

УДК 664.8.037.1

Влияние обработки клубнеплодов биопрепаратами на интенсивность дыхания и активность оксидаз при их хранении

Д-р техн. наук В.С. Колодязная, kvs_holod@mail.ru
О.Р. Глазкова, seiko.glazkova@gmail.com, М.С. Булькран

Университет ИТМО
191002, Россия, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

Т.Б. Нагиев

Ленинградский НИИСХ «Белогорка», 188338, Ленинградская область,
Гатчинский район, д. Белогорка, ул. Институтская 1

*В последнее время особую актуальность приобрели исследования в области решения проблемы снижения потерь и сохранения картофеля в постурожайный период с использованием различных микробиологических препаратов. В отечественной и зарубежной научной литературе отсутствует информация о влиянии бактерий *Pseudomonas asplenii* на кинетику физиолого-биохимических процессов, протекающих в клубнях при холодильном хранении. В статье приведены результаты исследования по влиянию обработки клубней биопрепаратами на основе бактерий-антагонистов *Pseudomonas asplenii* RF13Н и *Bacillus subtilis* 13 на интенсивность дыхания и активность оксидаз дыхательной системы картофеля при его холодильном хранении.*

*Установлено, что обработка клубней биопрепаратами на основе бактерий-антагонистов *Pseudomonas asplenii* RF13Н и *Bacillus subtilis* 13 не оказывает влияния на интенсивность дыхания.*

*Показано, что обработка клубней биопрепаратом на основе *Pseudomonas asplenii* RF13Н приводит к резкому повышению активности СОД, а *Bacillus subtilis* 13 незначительно влияет на активность этого фермента. При дальнейшем хранении активность СОД в контрольных и опытных образцах не отличается. Обработка клубней биопрепаратами не влияет на активность АО, однако она увеличивается на 120 суток хранения, что связано с постепенным выходом клубней из состояния покоя и началом периода прорастания, так как увеличивается содержание аскорбиновой кислоты в меристематических тканях.*

При снижении активности пероксидазы в опытных образцах происходит значительное повышение активности фенолоксидазы относительно контрольных, что свидетельствует об адаптации растительной клетки к неблагоприятным внешним воздействиям.

Ключевые слова: картофель, холодильное хранение, биопрепараты, активные формы кислорода, оксидазы дыхательной системы, интенсивность дыхания.

Influence of processing of tuber crops biological products on intensity of breath and activity of oxidases at their storage

D.Sc. V.S. Kolodyaznaya, kvs_holod@mail.ru
O.R. Glazkova, seiko.glazkova@gmail.com, M.S. Bulcran

ITMO University
191002, Russia, St. Petersburg, Lomonosov str.

Nagiyev T.B.

Leningrad Agricultural Research Institute "Belogorka" 188338,
Leningrad Region, Gatchina district, the village Belogorka, Institutskaya str., 1

*The problem of reducing losses and saving potatoes in the post-harvest period using various microbiological agents is important today. But, there is no domestic or foreign research literature about *Pseudomonas asplenii* bacteria effect on the kinetics of physiological and biochemical processes in tubers during cold*

storage. This article presents the effect of biopreparations based on bacteria-antagonists like Pseudomonas asplenii RF13H and Bacillus subtilis ch13 on the respiration rate and potatoes respiratory oxidases activity during refrigerated storage. It has been found that tubers treatment with biopreparations has no influence on the respiration rate and ascorbate oxidase activity. It has been shown that tubers processing with biopreparation based on Pseudomonas asplenii RF13H leads to a dramatic increase of SOD activity at the beginning of cold storage, while the treatment with Bacillus subtilis ch13 has little effect on it. Under further treatment, no difference was registered in the SOD activity in control and test samples. If peroxidase activity in test samples is reduced it causes a significant increase of phenol oxidase activity compared to control ones. It demonstrates plant cell adaptation to adverse external influences.

Keywords: potatoes, cold storage, biopreparations, reactive oxygen species, oxidases of the respiratory system, respiration rate.

Для повышения устойчивости растительной продукции наряду с длительным холодильным хранением при низких положительных температурах применяют дополнительные средства защиты. Известно, что холодильное хранение замедляет развитие бактерий и грибов, но не исключает поражения психрофильными фитопатогенными микроорганизмами растительной продукции [1, 2, 3].

Одним из перспективных направлений в решении проблемы снижения потерь картофеля от микробиальной порчи является биологический метод защиты, основанный на применении бактерий-антагонистов и продуктов их метаболизма. Наиболее эффективными группами антагонистов, подавляющих рост и развитие патогенной микрофлоры являются бактерии-антагонисты родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, у которых выявлен хорошо развитый синтез биологически активных соединений, что обеспечивает им высокую конкурентоспособность, лабильность свойств и адаптивность [4, 6].

Данный метод позволяет снизить или при определенных условиях полностью исключить применение химических средств защиты растений, что является экологическим преимуществом.

Цель работы: исследовать влияние обработки клубней картофеля биопрепаратами на интенсивность дыхания и активность оксидаз (аскорбатоксидаза (АО), пероксидаза (ПО), фенолоксидаза (ФО), супероксиддисмутаза (СОД)) при холодильном хранении картофеля.

Объекты исследования: картофель сорта «Невский», выращенный на опытных участках научно-производственного объединения «Белогорка», урожай 2014 г; культуральные жидкости на основе микроорганизмов *B.subtilis* Ч13 (ЖК1) и *P.asplenii*RF13H (ЖК2), полученные в лаборатории ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии.

Обработка клубней осуществлялась с помощью ультрадисперсного распыления культуральной жидкости с титром $T = 10^8$ КОЕ/мл на поверхность клубней. После подсушивания поверхности картофель закладывался на хранение при температуре $t = 4 \pm 1^\circ\text{C}$.

В контрольных (без обработки клубней биопрепаратами) и опытных образцах до закладки и в течение всего периода холодильного хранения определяли: интенсивность дыхания титрометрическим методом по количеству выделившегося диоксида углерода, активность ПО, АО, ФО и СОД общепринятыми методами [5].

Эксперименты проводили в трехкратной повторности, данные обрабатывали методом математической статистики с нахождением доверительного интервала при вероятности 0,95 с использованием стандартных компьютерных программ. В таблице и на рисунках представлены средние арифметические значения.

Результаты и их обсуждение

Понижение температуры до низких положительных температур является стрессом для большинства видов растительной продукции. Так же дополнительным стрессовым фактором является обработка микробиальными препаратами. Проследить степень адаптации растительной ткани к микроорганизмам можно с помощью наблюдения за изменением интенсивности дыхания и активности ферментов.

Интенсивность дыхания характеризует физиологическое состояние картофеля изменяющееся в зависимости от условий хранения. Исследования по влиянию обработки клубней биопрепаратами показали, что в растительной клетке не происходит нарушения физиолого-биохимических процессов при хранении картофеля в условиях низких положительных температур. Так, интенсивность дыхания контрольных и опытных образцов клубней в течение 90 суток хранения снижается, а затем, при последующем хранении увеличивается, независимо от условий обработки (таблица 1).

Таблица 1

**Интенсивность дыхания картофеля сорта «Невский»
при холодильном хранении клубней, мг CO₂/(кгч)**

Способ обработки	τ, сут			
	0	30	90	120
Контроль (без обработки)	16,1±0,5	11,7±0,3	7,6±0,1	14,8±0,4
Bacillus subtilis Ч13	16,1±0,5	12,5±0,2	6,4±0,1	15,0±0,4
Pseudomonas asplenii RF13h	16,1±0,5	11,8±0,2	7,0±0,1	14,7±0,4

В дыхательной цепи важное значение имеет активность оксидаз, изменение активности которых является ответной реакцией организма на внешние воздействия.

Известно, что при действии неблагоприятных факторов увеличивается образование активных форм кислорода, в том числе и радикалов супероксида. Активность СОД при этом изменяется разнонаправлено; в одних случаях отмечено ее увеличение, в других — снижение, что зависит от напряженности действия стрессового фактора (интенсивности и длительности воздействия), а также от восприимчивости организма данными биопрепаратами [9, 10]. Заражение растений различными патогенами, являющимися биотическими стрессорами, также изменяет активность СОД.

Воздействие высоких и низких температур на растительный организм существенно смещает равновесие антиоксиданты – прооксиданты в сторону последних.

В результате окислительного стресса в клетках накапливаются в большом количестве денатурированные белки, продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые могут быть не только первичными медиаторами стрессового воздействия температурного фактора, но и индукторами соответствующих защитных механизмов в растительных клетках.

Определенный низкий уровень активных форм кислорода (АФК) всегда присутствует в клетках и находится под контролем антиоксидантной системы. Однако, при действии неблагоприятных факторов увеличивается образование активных форм кислорода и в ответ на неблагоприятные условия растительная клетка запускает защитный механизм [7].

Супероксидный радикал – первичный продукт одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода – супероксидный анион-радикал (O^{2•-}) не обладает сильными окислительными свойствами, но представляет большую опасность, поскольку является источником образования более активных форм кислорода: пероксид водорода, гидроксильные и гидроперекисные радикалы, синглетный кислород и пероксинитри), которые активно окисляют белковые молекулы, и против действия которых специфических ферментов-дезактиваторов не существует, их уровень в клетке регулируется СОД путем

инактивации источника их образования - супероксидных радикалов. По этой причине СОД является первичной линией защиты от окислительных повреждений, обрывая окисление макромолекул на стадии инициирования.

Благодаря тому, что супероксиддисмутаза защищает клетку от повреждающего действия супероксида, Он играет одну из ключевых ролей в антиоксидантной защите организма. Роль этого фермента была показана экспериментально: мыши, у которых отсутствует митохондриальная СОД, выживают лишь несколько дней после рождения, так как у них развивается сильный оксидативный стресс.

Супероксидный радикал (O_2^-) спонтанно довольно быстро дисмутирует в кислород O_2 и пероксид водорода H_2O_2 ($\sim 10^5 M^{-1} s^{-1}$ при pH 7). Тем не менее, супероксид ещё быстрее реагирует с некоторыми другими молекулами-мишенями, такими как оксид азота NO, образуя при этом пероксинитрит.

Однако, супероксиддисмутаза обладает самой высокой известной каталитической скоростью реакции ($\sim 10^9 M^{-1} s^{-1}$). Реакция лимитирована только частотой столкновения супероксида с ферментом (т. н. диффузионно-лимитированная реакция) [8].

На рисунке 1 видно, что обработка биопрепаратами клубней картофеля приводит к повышению активности СОД. Высокая активность ярко выражена в начальный период хранения, что вызвано адаптацией тканей клубней картофеля к микроорганизмам и снижается при нормализации обмена веществ.

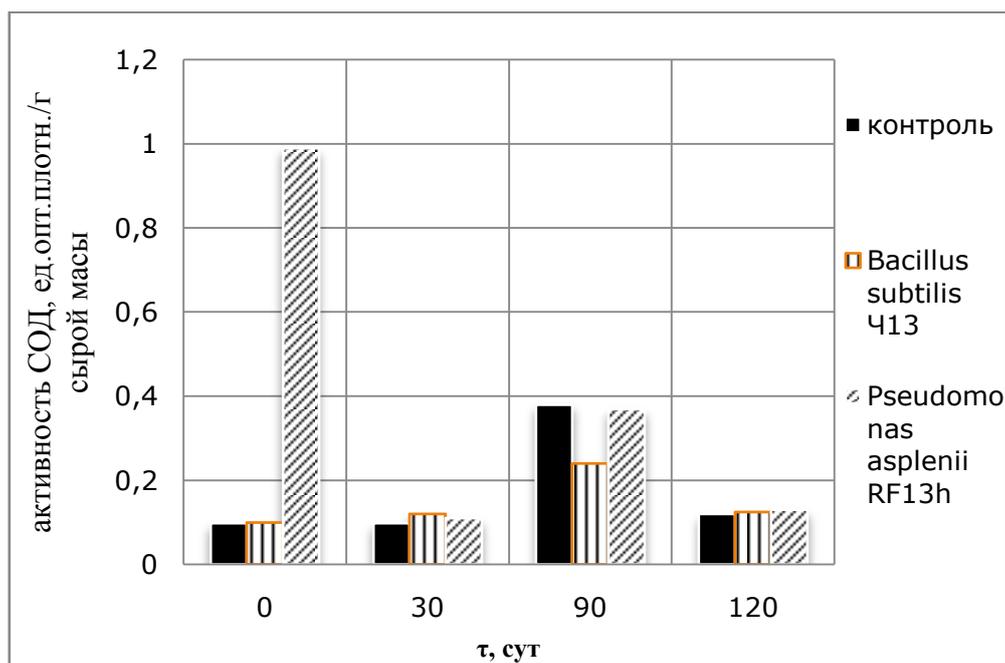


Рисунок 1 – Изменение активности СОД при холодильном хранении картофеля в зависимости от условий обработки

После действия супероксиддисмутазы защитную функцию берут на себя такие ферменты как, аскорбатоксидаза, фенолоксидаза и пероксидаза.

Пероксидаза больше действует на органические перекиси, а ФО на фенольные соединения, аминокислоты, АО – специфичный фермент – действует на аскорбиновую кислоту. В зависимости от изменения соотношения субстратов, ферменты меняют свою активность.

Фермент высокоспецифичен к восстановленной форме аскорбиновой кислоты и быстро теряет активность в ее отсутствии. Он участвует в реакции восстановления пероксида водорода аскорбиновой кислотой, защищая клетки от токсического действия избыточного количества H_2O_2 .

Увеличение активности АО на 120 суток хранения (рисунок 2) связано с постепенным выходом клубня из состояния покоя и началом периода прорастания, так как увеличивается содержание аскорбиновой кислоты в меристематических тканях.

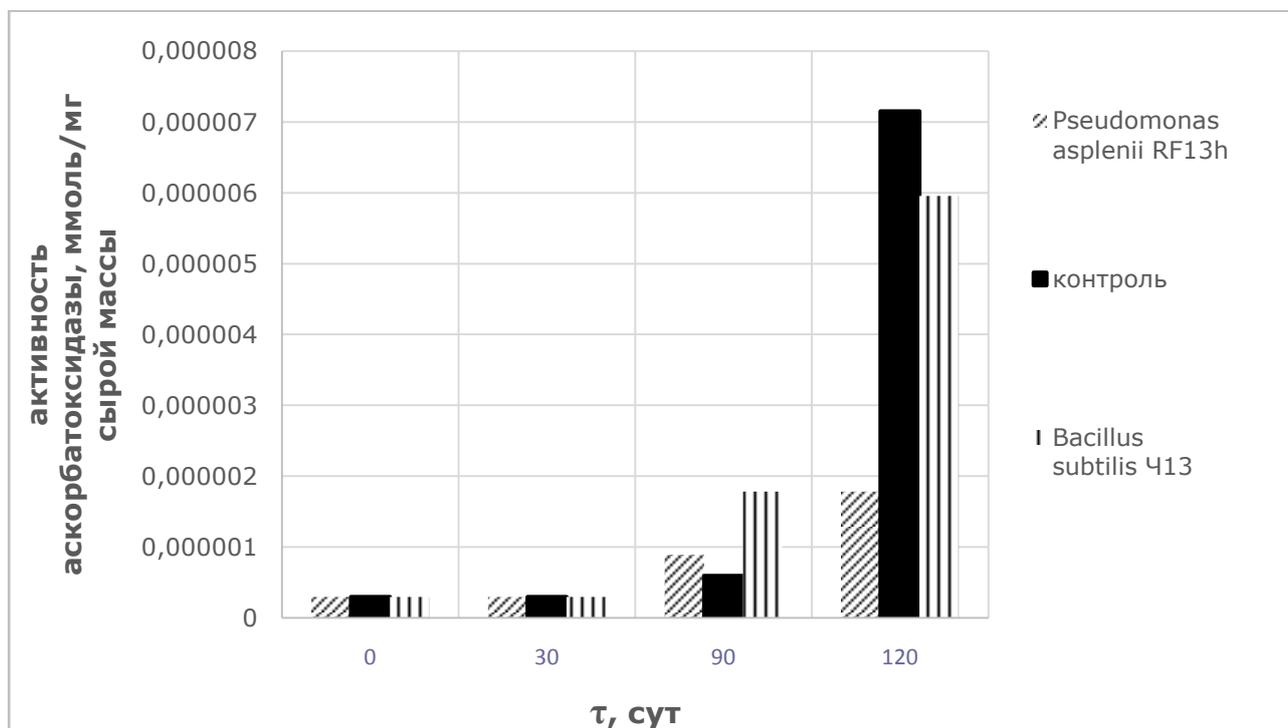


Рисунок 2 – Изменение активности аскорбатоксидазы при холодильном хранении в зависимости от условий обработки картофеля

Реакция растительной клетки на охлаждение выражается в повышении активности пероксидазы. Фермент пероксидаза представляет собой одно из звеньев цепи переноса электронов и участвует в альтернативных механизмах дыхания. Увеличение активности пероксидазы связано с утилизацией органических перекисей, образующихся в процессе усиленного дыхания зараженных тканей.

На рисунке 3 видно, что активность пероксидазы в контрольных образцах в течение всего периода хранения постепенно снижалась, в то время как в клубнях, обработанных микробиальными препаратами, активность АО с момента обработки до 30 суток увеличивалась, а к 120 суткам стабилизировалась. Повышение активности на начальных этапах хранения, вероятно, связано с периодом адаптации микроорганизмов к низким температурам.

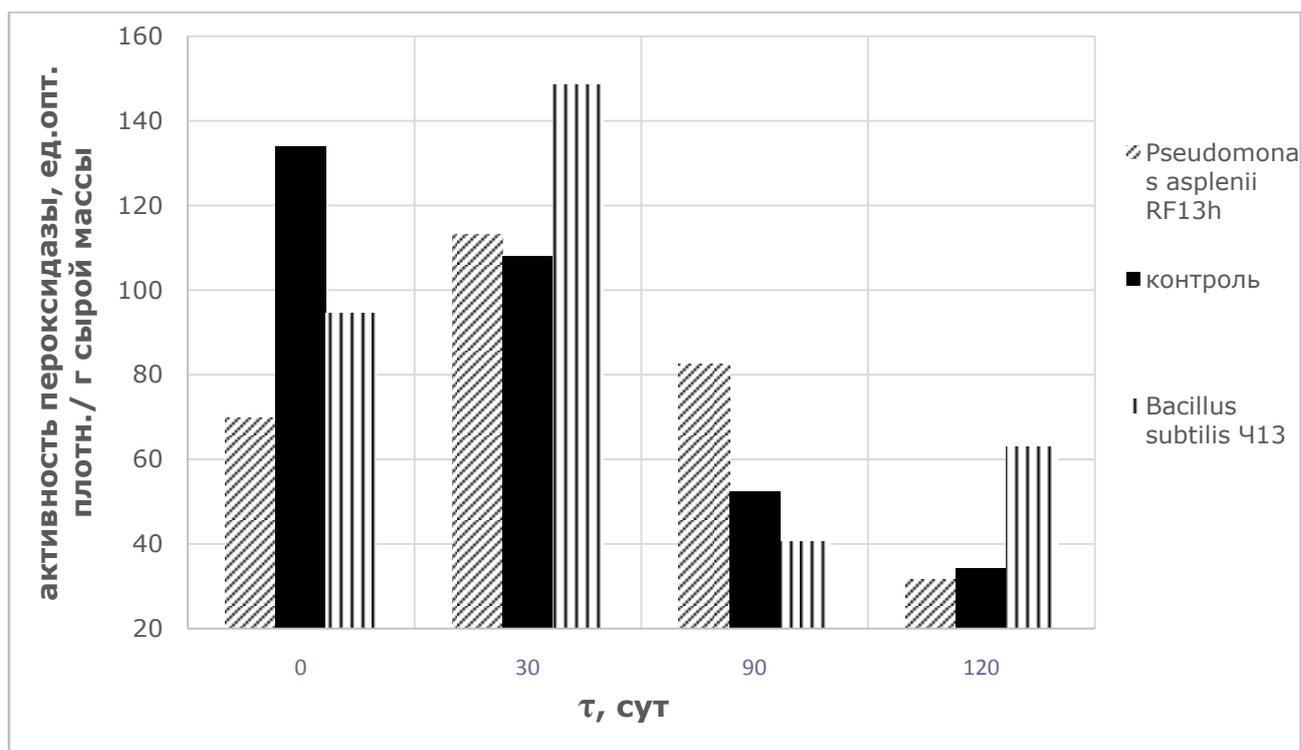


Рисунок 3 – Изменение активности пероксидазы при холодильном хранении в зависимости от условий обработки картофеля

Идентичные функции с пероксидазой имеет фермент фенолоксидаза (рисунок 4). ФО имеет низкое сродство к кислороду и соответственно она активизируется при его более высоком парциальном давлении. Приток кислорода может усиливаться при механических повреждениях тканей, а также при обработке клубней биопрепаратами. В этом случае фермент ФО выполняет защитные функции.

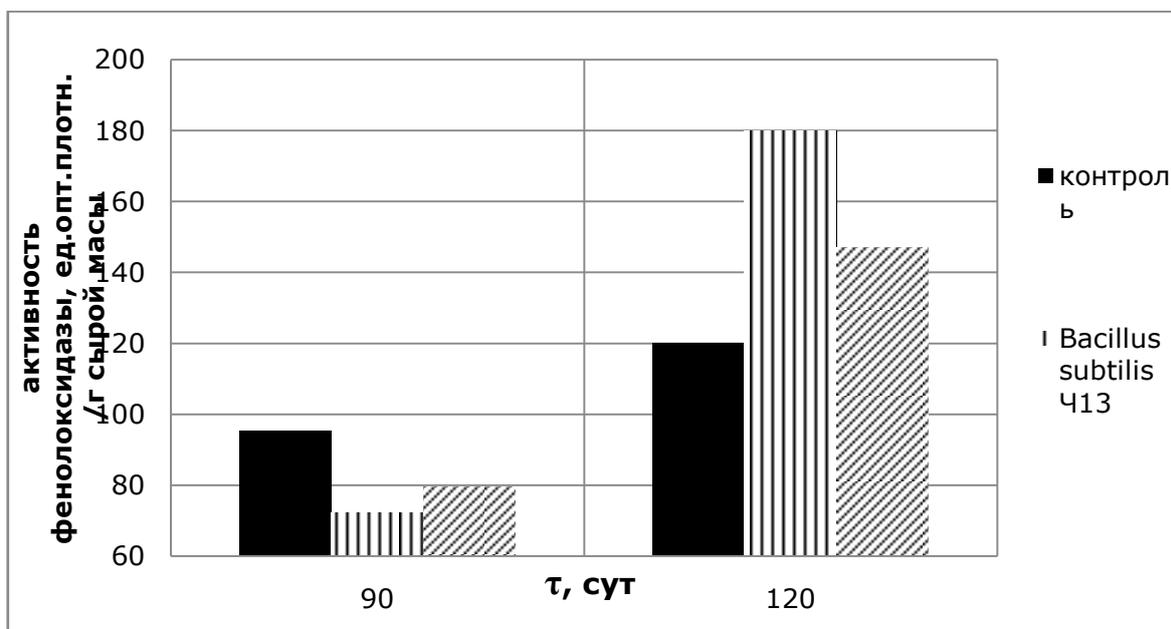


Рисунок 4 – Изменение активности фенолоксидазы при холодильном хранении в зависимости от условий обработки картофеля

На основании проведенных исследований установлено, что обработка клубней биопрепаратами на основе бактерий-антагонистов *Pseudomonas asplenii* RF13H и *Bacillus subtilis* Ч13 не оказывает влияния на интенсивность дыхания.

Показано, что обработка клубней биопрепаратом на основе *Pseudomonaspleni*RF13H приводит к резкому повышению активности СОД, а *Bacillus subtilis*13 незначительно влияет на активность этого фермента. При дальнейшем хранении активность СОД в контрольных и опытных образцах не отличается.

Обработка клубней биопрепаратами не влияет на активность АО, однако она увеличивается на 120 суток хранения, что связано с постепенным выходом клубней из состояния покоя и началом периода прорастания, так как увеличивается содержание аскорбиновой кислоты в меристематических тканях.

При снижении активности пероксидазы в опытных образцах происходит значительное повышение активности фенолоксидазы относительно контрольных, что свидетельствует об адаптации растительной клетки к неблагоприятным внешним воздействиям.

Литература (References)

1. Кипрушкина Е.И., Колодязная В.С., Чеботарь В.К. Товарное качество и безопасность растительной продукции при применении биологических средств защиты // Доклады РАСХН. №2. 2006. С. 8–10.
2. Кипрушкина Е.И., Колодязная В.С., Чеботарь В.К. Экологически безопасный биологический метод сохранения сельскохозяйственной продукции // Вестник защиты растений. 2003. № 3. С. 17–24.
3. Kiprushkina E.I. The biological Control and cold Storage for Preserving the Quality and Enhancing the Safety of Vegetables. *Plant Science*. 2007, no. 44, pp. 259–261.
4. Колодязная В.С., Бараненко Д.А., Кипрушкина Е.И., Румянцева О.Н., Шестопалова И.А. Продовольственная безопасность и холодильная технология // Вестник Международной академии холода. 2013. №1. С. 24–28.
5. Базарнова Ю.Г. Методы исследования свойств сырья и пищевых продуктов. СПб.: НИУ ИТМО, 2012. 76 с.
6. Кипрушкина Е.И. Воздействие низкой температуры на динамику численности и проявление биоконтролирующего эффекта бактериями родов *Pseudomonas* и *Bacillus* // Вестник Международной академии холода. 2007. № 3. С. 34–38.
7. Щербаков В.Г и др. Биохимия. СПб.: ГИОРД, 2003. 440 с.
8. Подколзин А.А., Мегреладзе А.Г. Система антиоксидантной защиты организма и старение // Профилактика старения. 2000. № 3. С. 22–27.
9. Деверолл Б. Дж. Защитные механизмы растений. М.: Колос, 1980. С. 128.
10. Пахомова В.М. Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений // Цитология. 1995. Т. 37. № 1/2. С. 66–91.
11. Тимофеев В.Н., Васильева И.Г. Повышение эффективности хранения картофеля на объектах общественного питания // Вестник Международной академии холода. 2011. № 4.

Статья поступила в редакцию 03.07.2015 г.