кратасюк* // Люминесцентный анализ в медико-биологических исследованиях. – Рига, 1986. – С. 72-77.
4. *Загурский, А.А.* Механизм постсинтетической модификации глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках человека, культивируемых in vitro. // Биохимия. – 1983. – 48, №12. – С. 1970-1976.
5. *Anderson, A.Y.* Regulation of glucose-6-phosphatedehydrogenase in Zymomonas mobilis CP 4 / *A.Y. Anderson, E.A. Dawes* // FEMS Microbiol. Lett. – 2005. – 27, № 1. – p. 23-27.
6. *Шаталаев, И.Ф.* Молекулярные формы малатдегидрогеназы активного ила в процессе очистки сточных вод на городских станциях аэрации. / *И.Ф. Шаталаев, М.М. Телитченко* // Химия и технология воды. – 1992. – Т. 14, №9. – С. 132-138.

PROTEIN FRACTIONAL COMPOSITION AND SOME DEHYDROGENASE MOLECULAR FORMS IN MICROASSOCIATIONS OF MODEL HYDROECOSYSTEMS

© 2009 A.I. Agapov, N.I. Shatalaev, A.V. Voronin, I.F. Shatalaev
Samara State Medical University
Article is received 2009/09/20

Researches data of protein fractional composition, activity of glucose-6-phosphatedehydrogenase and succinatdehydrogenase molecular forms in microassociations of model hydroecosystems on phases of development are cited and at action of some toxicants. The opportunity of application of the received results for biomonitoring hydroecosystems is shown.

Key words: *microcommunities, biomonitoring of hydroecosystems, toxicants*

Albert Agapov, Doctor of Biology, Professor at the Department of Common, Biononorganic and Bioorganic Chemistry
Nikita Shatalaev, Graduate Student. E-mail: cyric@proezd.net
Alexander Voronin, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Chemistry Department. E-mail: dimmu2000@mail.ru
Ivan Shatalaev, Doctor of Biology, Professor, Head of the Chemistry Department