

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ АКТИВНОГО ИЛА В ПРОЦЕССЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

© 2011 Н.И. Шаталаев, А.В. Воронин

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 18.05.2011

В работе представлены данные о структурной организации и динамики активности молекулярных форм глутаматдегидрогеназы активных илов сооружений биологической очистки сточных вод нефтеперерабатывающего завода (НПЗ) и городской станции аэрации. Показаны изменения в относительной активности молекулярных форм фермента в условиях залповых сбросов сточных вод и их компонентов и структурные особенности фермента при реанимации и аэробной стабилизации активных илов.

Ключевые слова: *активный ил, биологическая очистка сточных вод*

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.

В ранних обзорных работах было показано, что ГДГ активностью обладает ассоциированная форма с молекулярной массой 1000 кД, состоящая из 4 мономеров. Однако при понижении концентрации ферментного белка с 10 мг/мл до 2 мг/мл была обнаружена каталитически активная форма ГДГ с молекулярной массой 250 кД. Электронная микроскопия позволила определить строение молекулы ГДГ – это тетраэдр, грани которого составлены 6 мономерами с

молекулярной массой 40 кД [1]. В последних работах по исследованию ГДГ показано, что фермент в ряду концентраций от 100 до 1 мг/мл образует набор МФ от унимера (гексапептида) до субунимера (трипептида) с сохранением каталитической активности на 80%. Здесь же показано, что ГДГ является аллостерическим ферментом, эффекторами определены цитидинтрифосфат и уридинтрифосфат. Далее в структуре ГДГ обнаружено наличие остатка фосфорной кислоты [2]. Авторы в экспериментах с меченым фосфором в АТФ установили активное включение метки в фермент с одновременным увеличением активности ГДГ, на основании чего сделан вывод о регуляции активности фермента ее фосфорилированной и дефосфорилированной формами. На электрофореграммах ГДГ обнаруживается в составе основной фракции с молекулярной массой 300 кД и минорных форм около 230 кД. В табл. 1 представлены данные структурной организации ГДГ бактерий. Из приведенных литературных данных видно, что ГДГ микроорганизмов представляют собой преимущественно гексамеры, состоящие, как правило, из идентичных субъединиц, причем некоторые авторы указывают на одинаковую структурную организацию ГДГ низших и высших организмов [3]. Установлено, что синтез ГДГ многих микроорганизмов подвергается катаболитной репрессии 2-оксоглутаратом и индуцируется глутаматом, на основании чего сделано заключение о катаболитной индукции ГДГ.

Оптимум pH для реакции восстановительного аминирования бактериальных ГДГ находится в интервале 8,0-8,5, а окислительного дезаминирования 8,5-9,5. В качестве нуклеотидных кофакторов бактериальные ГДГ используют NAD и NADH для прямой и обратной реакций. Ферменты активны с NADP и NADPH, но скорость реакции при этом на порядок ниже. Установлена инактивация NAD-зависимых ГДГ дрожжей в результате фосфорилирования фермента,

Шаталаев Никита Иванович, аспирант. E-mail: shatalaev@list.ru
Воронин Александр Васильевич, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры химии фармацевтического факультета

дефосфорилированная форма обладает высокой удельной активностью. Основная физиологическая роль NAD-зависимой ГДГ микроорганизмов по мно-гим данным катаболическая, тем не менее, у неко-рых синезеленых бактерий обнаружен предпочтительный катализ реакции восстановления аминирования 2-оксоглутарата до глутаминовой кислоты, в связи с чем обсуждается роль NAD-зависимой ГДГ в ассимиляции аммонийного азота. У анаэробных бактерий выделены 2 изоформы ГДГ, одна из которых активна при низких значениях концентрации аммония, а другая – при высоких. Изоформы мало чем отличались по физико-химическим свойствам и

структурной организации, единственным отличием является разные ИЭТ (4,46 и 4,52) и незначительные различия значений Км для NAD, NADH и NADP. Эти данные указывают на существование конформационных изомеров ГДГ, отличающихся (да и то незначительно) только величиной заряда. NAD- и NADP-зависимые ГДГ обнаружены как в цитоплазме, так и в митохондриях и мембранах клеток высших и низших организмов [4]. В последних работах получены убедительные доказательства того, что основная активность ГДГ (65-80%) ассоциирована с цитоплазматической мембраной и тилакоидными мембранами.

Таблица 1. Структурная организация ГДГ бактерий

Вид, род	Молекулярная масса фермента, кД	Количество субъединиц	Молекулярная масса субъединиц, кД
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	240,0	6	40,0
<i>Clostridium symbiosum</i>	282,0	6	49,0
<i>Bacteroides fragilis</i>	290,0	6	49,0
<i>Sulfolobus solfotarius</i>	270,0	6	44,0
<i>Sulfolobus solfotarius</i>	135,0	3	44,0
<i>Sulfolobus solfotarius</i>	90,0	2	44,0
<i>Peptostreptococcus asaecharolyticus</i>	266,0	6	49,0
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	208,0	4	52,0
<i>Candida utilis</i>	460,0	4	116,0
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	245,5	6	40,0
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	295,0	6	48,5
<i>Proteus inconstans</i>	400,0	-	40,0
Пекарские дрожжи	300,0	6	50,0
<i>Clostridium symbiosum</i>	294,0	6	49,0
<i>Brevibacterium flavum</i>	300,0	6	50,0

Представленный литературный материал еще раз свидетельствует об исключительной важности информации о составе и динамике активности ГДГ и ее МФ в процессе жизнедеятельности отдельных видов, популяций и сообществ микроорганизмов. Эта информация может быть использована в качестве интегрального критерия оценки функционального состояния экосистем, а также для мониторинга и управления последними. В пользу сказанного свидетельствуют работы, доказывающие доминирующее значение ГДГ при ассимиляции фосфора и азота – основных элементов-биогенов – из водной среды модельных гидроекосистем. Установлена еще одна из физиологических функций ГДГ, состоящая в обеспечении адаптационного синтеза глутамата, необходимого для поддержания жизнедеятельности при росте в условиях высокой солености. ГДГ – один из ферментов, ингибируемых незначительными концентрациями ионов тяжелых металлов (цинк, кадмий, ртуть). Это может быть также использовано в биотестировании токсичности промышленных загрязнений.

Цель работы: провести исследования гетерогенности и динамики активности МФ ГДГ ила действующих сооружений биологической очистки сточных вод НПЗ, городской станции аэрации, а также структурных изменений МФ

ГДГ ила при имитации залповых сбросов сточных вод и их компонентов, в процессе реанимации и аэробной стабилизации после залповых сбросов.

Материал и методы исследования. В работе использовали активный ил сооружений биологической очистки сточных вод НПЗ и городской станции аэрации. Получение ферментных образцов, электрофорез, выявление МФ ГДГ, сканирование и определение относительной активности фермента проводили по известной методике [5]. В состав инкубационной среды для выявления МФ ГДГ входили: водные растворы NAD 1 мг/мл – 40мл, нитросиний тетразолиевый 1 мг/мл – 30 мл, феназинметасульфат 1 мг/мл – 2 мл, 1М раствор L-глутамата натрия pH 7,0 – 5 мл, 0,1М фосфатный буферный раствор pH 7,0 – до 100 мл. Инкубацию проводили 3 ч при температуре 37°C. В местах локализации МФ фермента развивается темно-синее окрашивание.

Результаты и их обсуждение. В таблице представлены данные о структурной организации и динамике относительной активности МФ ГДГ активного ила сооружений биологической очистки сточных вод НПЗ в 2 ступени очистки в реально действующих условиях.

Таблица 2. Относительная активность МФ ГДГ ила сооружений биологической очистки сточных вод НПЗ

МФ ГДГ	Относительная активность, изменение в %					
	первая ступень				вторая ступень	
	вход	центр	выход	вторичный отстойник	центр	вторичный отстойник
ГДГ-1	10,0	8,5	8,5	6,0	9,5	3,5
ГДГ-2	16,5	26,5	36,5	8,0	34,5	7,5
ГДГ-3	15,0	19,5	21,0	10,5	23,0	12,5
ГДГ-4	14,0	16,5	14,0	20,5	22,5	28,0
ГДГ-5	44,5	29,5	20,0	55,0	10,5	48,5

На обеих ступенях очистки сточных вод ГДГ ила выявляется в составе 5 МФ, незначительно отличающихся по относительной электрофоретической подвижности. На входе в первую ступень основная активность локализуется в области ГДГ-5, относительная активность минорных форм варьирует от 10 до 16,5%. К центру аэротенка отмечается падение активности ГДГ-5 при одновременном увеличении таковой у ГДГ-2, ГДГ-3 и незначительно у ГДГ-4. К выходу из аэротенка первой ступени очистки активность ГДГ-5 продолжает снижаться и становится более чем в 2 раза ниже таковой у входа в аэротенк, а основная активность фермента концентрируется в области ГДГ-2 и ГДГ-3. Совершенно противоположное аэротенку распределение соотношения активности МФ ГДГ во вторичном отстойнике первой ступени очистки: почти трехкратная активация ГДГ-5 по сравнению с выходом из аэротенка, увеличение активности ГДГ-4 и снижение таковой в 2-3 раза у ГДГ-1, ГДГ-2 и ГДГ-3. В центре аэротенка второй ступени очистки основная активность фермента локализуется в зонах ГДГ-2, ГДГ-3 и ГДГ-4, активность ГДГ-5 более чем в 5 раз ниже таковой вторичного отстойника первой ступени и почти в 5 раз ниже активности ГДГ-5 вторичного отстойника второй ступени очистки. Наблюдали следующую динамику общей активности фермента в процессе очистки сточных вод: максимум активности фермента установлен во вторичных отстойниках, некоторое снижение таковой на входе в аэротенки, еще ниже в центре аэротенков и двукратное ингибирование по сравнению с вторичными отстойниками на выходе из аэротенков.

ГДГ – фермент анаэробно-аэробного метаболизма, вероятно поэтому отмечается

высокая активность фермента в отстойниках и на входе в аэротенки, где при регенерации и подаче активного ила в головную часть кислород лимитирован. По мере прохождения биомассы ила в аэрируемый участок аэротенка активность ГДГ снижается. Это одновременно сопровождается значительной перестройкой в соотношении активности основной и минорных форм фермента. Не исключена возможность неконкурентного ингибирования ГДГ ила в центре аэротенка и на выходе из него аденилатами, поскольку основной этап изъятия загрязнителей и их окисление, а соответственно и быстрое улавливание энергии в форме ГТФ и АТФ, происходит именно на этих участках сооружений биологической очистки. Ингибирование ГДГ-5 и увеличение относительной активности минорных форм фермента подтверждает предположения о преобладании реакции окислительного дезаминирования над восстановительным аминированием 2-оксоглутарата в центре аэротенка и на выходе из него. Во вторичных отстойниках преобладает реакция окислительного дезаминирования глутамата и обеспечение клеток ила энергией NADH, что подтверждается активацией основной формы фермента – ГДГ-5. Положительным модулятором ГДГ, по всей вероятности, является ГДФ. Данные о структурной организации и динамике относительной активности МФ ГДГ активного ила городской станции аэрации в процессе очистки сточных вод представлены в табл. 3. Эта серия экспериментов полностью подтверждает явление снижения активности ГДГ-5 по мере прохождения биомассы ила от регенератора к выходу из аэротенка и, соответственно, активации минорных форм фермента, особенно ГДГ-3, ГДГ-2 и ГДГ-1.

Таблица 3. Относительная активность МФ ГДГ ила в процессе очистки сточных вод на ГСА

МФ ГДГ	Относительная активность, изменение в %				
	регенератор	1-ая секция	2-ая секция	3-ая секция	выход из аэротенка
ГДГ-1	5,0	10,5	12,0	12,5	10,0
ГДГ-2	8,5	15,5	19,5	17,0	17,5
ГДГ-3	12,0	17,5	21,0	20,0	24,5
ГДГ-4	19,0	14,5	14,0	16,5	18,0
ГДГ-5	55,5	42,0	33,5	34,0	30,0

Результаты моделирования залповых сбросов некоторых компонентов сточных вод НПЗ представлены на рис. 1. СМС «Прогресс» в концентрации 145-150 мг/г ила практически полностью блокировал фермент, причем отмечены деструктивные явления в составе МФ, что подтверждается усилением фонового окрашивания фореграмм и некоторым изменением электрофоретической подвижности фракций. Действие алкилфенолята натрия в концентрации до 150 мг/г ила сопровождалось ингибированием активности ГДГ-5 на 70-75% от исходной, также установлено уменьшение активности минорных форм до 50% по сравнению с контролем. Залповый сброс модельной сточной воды, содержащей свинца нитрата до 19 мг/г ила приводил к полному блокированию фермента и, как следствие, остановке всех процессов метаболизма, функционально связанных с этим ключевым ферментом. Орто-крезол в концентрации до 120 мг/г ила ингибировал МФ ГДГ на 40-60% от контроля. Моделирование залповых сбросов сточных вод производства алкилсалицилатных присадок в соотношении 1:20 (сточная вода: иловая смесь) приводило к инактивации ГДГ-5 на 80-90% и минорных форм на 60-75%. Залповый сброс общезаводских сточных вод, содержащих 120-140 мг/г ила аммонийного азота, полностью блокировал ГДГ-5 и ингибировал минорные формы на 80-90% от контроля. Следует обратить особое внимание на последнее, поскольку здесь имеет место субстратное ингибирование, которое указывает на большую чувствительность к такому основному формам фермента – ГДГ-5.

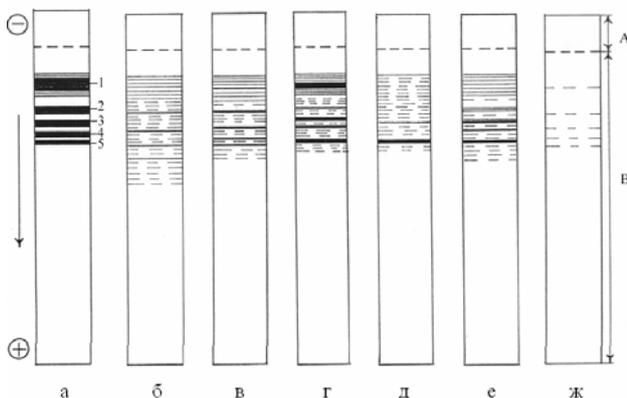


Рис. 1. Спектры МФ ГДГ активного ила в контроле (а), при действии СМС «Прогресс» (б), алкилфенолята натрия (в), о-крезола (г), общезаводских сточных вод (д), сточных вод производства алкилсалицилатных присадок (е) и свинца нитрата (ж)

Аэробная стабилизация активного ила, подвергшегося действию залпового сброса общезаводских сточных вод с содержанием аммонийного азота до 140 мг/г ила, привела к следующим результатам: стабилизация в течение 48 часов сопровождалась индукцией и выявлением в низкомолекулярной области фореграмм 6 зон с выраженной ГДГ активностью. Кроме того, в

области между ГДГ-4 и ГДГ-5 выявлено 3 дополнительных зоны активности, что отражено на рис. 2.

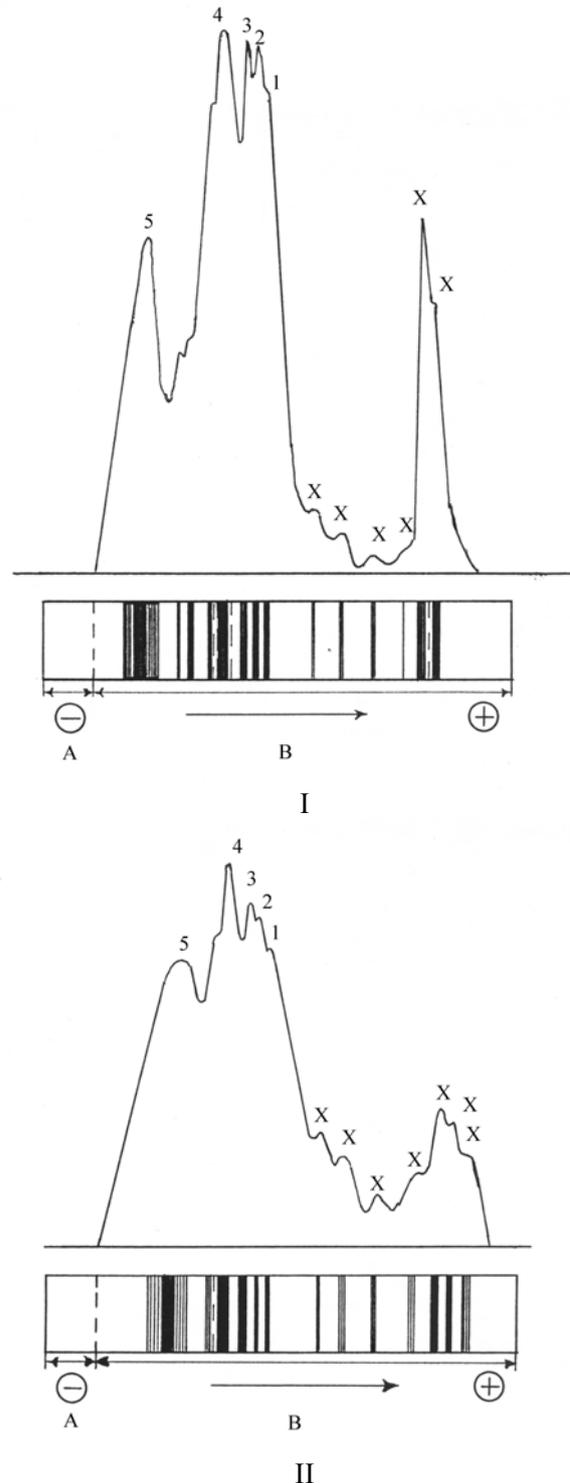


Рис. 2. Спектры МФ ГДГ активного ила при аэробной стабилизации в течение 48 (I) и 72 (II) часов после залпового сброса общезаводских сточных вод. X – низкомолекулярные формы фермента

Необходимо отметить, что стабилизация подвергшегося стрессу ила уже в первые 20-30 часов привела к практически полной реактивации всех МФ фермента. Дальнейшая

аэробная стабилизация сопровождалась увеличением числа индуцированных низкомолекулярных форм фермента до 7 (рис. 2) и восстановлением структурной организации фермента до исходной – ГДГ выявляется в составе основной формы ГДГ-5 и 4 минорных форм.

Интересны, на наш взгляд, результаты серий экспериментов по исследованию активности МФ ГДГ в моделях экосистемы активного ила в условиях лимитирования кислородом. Полученные данные указывают на то, что лимитирование кислородом приводит к перераспределению соотношения активности МФ ГДГ ила: отмечена активация ГДГ-5 при одновременном понижении таковой у минорных форм фермента. Необходимо отметить факт увеличения общей активности фермента в условиях относительного анаэробнозиса на 30-50% от контроля.

Выводы:

1. Структурная организация ГДГ активного ила, динамика активности МФ фермента в процессе биологической очистки промышленных сточных вод и сточных вод городской канализации свидетельствуют о существовании тонких механизмов регуляции аминокислотного и белкового обменов в клетках активного ила на уровне субстратов и энергетического статуса.

2. На действующих сооружениях биологической очистки установлено явное предпочтение реакции окислительного дезаминирования глутамата во вторичных отстойниках и в головных отсеках аэротенков. Переход биомассы ила в аэрируемые участки сооружений биологической очистки сопровождается изменением соотношения активности МФ ГДГ в пользу восстановительного аминирования 2-оксоглутарата. Это может быть объяснено изъятием загрязнителей, их окислением и улавливанием энергии в форме аденилатов, которые в свою очередь являются отрицательными эффекторами реакции окислительного дезаминирования глутамата.

3. Динамика изменения соотношения активности МФ ГДГ в моделях и на действующих сооружениях биологической очистки находится в зависимости от гидрохимического режима, в частности, от степени относительного аэробнозиса и анаэробнозиса в гидроэкосистеме. Установлено предпочтение реакции окислительного дезаминирования

глутамата в условиях относительного анаэробнозиса и, наоборот, преобладание реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата при избытке кислорода. Предпочтение реакции окислительного дезаминирования глутамата при относительном анаэробнозисе подтверждено в сериях экспериментов развития гидроэкосистем в условиях, лимитированных содержанием кислорода.

4. Залповые сбросы высокотоксичных сточных вод в зависимости от их концентрации приводят к полному или частичному блокированию фермента. Реанимация и аэробная стабилизация подвергнутого стрессу активного ила сопровождается индукцией и выявлением низкомолекулярных форм ГДГ, а также образованием модифицированных высокомолекулярных форм фермента. Реактивация МФ ГДГ происходила через 20-30 ч стабилизации, а восстановление исходной структурной организации фермента через 48-72 ч.

5. Данные состава и соотношения активности МФ ГДГ в процессе биологической очистки сточных вод в нормальном технологическом режиме и при действии мощных антропогенных факторов могут быть использованы для оценки функционального состояния активных илов и организации мониторинга последних.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Поляновский, О.Л. Четвертичная структура ферментов // Успехи биологической химии. 1967. №8. С. 34-60.
2. Оганесян, А.С. К механизму регуляции активности глутаматдегидрогеназы / А.С. Оганесян, Ж.С. Геворкян, М.А. Бабаян // Биологический журнал Армении. 1989. № 2. С. 156-158.
3. Rice, David W. Crystallization of an NAD – dependent glutamate dehydrogenase from *Clostridium symbiosum*. J. Mol. Biol. 1985. №1. p. 147-149.
4. Софьин, А.В. Молекулярные формы глутаматдегидрогеназы и глутаматсинтазы симбиотической азотфиксирующей ассоциации *Azolla-Anabaena* / А.В. Софьин, Т.Г. Диденко // Биохимия. 1990. №4. С. 634-644.
5. 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. 713-717.

MOLECULAR FORMS OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE IN ACTIVE SILT DURING BIOLOGICAL SEWAGE TREATMENT

© 2001 N.I. Shatalaev, A.V. Voronin
Samara State Medical University

Mentioned below is a treatises data of structural organization and activities of molecular forms of glutamate dehydrogenase in active silt of oil refinery and aeration station sewage treatment facilities. The changes in activities of enzyme molecular forms during volley of sewage and sewage components are shown, including structural features of enzyme in reanimation and aerobic stabilization phases of active silt.

Nikita Shatalaev, Post-graduate Student. E-mail: shatalaev@list.ru
Alexander Voronin, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Chemistry Department of Pharmaceutical Faculty