

Влияние ультразвука на активность каталазы в семенах бобовых растений, микромицетов и бактерий

С. С. Тарасов^{1*}, А. П. Веселов^{1,2}, А. С. Корягин²

¹Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия
Россия, 603107 г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, 97.

²Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
Россия, 603022 г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, 23.

*Email: tarasov_ss@mail.ru

Работа посвящена изучению влияния ультразвука на активность каталазы в семенах гороха, клевера, культуральной жидкости аспергиллуса и суспензии цекотрофов кролика. Объекты обрабатывали ультразвуком в течении 5, 10 и 20 минут, путем помещения колбы с замоченными семенами, культурой гриба и суспензии в ультразвуковую установку. По окончании эксперимента в объектах определяли активность каталазы газометрическим методом. Наибольшая активность каталазы наблюдается в семенах клевера, наименьшая в культуральной жидкости гриба.

Ключевые слова: каталаза, ультразвук, окислительный стресс, предпосевная обработка семян, цекотрофы кролика.

Применение физических методов воздействия на биосистемы активно используется в агрономии, ветеринарии, зоотехнии, биотехнологиях и пр. для стимуляции или лечения с одной стороны, так и в качестве мер борьбы с вредными организмами с другой [1]. В частности, используют электромагнитное облучения разного спектра [2, 3], температурное, механическое воздействие, действие низкоинтенсивной ионизирующей радиации, магнитного поля [4] и пр. Особенно актуальным остается разработка новых экологически чистых технологий предпосевной обработки семян, создание новых пробиотических препаратов для животных. С нашей точки зрения использования ультразвуковой обработки является интересным, результативным и перспективным направлением. Он может оказывать как негативное, так и положительное воздействие на организм. Однако механизм его действия, физиологические и биохимические реакции до конца пока не изучены [5]. Вероятно, он может влиять на генерацию активных форм кислорода (АФК), следовательно, оказывать воздействие на процессы биологического окисления и системы антиоксидантной защиты. Одним из главных компонентов антиоксидантной системы является каталаза [6, 7], расщепляющая перекись водорода на кислород и воду, [8]. С нашей точки зрения ультразвуковая обработка исследуемых биосистем может так же активировать или подавлять процессы метаболизма, по-видимому, эффект зависит от времени обработки и природы объекта. На основании изложенного целью нашей работы явилось исследовать возможность влияния

ультразвука разной продолжительности на активность каталазы в семенах бобовых растений, культуральной жидкости микромицета и суспензии цекотрофов кролика.

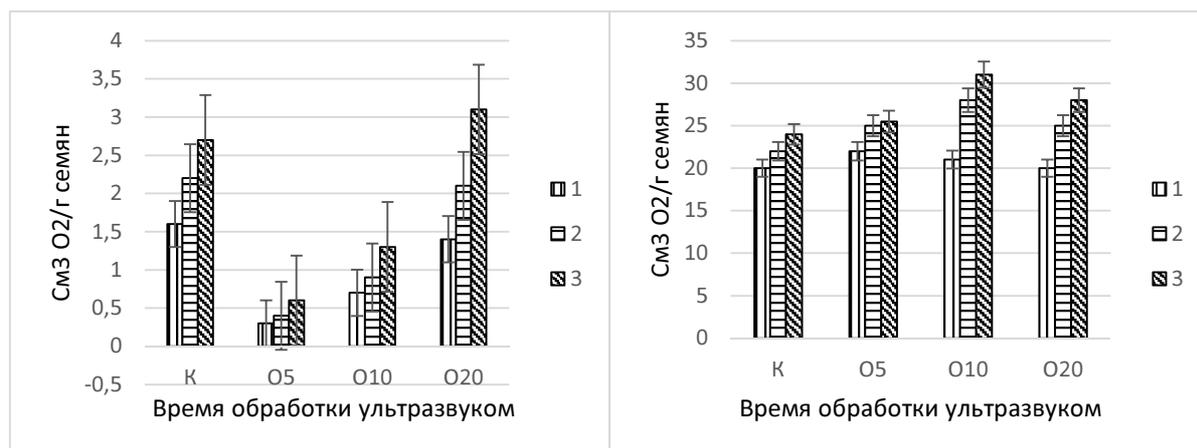
В качестве объекта исследования использовали семена гороха посевного (*Pisum sativum*), клевера ползучего (*Trifolium repens*), культуральную жидкость гриба *Aspergillus niger*, суспензию цекотрофов кролика (*Oryctolagus cuniculus*) содержащую симбиотические бактерии пищеварительного тракта. Данные объекты выбраны не случайно. Исследуемые растения являются ключевыми культурами в современном сельском хозяйстве страны [9], усовершенствование технологии их возделывания считается важной стратегической задачей. Предпосевная обработка одна из главных стадий технологии выращивания растений, именно благодаря ей можно увеличить скорость прорастания, устойчивость растений к стресс факторам и как следствие увеличить качество и количество урожая. *Aspergillus niger* имеет важное практическое значение, вызывая микозы, повреждая культурные растения и промышленные материалы, сильно распространен в микосфере центральной России [10, 11]. Цекотрофы кролика важны в пищеварении животного [12], их изучение позволит разработать пробиотические препараты, что может совершенствовать технологии выращивания зверей, особенно на начальных этапах онтогенеза. Исследуемые семена были помещены в стеклянный сосуд, залиты водой, плотно закрыты резиновой пробкой и помещены в водную среду ультразвуковой мойке. Суспензию цекотрофов кролика готовились путем растворения их в фосфатном буфере pH 7.2, были помещены в колбы и обработаны ультразвуком аналогично семенам. Грибы культивировались на обедненной питательной среде Чапека – Докса в течении 14 суток [13]. Обработку объектов проводилась в течении 5, 10 и 20 минут, данные интервалы выбраны не случайно, 5 минут – кратковременное воздействие, 10 – средне временное и 20 – долговременное действие. По окончании обработки семена были растерты в фарфоровой ступке в фосфатном буфере pH 7.2 в количестве 0.5 г на 20 мл буфера. Полученный раствор использовался для изучения активности каталазы.

Активность фермента определялось газометрическим методом [14]. Эксперимент проводился в 3-х биологических и 3-х биохимических повторностях. Результаты обработаны статистически, с расчетом среднее арифметическое (M) и стандартные отклонения (σ) с использованием программы Microsoft Excel 2010 [15].

Результаты эксперимента показали зависимость активности каталазы от типа биосистемы в норме и под действием ультразвука. Наибольшая активность фермента зафиксирована в семенах клевера (рис 1В), наименьшая в культуральной жидкости гриба *Aspergillus niger* (рис. 2).

Активность каталазы в семенах гороха при 5 минутной обработки ультразвуком показала резкое падение, аналогично картина наблюдается при 10 минутной обработки, 20 минутное действие ультразвуком усилило активность фермента по сравнению с

предыдущим измерением становится примерно равным с контролем (рис. 1А). В семенах клевера наблюдается иная реакция каталазы на ультразвук. Действие ультразвуком в течении 5 минут не оказала влияние на фермент, 10 и 20 минутная обработка усиливает активность примерно на 5–10% относительно контроля (рис. 1В). Активность каталазы в семенах клевера значительно выше, чем в семенах гороха, реакция на ультразвук не значительная, у гороха 5 и 10 минутное воздействие существенно ингибировали активность каталазы.



А.

В.

Рис. 1. Влияние ультразвука на активность каталазы в семенах гороха (А) и клевера (В), где К – контроль, 5, 10 и 20 – время обработки семян ультразвуком, 1, 2, 3 – время фиксации активности фермента.

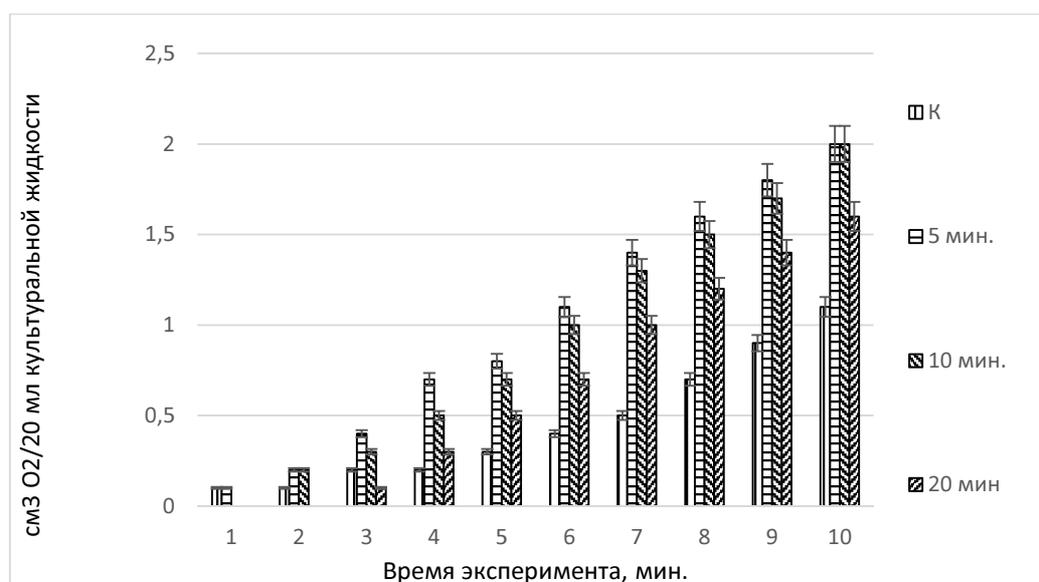


Рис. 2. Влияние ультразвука на активность каталазы в культуральной жидкости гриба *Aspergillus niger*, где 5, 10 и 20 минут – время обработки грибов ультразвуком, 1, 2, 3... – время фиксации выделения O₂ с момента добавления перекиси в подготовленную культуральную жидкость.

На рисунке 2 показаны активность каталазы в культуральной жидкости у гриба *Aspergillus* под действие ультразвуковой обработки. Установлено, что наибольшая активность фермента при 5-ти и 10-ти минутной обработки ультразвуком. Двадцатиминутная обработка ультразвуком подавляет активность каталазы в культуральной жидкости исследуемого гриба. Выявлено: равномерное увеличение активности экзофермента при 5-ти и 10-ти минутной обработки ультразвуком.

В цекотрофах кролика ультразвуковое воздействие оказывает не значительный стимулирующий эффект на активность каталазы, в пределах 10–20%. Наибольшая активность наблюдается при 5 и 10 минутной обработки (рис. 3).

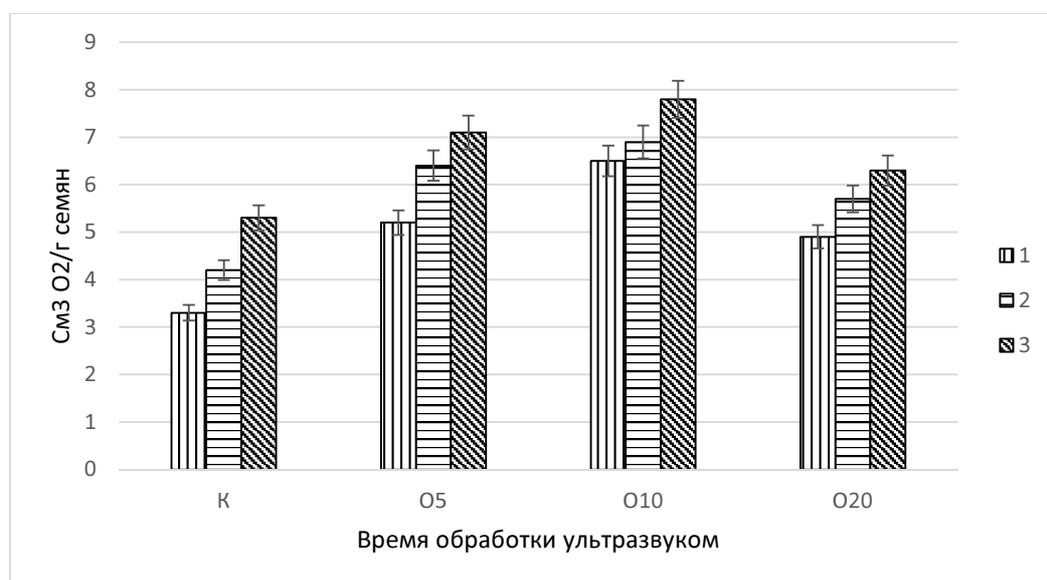


Рис. 3. Влияние ультразвука на активность каталазы микрофлоры цекотрофов кролика (обозначения см. рис. 1).

Полученные результаты можно объяснить видовыми особенностями семян; плотностью семенных оболочек, размером, особенностями биохимического состава эндосперма. Так горох имеет больший размер и соответственно дольше набухает, следовательно, медленнее запускаются механизмы прорастания, в том числе дыхание, в процессе которого генерируется H_2O_2 основной субстрат для каталазы. Однако его реакция на ультразвук проявляется интенсивнее клевера, возможно это связано с тем, что на ранних этапах набухания растение наиболее лабильно к действию стресс факторов, т.е. выработан адаптационный механизм прорастания в условиях быстрой смены оптимальных факторов на неблагоприятные.

Aspergillus обитает в более агрессивной среде, в которой образуются перекись, соответственно для ее дезактивации необходимо большее количество каталазы. Действительно анализируя экологическую нишу гриба, становится очевидным, что он произ-

растает на самых разнообразных средах, поселяется на продукты с большим содержанием жира, сахаров и обедненных средах обитания.

Динамика активности фермента у гриба *Aspergillus* можно выделить резкое увеличение активности фермента в первые 5 минут действия фактором, скорее всего это связано с особенностями действия ультразвуковой волны на мембраны, что приводит к усилению интенсивности дыхания, а, следовательно, образования побочных продуктов в том числе и перекиси. Подавление активности фермента при 20 минутной обработки ультразвуком возможно отрицательно влияет на саму структуру молекулы каталазы, т.е. по сути разрушает ее, логично это приводит к снижению активности данного фермента. Другая возможная причина снижение активности – закисление среды, т.к. данный фермент плохо работает при pH ниже 7. Закисление возможно связано с усилением и нарушением интенсивности дыхания, продуктами которого являются карбоновые кислоты.

Активность каталазы в цекотрофах кролика под действием ультразвука имеет схожую тенденцию с грибом *Aspergillus*, однако у последнего наблюдается более резкая реакция. Вероятно, это можно объяснить тем, что прокариоты имеют более лабильный генетический аппарат, способны быстро запускать генетические системы регуляции антиоксидантной защиты от действия стресс факторов.

Заключение. Выявлено влияние ультразвука на семена бобовых культур, так 5 и 10 минутное воздействие оказывает ингибирующее влияние на активность каталазы в семенах гороха, в семенах клевера 10 и 20 минутное воздействие усиливало активность фермента. В культуральной жидкости гриба *Aspergillus niger* и суспензии цекотрофов кролика наблюдается схожая картина, 5 и 10 минутная обработка ультразвуком активировала активность каталазы, однако у гриба деятельность фермента была более выражена чем у микроорганизмов цекотрофа.

Литература

1. Голямина И. П. (ред.). Ультразвук. Маленькая энциклопедия. М.: Советская энциклопедия, 1979.
2. Головина Т. А. обработка зерна СВЧ-полем как способ борьбы с токсинообразующими грибами // Успехи медицинской микологии. 2004. Т. 3. №3. С. 54–56.
3. Чилочи А. А., Тюрина Ж. П., Клапко С. Ф., Стратан М. В., Лаблюк С. В., Дворнина Е. Г., Кондрук В. Ф. Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на биосинтез внеклеточных гидролитических ферментов микромицетов из родов *Aspergillus* и *Penicillium* // Электронная обработка материалов. 2011. Т. 47. №6. С. 87–93.
4. Сеницына Ю. В., Середнева Я. В., Веселов А. П., Сухов В. С. Влияние низкочастотного переменного магнитного поля и гипертермии на рост и фотосинтез проростков гороха // Современные проблемы науки и образования. 2014. №6. С. 1374.

5. Викторов И. А. Физические основы применения ультразвуковых волн Рэля и Лэмба в технике. М.: Наука, 1966
6. Дубининой Е. Е. «Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты» – СПб.: Медицинская пресса, 2006. – 400 с.
7. Patterson B. D., Paune L. A., Chen Yi-Zhu, Graham P. An inhibitor of catalase induced by cold in chilling-sensitive plants // *Plant Physiology*. 1984. №4. Vol. 76. P. 1014–1018
8. Li-Juan Quan, Bo Zhang, Wei-Wei Shi and Hong-Yu Li. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species. *Network Journal of Integrative // Plant Biology*. 2008. Vol. 50 (1): P. 2–18
9. Михалев Е. В, Кривенков В. А., Иванов В. В. Возделывание гороха / под ред. Е. В. Михалева – Н. Новгород: НГСХА, 2017 г. 192 с.
10. Шарова Н. Ю., Каменькова Н. В., Палаев А. Г. Влияние ультразвука на микрофлору ферментационной системы для биосинтеза лимонной кислоты и продуцент *Aspergillus niger* // *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2011. №6. С. 55–56.
11. Глушко Н. И., Халдеева Н. В., Лисовская С. А., Паршаков В. Р. биохимические и иммунобиологические свойства аллергенных экстрактов из *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger* и *Aspergillus flavus* // *Успехи медицинской микологии*. 2014. Т. 12. С. 24–26.
12. Харламов К. В., Куликов Н. Е., Егорова К. И., Люднов И. П. Цекотрофофагия кроликов // *Кролиководство и звероводство* 2016. №1. С. 12–14
13. Методы экспериментальной микологии / под редакцией В. И. Билай. Киев: Наукова Думка, 1982 г., С. – 45
14. Рубцова М. С. Практикум по физиологии растений / М. С. Рубцова. – Издательство НГСХА, 2003. 127 с.
15. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.

Статья рекомендована к печати кафедрой ботаники, физиологии и защиты растений Нижегородской государственной сельскохозяйственной академии (кан. биол. наук, доц. Е. К. Крутова)

Effect of ultrasound on catalase activity in seeds of leguminous plants, micromycetes and bacteria

S. S. Tarasov^{1*}, A. P. Veselov^{1,2}, A. S. Koryagin²

¹*Nizhny Novgorod State Agricultural Academy
97 Gagarin Avenue, 603107 Nizhny Novgorod, Russia.*

²*N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod
23 Gagarin Avenue, 603022 Nizhny Novgorod, Russia.*

*Email: tarasov_ss@mail.ru

The work is devoted to the study of the effect of ultrasound on catalase activity in seeds of pea, clover, aspergillus culture fluid and rabbit suspension of cecotrophs. The objects were sonicated for 5, 10 and 20 minutes, according to the size of the flask with soaked seeds, the culture of the fungus and the suspension in the ultrasound unit. At the end of the experiment, the activity of the catalase was determined in the objects by the gas metric method. The highest activity of catalase is observed in the seeds of clover, the smallest in the culture fluid of the fungus.

Keywords: catalase, ultrasound, oxidative stress, presowing seed treatment, rabbit cecotrophs.