

УДК 577.158:628.336.356

**П.А. Тупин, Д.Г. Чухчин, Е.В. Новожилов, О.М. Соколов**

Архангельский государственный технический университет

Тупин Павел Алексеевич родился в 1984 г., окончил в 2005 г. Архангельский государственный технический университет, аспирант кафедры биотехнологии, инженер отделения гемодиализа ФГУЗ ЦМСЧ № 58 ФМБА. Имеет 2 печатные работы в области биотехнологии в ЦБП, радиоэлектроники и программирования.  
E-mail: tra@atnet.ru



Чухчин Дмитрий Германович родился в 1971 г., окончил в 1993 г. Архангельский лесотехнический институт, кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии Архангельского государственного технического университета. Имеет более 80 печатных работ в области химической переработки древесины.  
E-mail: dimatsch@mail.ru



Новожилов Евгений Всеволодович родился в 1950 г., окончил в 1972 г. Архангельский лесотехнический институт, доктор технических наук, профессор кафедры биотехнологии Архангельского государственного технического университета, чл.-корреспондент РАЕН, лауреат премии им. М.В. Ломоносова. Имеет около 150 научных трудов в области технологии комплексной переработки сульфитных и сульфатных щелоков, ферментных технологий в химической переработке древесины, технологий очистки сточных вод.  
E-mail: biotech@agtu.ru



### **РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА ОЦЕНКИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ АКТИВНОГО ИЛА\***

Предложена усовершенствованная методика определения дегидрогеназной активности ферментов активного ила на специально созданной автоматизированной лабораторной установке.

*Ключевые слова:* автоматический контроль, активный ил, дегидрогеназы, микроорганизмы, окислительная активность.

Способность микроорганизмов разрушать органические загрязнения воды определяется концентрацией и активностью их ферментов. Известно шесть очень важных для очистки воды классов ферментов: оксиредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы. Основная роль принадлежит оксиредуктазам, осуществляющим первые этапы разрушения сложных соединений сточных вод (продуктов деструкции лигнина и углеводов) до более простых веществ, которые затем подвергаются разложению с помощью других ферментов.

Из оксиредуктаз наиболее распространены дегидрогеназы.

---

\*Работа выполнена по заданию Федерального агентства по образованию на проведение научных исследований по тематическому плану НИР АГТУ №1.3.06.4.

Например, для фенольных веществ такими ферментами являются лакказы. Под их воздействием происходит окисление субстрата (загрязнения), которое обязательно сопровождается восстановлением какого-либо соединения, т. е. реакция относится к окислительно-восстановительным [3].

Известная методика определения дегидрогеназной активности микроорганизмов основана на следующем: трифенилтетразолийхлорид (ТТХ), бесцветный в растворе, под воздействием дегидрогеназ бактериальных клеток превращается в нерастворимый в воде трифенилформазан красного цвета. Чем интенсивнее красный цвет исследуемой пробы, тем выше деструкция загрязнений в сточной воде и эффективнее очистка [2]. Дегидрогеназную активность выражают в миллиграммах восстановленного трифенилформазана на 1 г сухого или беззольного вещества ила (удельная активность) или на 1 л иловой смеси (общая активность).

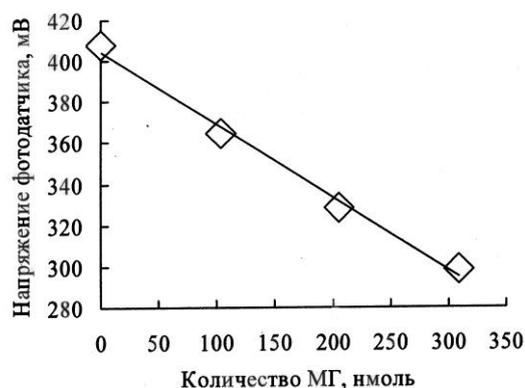
Эта методика имеет существенные недостатки: многостадийность, длительность и трудоемкость. Она включает применение нескольких реагентов, добавляемых на разных этапах процесса, три стадии центрифугирования, выдерживание около 1 ч в термостате и 20...30 мин перед фотометрированием.

Условия выполнения анализа не позволяют обеспечить высокую воспроизводимость результатов. В случае нелинейности процесса одно и то же количество ТТХ может быть восстановлено с помощью разного количества фермента. Концентрация индуцибельных дегидрогеназ в живой клетке может существенно изменяться за довольно короткое время (10...15 мин) [4]. С одной стороны, возможно увеличение количества дегидрогеназ за счет транскрипции и трансляции соответствующих генов, а с другой стороны, содержание дегидрогеназ может уменьшаться за счет действия протеаз. Из-за большой длительности определения эта методика не может быть использована для проведения экспрессных анализов.

Задачей данного исследования является разработка методики определения дегидрогеназной активности ила, в которой устранены недостатки существующей методики. Она основана на измерении скорости восстановления метиленового голубого (МГ) при окислительно-восстановительной реакции, катализируемой ферментами.

МГ, выбранный в качестве акцептора водорода, имеет высокую оптическую плотность при окислении и практически бесцветен в восстановленном состоянии, хорошо растворим в воде, свободно проникает в клетки микроорганизмов и удаляется из них, малотоксичен. Кроме того, если измерения проводить при длине волны 660 нм (максимум поглощения МГ), то снижается влияние дифракции на оптическую плотность отдельных микроорганизмов и фрагментов примесей.

Анализ проводят в специально изготовленной ячейке, устройство которой позволяет измерять температуру и оптическую плотность пробы, производить



перемешивание, избегая попадания кислорода в ячейку. Блок определения оптической плотности устроен так, что светодиод и фотодатчик смонтированы в одной трубке и разделены непрозрачной перегородкой, чтобы свет от светодиода попадал на фотодатчик, отразившись от латунной сетки. Сетка предназначена не только для отражения света, но и для предотвращения попадания крупных иловых частиц в область измерения оптической плотности. Для термостатирования ячейки использовали элемент Пельтье с воздушным теплоотводом, который, в зависимости от полярности питающего напряжения, может работать и как нагреватель, и как холодильник.

Для калибровки ячейки строили график зависимости показаний фотодатчика от количества МГ, аппроксимировали по линейной зависимости и рассчитывали тангенс угла наклона касательной к оси абсцисс (рис. 1), значение которого использовали для определения активности ила.

Для анализов отбирали активный ил из аэротенков второй ступени станции биологической очистки сточных вод Архангельского ЦБК. Реакционную смесь готовили в стакане на 100 мл, куда вносили 60 мл дистиллированной воды, определенное количество суспензии ила (1...2 мл) и 1 мл 10 %-го раствора глюкозы. В стакан опускали измерительную ячейку таким образом, чтобы внутри ограничивающей сетки отсутствовал воздух. Доводили объем воды в стакане до метки и после этого включали светодиод и мешалку. Помещали стакан в термостат и устанавливали требуемую температуру. После термостабилизации ячейки и стабилизации показаний фотодатчика (рис. 2, зона I) с помощью дозатора вводили 50 мкл 0,2 %-го раствора МГ. При этом показания прибора резко снижались, а затем за счет сорбции на поверхности зооглея активного ила немного повышались (рис. 2, зона II). При избытке субстрата и акцептора водорода реакция характеризуется линейной зависимостью и определяется только концентрацией и активностью дегидрогеназ (рис. 2, зона III). Как правило, исследовали кинетику реакции в течение 300 с, пока процесс не становился нелинейным (рис. 2, зона IV).

По полученным в зоне III данным определяли тангенс угла наклона прямой линии, по которому рассчитывали активность ферментов

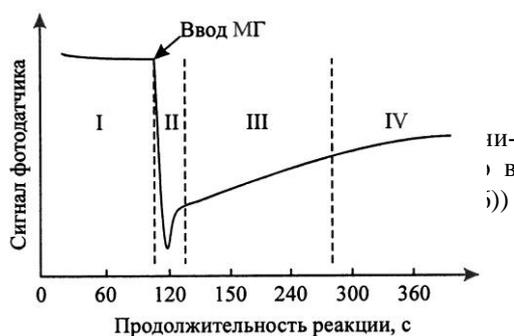
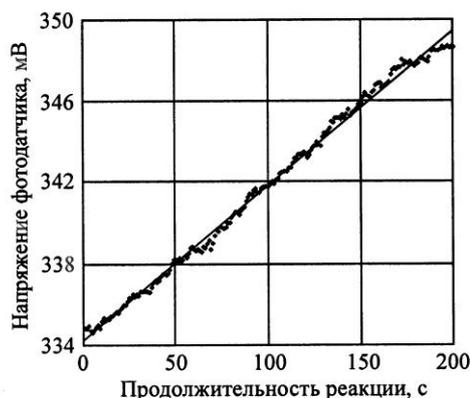


Рис. 2. Динамика изменения показаний прибора во времени при добавлении МГ к суспензии активного ила



иловой жидкости (нмоль/мин·мл). Пример приведен на рис. 3.

Активность дегидрогеназ значительно изменяется при хранении суспензии ила. По этой причине трудно добиться воспроизводимости экспериментов при использовании ила из одной и той же пробы в течение продолжительного времени (рис. 4, а).

Одним из объяснений возрастания активности фермента является продолжение генной экспрессии дегидрогеназных оперонов при наличии остатка необходимого субстрата. По мере расходования субстрата гены, отвечающие за кодирование синтеза дегидрогеназ, блокируются, и концентрация ферментов снижается.

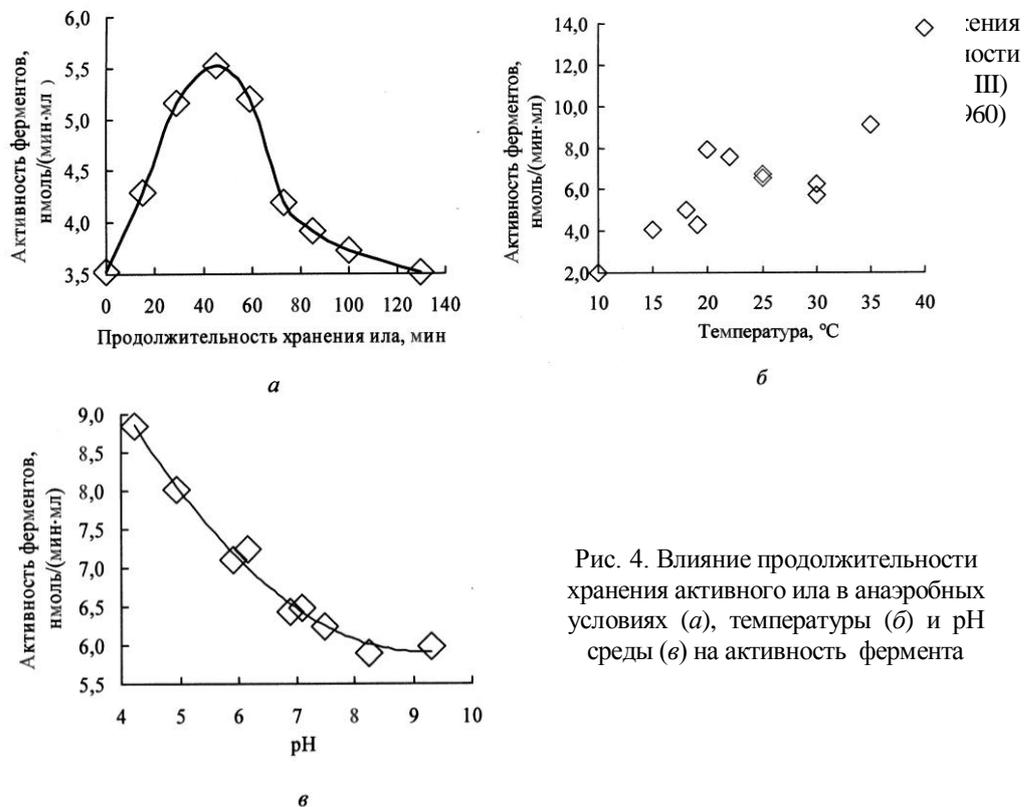


Рис. 4. Влияние продолжительности хранения активного ила в анаэробных условиях (а), температуры (б) и рН среды (в) на активность фермента

При использовании однотипно отобранных проб ила относительная ошибка для параллельных определений активности составила 3,8 %.

Наиболее важными факторами, влияющими на развитие и жизнеспособность активного ила, а также качество биологической очистки, являются температура, наличие питательных веществ, содержание растворенного кислорода в иловой смеси, значение рН и присутствие токсинов [1].

Зависимость дегидрогеназной активности ила от температуры определяли в интервале от 10 до 40 °С (рис. 4, б). Установлено, что скорость

химической реакции закономерно возрастает с ростом температуры. В связи с тем, что катализатором является фермент, наблюдается некоторый максимум активности около 20 °С.

Как видно из рис. 4, в, для дегидрогеназ ила активность снижается при  $\text{pH} > 7$ .

Зависимость дегидрогеназной активности от наличия токсичных веществ иллюстрируют следующие примеры. Фенол концентрацией 0,2 % и формалин концентрацией 0,13 % не влияют на активность дегидрогеназ. Под действием додецилсульфата натрия концентрацией 0,05 % активность фермента становится нулевой. Все приведенные вещества в используемых концентрациях летальны для микроорганизмов.

Для определения места локализации дегидрогеназ были отделены на центрифуге микроорганизмы ила от надыловой жидкости. Выявлено, что ферменты локализованы внутри клеток ила, так как в фугате дегидрогеназная активность не обнаружена, а активности осадка и исходной иловой суспензии совпадают.

Метод определения активности дегидрогеназ является экспрессным и наряду с контролем остальных показателей качества очистки загрязненных вод позволяет быстро реагировать на нарушение биохимических процессов ассоциатов микроорганизмов и принимать меры для нормализации процесса.

С помощью данного метода можно определить ряд параметров (температура, pH), при которых активность ферментов активного ила наибольшая, что делает очистку сточных вод эффективнее. Также можно определить влияние различных токсичных веществ на активность дегидрогеназ и в режиме экспресс-анализа обнаружить живые активно функционирующие микроорганизмы в мутных и сильно загрязненных производственных средах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жмур, Н.С. Управление процессом и контроль результата очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками [Текст] / Н.С. Жмур. – М.: Луч, 1997. – 172 с.
2. Методические рекомендации по определению дегидрогеназной активности при технологическом контроле за работой аэротенков [Текст]. – Москва: Минво жилищно-коммунального хоз-ва РСФСР, Академия коммунального хоз-ва им. К.Д. Памфилова, 1978.
3. О применении экспресс-метода для контроля работы биологических очистных сооружений [Электронный ресурс]: тез. докл. – 2003. – Режим доступа: [http://www.energo-resurs.ru/eg\\_tezis\\_2003\\_13.htm](http://www.energo-resurs.ru/eg_tezis_2003_13.htm).
4. Шлегель, Г. Общая микробиология [Текст]: учеб. для вузов [пер. с нем.] / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 567 с.

Поступила 22.06.09

---

*P.A. Tupin, D.G. Chukhchin, A.V. Novozhilov, O.M. Sokolov*  
Arkhangelsk State Technical University

**Development of New Assessment Method for Enzymatic Oxidative Capacity of Activated Sludge**

The improved technique for determining the dehydrogenase activity of activated sludge enzymes on a specially developed automated installation is suggested.

Keywords: automatic control, activated sludge, dehydrogenases, microorganisms, oxidative activity.

---