

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т.Г. Волова

« _____ » _____ 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01. Биология

код – наименование направления

Влияние пероксидов на микроорганизмы invitro

тема

Научный руководитель _____ проф. д.б.н. _____ С.В. Прудникова

Выпускник _____ П.А. Тимошенко

Красноярск 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Характеристика пероксидов	5
1.1.2 Химические свойства пероксида водорода.....	5
1.1.2 Биологические свойства пероксида водорода	6
1.2 Применение пероксидов	7
1.2.1 <i>Применение пероксида водорода</i>	7
1.2.2 <i>Применение бензоил пероксида</i>	10
1.3 Механизм деградации пероксида водорода в клетке	11
1.3.1 <i>Характеристика каталазы</i>	11
1.4 Предпосевная обработка семян перекисью водорода	12
1.5 Контролируемые (адресные) системы доставки веществ.....	14
2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ	16
2.1 Объекты исследования	16
2.2 Методы выделения микроорганизмов	16
2.1.1 <i>Выделение микроорганизмов из воздуха</i>	16
2.1.2 <i>Выделение микроорганизмов из почвы</i>	16
2.1.2 <i>Выделение микроорганизмов из семян и проростков пшеницы</i>	17
2.3 Конструирование микрочастиц эмульсионным методом.....	18
2.4 Методы определения чувствительности микроорганизмов к пероксиду водорода	19
2.4.1 <i>Метод определения чувствительности микроорганизмов с помощью жидкого пероксида водорода</i>	19
2.4.2 <i>Метод определения чувствительности микроорганизмов с помощью частиц</i>	19
2.5 Метод обработки семян пшеницы пероксидом водорода	20
3 РЕЗУЛЬТАТЫ	21
3.1 Влияние пероксида водорода на бактерии воздушной среды аудиторий	Ошибка! Закладка не определена.

3.2 Влияние пероксида водорода на почвенные бактерии	Ошибка!
Закладка не определена.	
3.3 Влияние пероксида водорода на микрофлору пшеницы	Ошибка!
Закладка не определена.	
3.4 Влияние пероксида водорода на прорастание семян пшеницы ..	Ошибка!
Закладка не определена.	
3.5 Антимикробная активность инкапсулированного пероксида водорода	
..... Ошибка! Закладка не определена.	
ВЫВОДЫ	22
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	23

ВВЕДЕНИЕ

Рост биологической продуктивности в сельском хозяйстве является актуальным направлением исследований многих биологических наук. Биотехнологические методы могут быть использованы в сельском хозяйстве для повышения плодородия почв, борьбы с вредителями и возбудителями болезней культурных растений и животных, приготовления продовольственных продуктов, их консервирования и улучшения питательных свойств. При этом значимость биотехнологии для развития и повышения эффективности традиционных сельскохозяйственных технологий непрерывно возрастает [1].

Микроорганизмы играют большую роль как в повышении плодородия почвы, так и в процессе заражения растений с их последующей гибелью.

В настоящее время изучение взаимодействий растений и микроорганизмов имеет особую актуальность, так как сокращение применения в сельском хозяйстве минеральных и органических удобрений, и увеличение применения пестицидов, их накопление в почве и урожае с последующим формированием резистентности к ним у возбудителей болезней и вредителей растений, ставит задачу поиска альтернативных источников средств защиты растений, оказывающих противомикробное действие.

Одним из таких средств могут являться пероксиды, способные подавлять развитие патогенных микроорганизмов, что в конечном итоге снижает заболеваемость растений, повышает их продуктивность и улучшает качество растениеводческой продукции.

Цель работы – изучить влияние пероксида водорода на рост бактерий и мицелиальных грибов *in vitro*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить бактерии и мицелиальные грибы из различных сред: воздуха, почвы, семян и проростков пшеницы;
2. Провести сравнительный анализ чувствительности к пероксиду водорода среди микроорганизмов, выделенных из разных источников
3. Оценить antimикробную активность пероксида водорода, депонированного в микрочастицы из поли(3-гидроксибутират)
4. Оценить влияние разных концентраций пероксида водорода на прорастание семян *in vitro*.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика пероксидов

Согласно научным источникам [2], пероксиды представляют собой группу химических соединений, содержащих в своем составе два связанных атома кислорода –O–O–, которые имеют степень окисления -1. Многие пероксиды являются сильными окислителями, легко воспламеняются и горят. Легко образуются в ходе фотохимической реакции при длительном освещении эфиров в присутствии кислорода.

Различают неорганические и органические пероксиды[3]. Неорганические известны для большей части элементов.Пероксиды щелочных и щелочноземельных металлов, вступая в реакцию с водой, образуют соответствующий гидроксид и пероксид водорода (рис. 1).

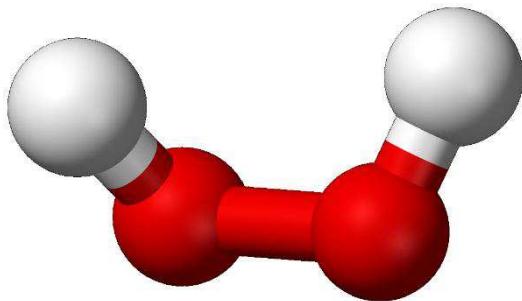


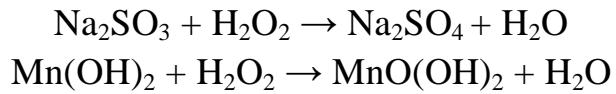
Рисунок 1 – Химическая структура пероксида водорода

Органическими пероксидами считают производные продукта пероксида водорода, в котором один или два атома водорода замещены на органические радикалы.Органические пероксиды широко используются в химической, пластиковой и резиновой промышленностях и производстве пластмасс [4].

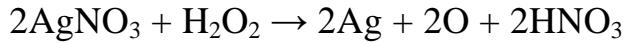
1.1.2 Химические свойства пероксида водорода

Пероксидводорода является хорошим растворителем. Вследствие несимметричности молекула H_2O_2 сильно полярна. Относительно высокая вязкость жидкого пероксида водорода обусловлена развитой системой водородных связей. Поскольку атомы кислорода имеют неподелённые электронные пары, молекула H_2O_2 также способна образовывать донорно-акцепторные связи [5].

Оба атома кислорода находятся в промежуточной степени окисления -1 , что и обуславливает способность пероксидов выступать как в роли окислителей, так и восстановителей. Наиболее характерные для них окислительные свойства:



При взаимодействии с сильными окислителями пероксид водорода выступает в роли восстановителя, окисляясь до атомарного кислорода[6]:



Молекула пероксида водорода сильно полярна, что приводит к возникновению водородных связей между молекулами. Связь $\text{O}-\text{O}$ непрочна, поэтому H_2O_2 — неустойчивое соединение, легко разлагается. Но чистый пероксид достаточно устойчив. Так же этому может способствовать присутствие ионов переходных металлов.[7] В разбавленных растворах пероксид водорода тоже неустойчив и самопроизвольно диспропорционирует на H_2O и O . Реакция диспропорционирования катализируется ионами переходных металлов, некоторыми белками[8]:



1.1.2 Биологические свойства пероксида водорода

Пероксид водорода относится к реактивным формам кислорода, при повышенной концентрации в клетке вызывает оксидативный стресс. Некоторые ферменты, например глюкозоксидаза, образуют в ходе окислительно-восстановительной реакции пероксид водорода, который может играть защитную роль в качестве бактерицидного агента. В клетках млекопитающих нет ферментов, которые бы восстанавливали кислород до перекиси водорода. Но существует несколько ферментных систем, таких как ксантинооксидаза, НАДФ•Н-оксидаза, циклооксигеназа и др., которые продуцируют супероксид, который спонтанно или под действием супероксиддисмутазы превращается в пероксид водорода [9].

Несмотря на то, что пероксид водорода нетоксичен, его концентрированные растворы при попадании на кожу, слизистые оболочки и в дыхательные пути вызывают ожоги. В больших концентрациях недостаточно чистый пероксид водорода может быть взрывоопасен.

Опасен при приёме внутрь концентрированных растворов. Вызывает выраженные деструктивные изменения, сходные с действиями щелочей. Летальная доза 30%-го раствора пероксида водорода (пергидроля) — 50—100 мл.[10,11].

1.2 Применение пероксидов

1.2.1 Применение пероксида водорода

На сегодняшний день актуально использование пероксида водорода в качестве бактерицидного реагента, обладающего следующими свойствами и имеющего ряд технологических преимуществ:

- Окислитель, применение которого не сопровождается экологически вредными последствиями;
- Высокая селективность окисления различных примесей, что, в свою очередь, позволяет минимизировать затраты на другие, более дорогостоящие реагенты;
- Пероксид водорода характеризуется стабильностью, в отличие от многих других окислителей [12].

В качестве примера высокоэффективного применения пероксида водорода обратимся к работе ученых Донского государственного аграрного университета [13]. Пероксид водорода был выбран как бактерицидный реагент для очистки сточных вод, который имеет существенные преимущества перед хлорированием, т.к. образование в воде хлорогранических соединений, которые показывают высокие уровни генотоксической активности в отношении человека и живых организмов (тригалометаны, хлорбензол, хлорфенол, хлорамины, четыреххлористый углерод и целый ряд других).

Также широкое применение в дерматологии наряду с антибиотиками имеет бензоилпероксид для лечения угревой сыпи [14].

С целью изучения бактерицидной активности пероксида водорода в отношении санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов были проведены две серии опытов. В первом случае, брали предварительно простерилизованную воду, в которую затем вносили санитарно-показательные микроорганизмы *E. coli*. В пробы инфицированной воды вводили пероксид водорода в малых концентрациях. Полученные результаты показали, что чем больше концентрация пероксида водорода,

тем меньше требуется времени экспозиции для полной инактивации санитарно-показательных микроорганизмов, т.е. при концентрации пероксида водорода 0,7 г/л полная инактивация достигается при времени экспозиции 120 мин, а при 1,0 г/л - через 60 мин[15].

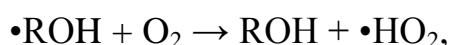
Поскольку микробиологическими показателями санитарного состояния сточных вод являются общие кишечные (ОКБ) и термотолерантные кишечные бактерии (ТКБ), то второй серией опытов являлось изучение бактерицидной активности пероксида водорода в различных концентрациях в отношении вышеуказанных микроорганизмов. Во втором случае в сточную воду, отобранныю после биологических прудов, вносили раствор пероксида водорода в больших концентрациях по сравнению с первой серией опытов. Результаты исследований показали, что полная инактивация микроорганизмов во всех пробах достигается через 2 часа, достигнутый эффект во всех пробах сточных вод сохраняется в течение 2 суток, снижение дозы реагента может быть достигнуто за счет увеличения времени экспозиции.

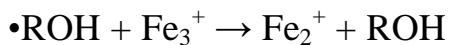
Еще одним примером эффективного использования пероксида водорода может служить работа, проведенная Ю. Водяницким, по очистке почв и почвенно-грунтовых вод от углеводородов [16].

В настоящее время, наиболее известный источник кислорода, используемый для очистки грунтовых вод от углеводородов, – пероксид водорода. Эффективность пероксида водорода как окислителя органических химических загрязнителей сильно возрастает, когда его окисление катализируют с помощью Fe^{2+} . Этот процесс назван реакцией Фентона, которая объясняет взаимодействие пероксида водорода с ионами железа, когда образуются $\cdot\text{OH}$ радикалы, атакующие органические соединения. Реакция может записываться так:



Для того, чтобы реакция прошла в такой форме, активности $\text{Fe}^{2+} < 10^{-2}\text{M}$. При повышенной активности Fe^{2+} свободные радикалы не образуются. Взаимодействие радикала гидроксида с углеводородами группы ВTEX (англоязычная аббревиатура ароматических углеводородов, входящих в состав бензина: бензол, толуол, этилбензол, ксилол) ВTEX, обозначаемые символом R, записываются как [17]:





Таким образом, вновь образуется двухвалентное железо, способное прореагировать с новой дозой пероксида водорода. Поэтому модифицированная реакция Фентона представляет собой взаимодействие пероксида водорода с Fe^{3+} . Сначала реакцию Фентона применяли для очистки стоков от ароматических углеводородов на предприятиях, затем стали использовать для деструкции органических химических загрязнителей в почвах. Реакцию Фентона применяют также для очистки почв, загрязненных разными фракциями нефти: дизельным топливом, керосином и бензином [17].

Исследование бактерицидной и спорицидной активности перекиси водорода провел ученый из научного химического общества Чехира[18].

Чтобы определить бактерицидную активность перекиси водорода, был приготовлен раствор Рингера, поддерживаемый требуемый pH цитратно-фосфатным буфером. В раствор добавляли культуру бактерий и с различными временными интервалами асептически переносили 1 мл приготовленного разведения в 10 мл питательной среды, содержащей перекись водорода. Затем инкубировали в течение 3 дней, после чего среду исследовали на предмет признаков роста. Этот же самый опыт был проведен в отношении дрожжевых культур[18].

Спороцидное действие определяли с использованием бактериальных спор, высущенных на носителях, которые представляли собой кольца из нержавеющей стали. Их очищали перед использованием, промывая Triton X-100 (BDH Chemicals). Затем культуру спорообразующих бактерий встряхивали со стеклянными шариками, далее носители помещали 10 мл объем бактериальной культуры и оставляли стоять в течение 15 мин. Затем носители удаляли из суспензии и сушили над хлоридом кальция. Затем носители переносили асептически в отдельные пробирки, содержащие 10 мл питательного бульона. Среды инкубировали в течение 21 дня при 37 ° С перед проверкой[18].

Таким образом, было обнаружено, что длительное или многократное воздействие перекиси водорода может привести к появлению клеток, способных (из-за повышенной активности каталазы) к активному росту в присутствии пероксида водорода. Также было показано, что эффективность перекиси водорода против штамма *Saccharomyces cerevisiae* уменьшается с увеличением pH. Дрожжи, подвергшиеся неоднократно воздействию сублетальных концентраций перекиси водорода, не проявляли большой разницы в их сопротивляемости к биоциду[18].

1.2.2 Применение бензоил пероксида

Бензоил пероксид(Benzoylperoxide) или перекись бензоила является современным средством, используемым в косметологии и дерматологии главным образом для лечения угревой сыпи и акне (рис. 2). Входит в состав в состав различных мазей, гелей, эмульсий : Продерм (“ А. Драг Компани”, США) - 10% крем в тубах, Окси 5 и Окси 10 (“Смит КляйнБичем”Великобритания) - 5% и 10% лосьон и др [19].

Перекись бензоила обладает подсушивающим, кератолитическим и бактериостатическими свойствами. При использовании бензоил пероксид распадается на бензойную кислоту и различные формы активного кислорода, который подавляет размножение *Propionibacterium acnes*, стимулирует пролиферацию кожного эпителия, уменьшает продукцию сальных желез. К бензоил пероксиду не развивается устойчивость, в отличие от антибиотиков,

Лечебное средство наносят на очищенную кожу 2 - 3 раза в день, курс лечения от 1 до 3 месяцев. Лечение заболеваний на лице начинают с нанесения препарата более низкой концентрации, затем повышая ее [19].



Рисунок 2 – Кожа после недельного применения препарата «Базирон АС»

Побочные действия включают реакцию обострения в первые дни нанесения, сухость и шелушение кожи, обесцвечивание белья и волос при

попадании на них препарата, также рекомендуется избегать воздействия солнечных лучей, не применять ультрафиолетовое облучение.

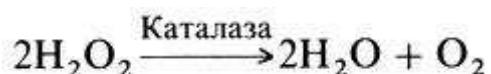
Положительный эффект, особенно при наличии комедонов, оказывает в сочетании местного применения утром препарата с перекисью бензоила, вечером - ретиноевой мази [19].

1.3 Механизм деградации пероксида водорода в клетке

Одним из основных механизмов клетки, защищающих ее от воздействия пероксида водорода является ферментативный комплекс представленный каталазой, пероксидазой и другими ферментами.

1.3.1 Характеристика каталазы

Каталаза – гемсодержащий фермент, принадлежащий к классу оксидоредуктаз (КФ 1.11.1.6), катализирующий реакцию распада пероксида водорода на молекулярный кислород и воду. Биологическая роль H_2O_2 заключается в разрушении перекиси водорода, образующегося в клетках в результате действия ряда флавопротеиновых оксидаз, таких как глюкозооксидазы, ксантинооксидазы, моноаминоксидазы и пр. Присутствие каталазы обеспечивает эффективную защиту структур клетки от деградации под действием пероксида водорода [20].



В клетках каталаза локализуется в органеллах — пероксисомах.

Каталитический распад пероксида водорода в присутствии растительных и животных тканей или их гомогенатов впервые наблюдал Тенар (L. J. Thenard, 1818). Позднее Шенбейн (Ch. F. Schonbein, 1863). Он описал процесс разложения перекиси водорода живыми тканями действием фермента, который и был выделен в 1901 г., назвавшим его каталазой [20].

Каталаза широко распространена в микроорганизмах, тканях животных и растений. Содержание каталазы в печени и эритроцитах млекопитающих составляет 0,1—0,2%, в некоторых штаммах микроорганизмов — до 5% сухой массы. Каталаза полностью отсутствует у некоторых анаэробных микроорганизмов. В растениях каталаза присутствует в небольших

количествоах. Генетически обусловленная недостаточность каталазы у человека является одной из причин наследственного заболевания,

Каталаза разлагает перекись водорода с очень высокой скоростью. При pH 7,0 и температуре 20°C одна молекула каталазы разлагает до 105 молекул H₂O₂ в секунду. Оптимальное значение pH для каталазы лежит в промежутке 6,0—8,0 [20].

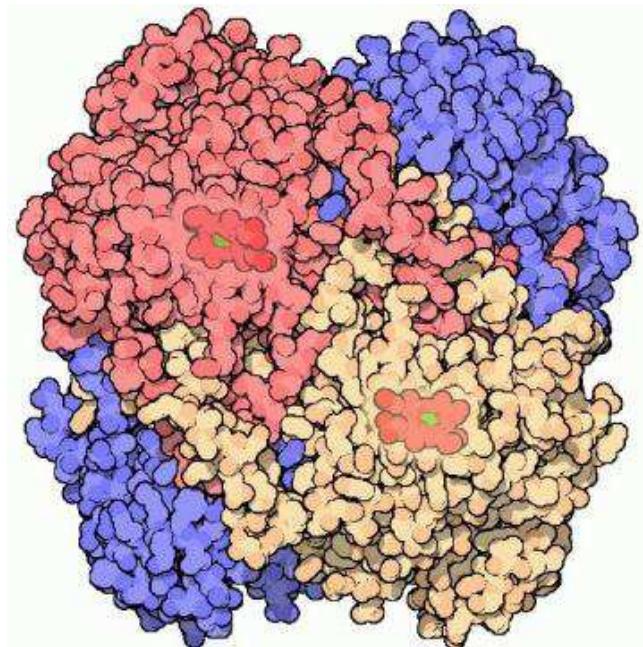


Рисунок 4 - 3D модель каталазы

1.4 Предпосевная обработка семян перекисью водорода

К числу основных факторов, определяющих величину и качество урожая, относятся семена. Они являются носителем хозяйствственно-биологической характеристики, от их качества зависит продуктивность растений. Улучшение посевных качеств семян по своему значению может быть равноцено таким проблемам, как подготовка почвы и создание пищевого режима для растений, является важным резервом повышения урожайности[21, 22, 23].

Одним из факторов повышающих посевые качества семян является предпосевная подготовка посевного материала. Обработка семян растворами биологически активных веществ приводит к усилинию ростовых процессов и повышению продуктивности растений, устойчивости к болезням грибного,

бактериального и вирусного происхождения, а также к неблагоприятным факторам внешней среды [24,25].

Наиболее высокий стимулирующий эффект биологически активных веществ достигается при их применении в начальные периоды роста растений в условиях, которые обеспечивают активный обмен в растении, его оптимальное питание, интенсивности освещения, влажности и температуры [26,27].

В 60-х годах XX века перекись водорода широко использовалась в качестве стимулятора всхожести семян и дезинфицирующего средства. По данным[28], пероксид водорода по сравнению с другими окислителями эффективно выводит семена риса из состояния покоя. Таким образом, был сделан вывод, что водный раствор пероксида водорода оказывает благоприятное воздействие на всхожесть семян.

Выдерживание семян сахарной свеклы в течение суток в 3% растворе пероксида водорода повысило их всхожесть и скорость развития проростков [29]. Было установлено, что прорастание семян табака сильно ускоряется после их замачивания в течение 5-10 ч в 0,5% растворе пероксида водорода [30]. Суточное замачивание семян пшеницы с низкой жизнеспособностью в растворе пероксида водорода повышало их всхожесть и скорость роста проростков [31].

В настоящее время пероксид водорода используется для предпосевной обработки семян намного реже несмотря на то, что это очень доступное и экологически безопасное средство, применение которого может быть впечатляюще эффективным[32].

В подтверждение обратимся к работе научного сотрудника Воронежского государственного университета. Было исследовано влияние пероксида водорода на прорастание семян, рост и развитие проростков цветочных культур.

По результатам полученных данных установлено, что предпосевная обработка семян бархатцев *Tagetes patula* и шалфея блестящего *Salvia splendens* 3% раствором пероксида водорода способствует повышению их всхожести, ускорению роста посевых объектов и их устойчивости к мицелиальным грибам[33].

Также исследование по обработке семян моркови было проведено в Тюменской государственной сельскохозяйственной академии. Наибольшее количество незараженных семян - 84 % было выявлено при их обработке 10% раствором перекиси водорода.

При обработке семян и их проростков лучшее влияние оказала

перекись водорода в концентрации 0,1 % , при обработке только растений – она же в концентрации 0,6 % [33].

Команда ученых из Воронежского государственного университета исследовала влияние предпосевной обработки семян растворами пероксида водорода и перманганата калия на их всхожесть, рост сеянцев и среднюю массу плода *Lycopersicum esculentum*. Установлено, что повышение всхожести семян, увеличение средней массы плода, устойчивости к неблагоприятным погодным условиям и заболеваниям, активизации роста сеянцев. При использовании раствора перекиси водорода высота сеянцев увеличивается в большей степени, чем при применении традиционного коммерческого препарата «Эпин-экстра». Предпосевная обработка семян перекисью водорода достаточно эффективна для ускорения роста сеянцев и снижения их заболеваемости. Применение перекиси водорода больше способствует увеличению всхожести семян, чем предпосевная обработка раствором перманганата калия. Эффект повышения всхожести семян наиболее выражен при совместной их обработке растворами перекиси водорода и перманганата калия [33,34].

1.5 Контролируемые (адресные) системы доставки веществ

В настоящее время под адресной доставкой лекарств подразумевают транспорт молекул активного вещества к мишени с помощью управляемых носителей, например, ими могут выступать другие молекулы или частицы (сфераы) [35].

Частицы (сфераы) представляют собой полимерные матрицы с заключенным в них активным веществом, которое высвобождается с течением определенного времени.

Направленная доставка позволяет контролировать концентрацию вводимого вещества и минимизировать его воздействие на окружающие клетки, ткани [35].

Также появляется возможность управления высвобождением лекарства из частиц. Видно, что главным условием выхода препарата является размер сфер (частиц). Большие по размеру сферы имеют тенденцию высвобождать заключенные в нее компоненты более медленно, дольше, чем меньшие по размеру сферы. Это было обусловлено уменьшением в отношении поверхностной области к объему с увеличивающимся размером частицы[35].

Способность сделать систему доставки вещества с необходимой концентрацией высвобождения может быть достигнута, смешивая сферы с различными свойствами. Например, если смешать частицы, полимеры которых имеют разные молекулярные массы, то полимер с низкой молекулярной массой приведет к образованию пористых микросфер, которые высвободят активное вещество быстро. Однако частицы полимера с высокой молекулярной массой получаются более плотными и производят более медленное высвобождения активного вещества. Таким образом, комбинируя сферы разных размеров из полимеров разной молекулярной массы, норма освобождения может быть смоделирована, и она будет являться комбинацией норм освобождения этих систем. Однако, микроинкапсуляция может привести к снижению биологической активности вещества, следовательно, должно производить контроль полимерного покрытия. Если слой полимера будет являться слишком толстым, вещество будет не способно пересечь границу и не станет доступным для мишени. Следовательно, активное вещество не будет поглощено и не выполнит необходимую функцию[35].

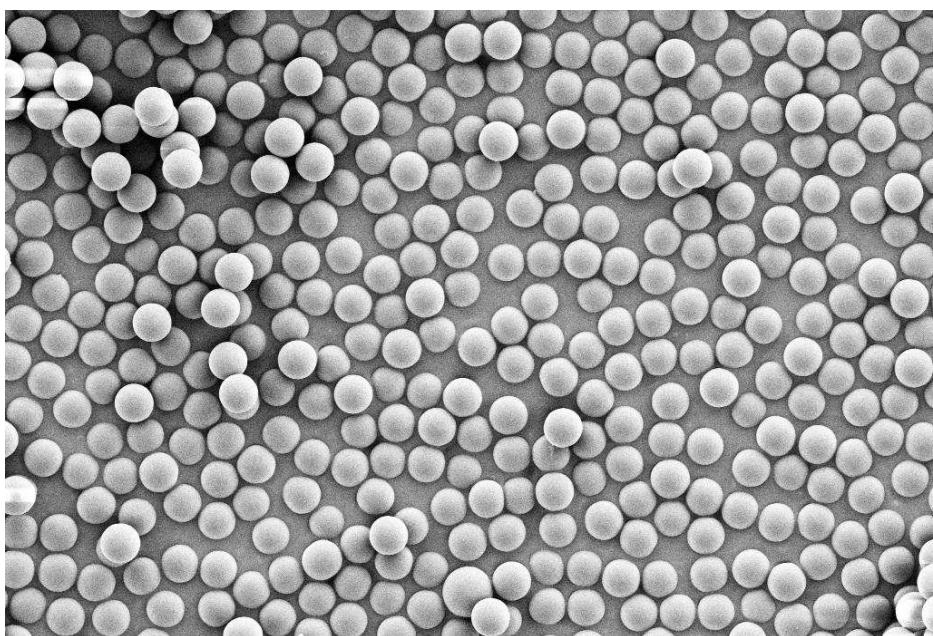


Рисунок 3 – Полимерные микрочастицы размером 2 нм

2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

В работе было исследовано действие пероксида водорода на рост сапротрофных бактерий и мицелиальных грибов, выделенных из разных объектов.

Объектами исследования в данной работе были микроорганизмы, выделенные из воздуха учебных помещений СФУ, полевой почвы, из семян и проростков пшеницы, углеводородокисляющие бактерии, а также *E.coli* и *Staphylococcus aureus*.

Всего было выделено 27 изолятов микроорганизмов, в том числе из воздуха 10 изолятов, из почвы - 9, из семян и проростков - 8 изолятов бактерий. 8 определенных до вида штаммов углеводородокисляющих бактерий (были взяты из музея кафедры), условно патогенные микроорганизмы – 2 (были взяты из музея кафедры), с проростков пшеницы было выделено 3 изолятами мицелиальных грибов.

2.2 Методы выделения микроорганизмов

2.1.1 Выделение микроорганизмов из воздуха

В работе был использован метод посева микроорганизмов на агаризованную питательную среду [36]. Для этого десять стерильных чашек Петри с питательным агаром (NutrientAgar, HiMedia) были расставлены в помещениях с разной посещаемостью и активностью людей, местами посева были выбраны столовая Сибирского федерального университета, аудитории кафедры водных и наземных экосистем, базовой кафедры биотехнологии, микробиологическая лаборатория, а также общее помещение для отдыха студентов. Чашки экспонировали 40 минут в открытом состоянии, после чего закрывали и инкубировали в течение трех суток в термостате при 30 °С. Чистые культуры были получены методом истощающего посева на питательный агар до получения изолированных колоний, и так же инкубировались в термостате при температуре 30 ° [36].

2.1.2 Выделение микроорганизмов из почвы

Почвенные микроорганизмы были выделены методом серийных разведений. Была приготовлена суспензия. Для этого взвесили 3 г образца

почвы и перемешали в 100мл дистиллированной воды, затем стерильной микропипеткой добавили 200 мкл супензии в предварительно простерилизованную пробирку с 15 мл водопроводной воды, получив таким образом разведение 10^{-1} . Далее тщательно пропипетировали новый раствор полученную супензию и, не меняя наконечника, забрали переносили 200 мкл и добавили в следующую пробирку со стерильной дистиллированной водой. Посев производили из разведений 10^{-2} - 10^{-4} на чашки Петри с питательным агаром, нанося по 150 мкл супензии на чашку. Супензия была распределена стерильным стеклянным шпателем для получения изолированных колоний. Далее чашки инкубировали в термостате при температуре 30°C до получения видимых колоний [36].

2.1.2 Выделение микроорганизмов из семян и проростков пшеницы

Для выделения микроорганизмов из семян и проростков пшеницы семена пшеницы проращивали во влажных камерах и на питательных средах по ГОСТ 12044-93 (рис. 6) [37].



Рисунок 6 – Проростки семян пшеницы

Семена предварительно промывали водопроводной водой и дезинфицировали 96 %-ным спиртом в течение 1-2 мин. Затем семена промывали в стерильной воде и раскладывали в чашки Петри для проращивания. Для этого в 10 стерильных чашек Петри с предварительно заготовленной в них 2-слойной фильтровальной бумагой, увлажненной до полной влагоемкости стерильной водой, были разложены семена пшеницы, по 5 штук в каждую чашку на расстоянии 2-3 см друг от друга. Закрытые

чашки Петри помещали в термостат при температуре 21-22 °С. После прорастания семян (7 суток) были отобраны чашки с проростками, зараженными бактериальными культурами, которые были отсеяны в чашки Петри на питательный агар (в 2-х повторностях) с последующим инкубированием в термостате при температуре 30 °С в течение трех дней для получения чистых культур.

После получения изолированных бактериальных колоний из воздуха, почвы и семян пшеницы, были выделены чистые культуры бактерий, которые хранили в пробирках на скошенном питательном агаре.

2.3 Конструирование микрочастиц эмульсионным методом

Для конструирования микрочастиц использовали эмульсионный метод (рис. 7). Для этого в вытяжном шкафу формировали 2% раствор ПЗГБ (200 мг в 10 мл дихлорметана). Для получения двухкомпонентной эмульсии полученный раствор постепенно вливали в 1% раствор поливинилового спирта (M_w 30-50 кДа, Sigma-Aldrich, США) (1 г в 100 мл дистиллированной воды). Для формирования микро размерных систем осуществляли перемешивание эмульсии с применением магнитной мешалки MRHei-Standart при 750-об/мин (Heidolph, Германия), постепенно добавляя 15 мл перекиси водорода H_2O_2 36% (20 г активного вещества), и оставляли на сутки при постоянном механическом перемешивании до полного испарения растворителя (в узком стакане на 300 мл со средним магнитом).



Рисунок 7 – Частицы, полученные эмульсионным методом из ПЗГБ

Далее раствор с частицами разливали в пробирки Eppendorf на 50 мл и уравновешивали на весах, добавляя при этом дистиллированную воду. Микрочастицы собирали центрифугированием на центрифуге Centrifuge

5810 R, 5417 R(Eppendorf, Германия; 10000 об/мин, 10 мин), с помощью дозатора сливали раствор, оставляя на дне осадок, пипетировали его и разливали в пробирки Eppendorf на 2,5 мл с последующим центрифугированием (Eppendorf). Повторяли процедуру 3-4 раза. После каждого центрифугирования дозатором убирали лишнюю жидкость, добавляя дистиллированную воду и встряхивали. В конце убирали лишнюю жидкость дозатором и поставили открытые пробирки с частицами в штатив в сушильный шкаф на 2 суток.

2.4 Методы определения чувствительности микроорганизмов к пероксиду водорода

2.4.1 Метод определения чувствительности микроорганизмов с помощью жидкого пероксида водорода

Определение чувствительности микроорганизмов к пероксиду водорода проводили методом лунок на плотной питательной среде (питательном агаре) в чашках Петри. Для этого были приготовлены суспензии каждого изолята бактерий в пробирках со стерильной водой (по 10 мл в каждой пробирке). Посев бактериальной суспензии на чашки с питательным агаром проводили с помощью стерильных ватных тампонов штихом в трёх направлениях, поворачивая чашку Петри. После засева в центре чашки металлическим цилиндром вырезали лунку диаметром 1 см в питательной среде, затем в каждую лунку вносили по 150 мкл пероксида водорода (H_2O_2) в концентрации 3%.

Чашки с инкубировали в термостате при 30°C. Анализ чувствительности микроорганизмов проводили на 1-е и 3-и сутки инкубирования, измеряя диаметр зоны отсутствия роста бактерий вокруг лунок. По истечении первого и третьего дней все образцы были зафиксированы с помощью фото съемки.

2.4.2 Метод определения чувствительности микроорганизмов с помощью частиц

Определение чувствительности микроорганизмов к пероксиду водорода, депонированного в микрочастицы проводили методом лунок на плотной питательной среде (питательном агаре) в чашках Петри. Засев микроорганизмов на чашки проводили согласно вышеописанной методике. В

сформированные лунки вносили по 0,011 мг частиц, предварительно продезинфицированных под ультрафиолетом в течение 15 мин.

Чашки с инкубировали в термостате при 30 °С. Анализ чувствительности микроорганизмов проводили на 1-е и 3-и сутки инкубирования, измеряя диаметр зоны отсутствия роста бактерий вокруг лунок. По истечении первого и третьего дней все образцы были зафиксированы с помощью фото съемки.

2.5 Метод обработки семян пшеницы пероксидом водорода

Обработку семян пшеницы проводили пероксидом водорода в концентрациях 3%, 6% и 9%, полученным методом серийных разведений из 36% пероксида водорода.

В стерильных чашках Петри выдерживали семена пшеницы в 40 мл перекиси водорода в концентрациях 3%, 6% и 9% в течение 1 мин. Затем семена промывали стерильной водой в трех повторностях, после чего семена были асептически перенесены на среду Сабуро, предварительно залитую в чашки Петри.

В качестве контроля использовали стерильную воду. Семена трижды промывались, затем были стерильно перенесены на среду Сабуро, предварительно залитую в чашки Петри.

Чашки инкубировали в термостате при 21°C. Анализ прорастания и зараженности семян проводили на 2-е и 3-е сутки инкубирования подсчетом количества проросших семян и мицелиальных грибов. При анализе все образцы были зафиксированы с помощью фото съемки (рис. 8) [38].



Рисунок 8 – Прорастание семян, обработанных 3% пероксидом водорода на 2-е и 3-е сутки инкубирования

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

Изъято 9 страниц

ВЫВОДЫ

1. Из разных экотопов в чистую культуру выделено 33изолятамикроорганизмов, в том числе: из воздуха аудиторий ИФБиБТ – 10 изолятов бактерий, из почвы –9 изолятов бактерий, из семян и проростков пшеницы –8изолятов бактерий и близолятовмикромицетов. Большинство выделенныххизолятов (91%) были чувствительны к пероксиду водорода в первые сутки наблюдения, отмечена тенденция к снижению чувствительности на 3-и сутки экспозиции.
2. Бактерии, выделенные из воздуха, в 80% случаев проявляли высокую чувствительность к пероксиду водорода; зона отсутствия роста составляла от 25 до 90 мм.
3. Все изоляты почвенных бактерий в первые сутки показали высокую чувствительность к пероксиду водорода, однако на 3-и сутки 40% изолятов из чистой почвы и 23%изолятов из нефтезагрязненной почвы потеряли чувствительность.
4. Все изолятымициальныx грибов, выделенные с семян пшеницы, проявляли чувствительность к пероксиду водорода, диаметр зоны отсутствия роста составлял от 15 до 70 мм; 38 % изолятовэндофитных бактерий были устойчивы к пероксиду водорода в течение 3-х суток экспозиции.
5. Обработка семян 3% раствором пероксида водорода не снижает всхожесть семян и наиболее эффективна для их обеззараживания.
6. При депонировании пероксида водорода в микрочастицы из П(ЗГБ) антибактериальной активности обнаружено не было.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Волова, Т. Г. Введение в биотехнологию : электрон.учеб. пособие / Т. Г. Волова –Красноярск: СФУ, 2008. С.
2. Кнунянц И. Л. и др. т. 3 Мед-Пол // Химическая энциклопедия. — М.: Большая российская энциклопедия, 1992. — 639 с. — 50 000 экз.
3. Академик- словарь [Электронный ресурс] : Органические пероксиды. – Режим доступа: https://normative_reference_dictionary.academic.ru/46126/
4. Энциклопедия по охране и безопасности труда [Электронный ресурс] : ПЕРОКСИДЫ, ОРГАНИЧЕСКИЕ И НЕОРГАНИЧЕСКИЕ. – Режим доступа: <http://base.safework.ru/iloenc?print&nd=857300061>
5. Карапетьянц М. Х., Дракин С. И. Общая и неорганическая химия. Учебник для вузов. - 4-е изд., стер. - Москва: Химия, 2000. - 592 с.
6. Потапченко Н.Г., В.В. Илляшенко, В.Н. Косинова (и др.). Химия и технология воды. – 1994. – Т. 16. - № 2. – С. 203 – 209.
7. Третьяков Ю.Д. Неорганическая химия в 3 т. под ред. Ю.Д. Третьякова Т.3 :химия переходных элементов. Кн.1 : учебник для студ. высш. заведений / [А.А. Дроздов, В.П. Зломанов, Г.Н. Мазо, Ф.М. Спиридовон]. – Издательский центр «Академия», 2000. – 352 с.
8. Энциклопедии, словари, справочники[Электронный ресурс] : ПЕРГИДОЛЬ. - Режим доступа:
9. Электронная библиотека [Электронный ресурс]: Пероксид водорода. – Режим доступа https://ru.wikipedia.org/wiki/Пероксид_водорода
10. Угай Я.А., Общая и неорганическая химия : Учеб. Для вузов. 2-е изд., - Высш. шк., 2000 – 527 с.
11. Самойленко Н.И. Механизмы бактерицидного действия перекиси водорода /Н.И. Самойленко, Е.И. Васильева, И.Б. Павлова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1983. - № 2. – С. 30 – 33
12. Ахметов Н.С., Общая и неорганическая химия : Учеб. Для вузов. 4-е изд., – Издательский центр «Академия», 2001. – 734 с.
13. Дрововозова Т.И. Исследование бактерицидной активности пероксида водорода в сточных водах / Дрововозова Т.И., Паненко Н.Н., Кулакова Е.С. // МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЖУРНАЛ – 2016.- № 7-4 (49).- С. 18-21.
14. Веремеенко Е.Г. Создание штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков, эффективных в отношении патогенов человека / Е.Г. Веремеенко, Н.П. Максимова // Труды БГУ 2014, том 9, часть 1.

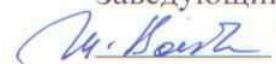
15. Силина Л.В. Топические антибиотики в терапии акне / Л.В. Силина, Е.В. Письменная, М.С. Колбина // Вестник дерматологии и венерологии 2016; (2): 115—120.
16. ВодяницкийЮ. Н. Перспективные подходы к очистке почв и почвенно-грунтовых вод от углеводородов /Ю. Н. Водяницкий, С. Я. Трофимов, С. А. Шоба // Журнал: ПОЧВОВЕДЕНИЕ – 2016.- № 6. – С. 755-764.
17. АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук [Электронный ресурс] :РЕАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА. -Режим доступа: <http://vak1.ed.gov.ru/common/img/uploaded/files/vak/announcements/himich/2009/16-02/TerentevAO.pdf>
18. BaldryM .G. C. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid / Research and Development Department, Interrox Chemicals Limited, Moorfeld Road, Widnes, Cheshire WA8 OJU UK // Journal of Applied Bacteriology.- 1983.- № 54.- P. 417-423
19. Альбанова, В. И., Сазыкина, Л. Н. ЛЕЧЕНИЕ УГРЕЙ // В Сб. Ретиноиды.ФНППРетиноиды, Москва 1998 с. 18-24.
20. Большая электронная библиотека [Электронный ресурс] : Катализ – Режим доступа: <https://xn--90aw5c.xn--c1avg/index.php/%D0%9A%D0%90%D0%A2%D0%90%D0%9B%D0%90%D0%97%D0%90>
21. Овчаров К.Е. Физиологические основы всхожести семян. М., 1969. 280 с.
22. Максимов Н.А. Краткий курс физиологии растений. М., 1958. 559 с.
23. Воронина, Л.П. Экологические функции комплекса агрохимических средств и регуляторов роста растений в агроценозе: автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра биол. наук / Л.П. Воронина. – М., 2008. – 46 с.
24. Кунавин Г.А. Обработка семян томата раствором перекиси водорода//Проблемы науки и производства в условиях аграрной реформы - Новосибирск. 1993. С. 15-17.
25. Овощные культуры в Сибири. / Е.Г. Гринберг, В.Н.Губко, Э.Ф. Витченко, Т.Н. Мелешкина. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. 400 с.
26. КунавинГ.А, Дронов Н. В. Повышение посевных качеств семян овощных культур / Г.А Кунавин // журнал : Агропродовольственная политика России / Уральский научно-исследовательский институт экономической и продовольственной безопасности - Тюмень: 2014 С. 27-30

27. Марковская Е.Ф., Сысоева М.И. Феномен ежесуточного кратковременного влияния низких закаливающих температур на жизнедеятельность растения // Онтогенез. 2008. Т. 35, № 5. С. 323-332.
28. Roberts E.H. The distribution of oxidation-reduction enzymes and the effects of respiratory inhibitors and oxidising agents in dormancy in rice seed// Physiol. plantarum. 1964. V. 1, # 17. P. 14-29
29. Селевцев В.Ф., Шаломов П.И., Кортавин В.В. Влияние намачивания семян в растворе перекиси водорода на урожай сахарной свеклы // Труды Свердловского СХИ. 1965. № 14. С. 55-57.
30. Баранова, Т.В., Калаев, В. Н., Воронин, А.А. Экологически безопасные стимуляторы роста для предпосевной обработки семян / журнал: Вестник Балтийского федерального университета им. и. Канта; 2014. С. 96-102.
31. Roman T., Michlewska Cz. Dalsze badania nad wpeywem niektórych związków chemii cznych na kielkowanie nasion tytoniu // Biul. Centr. Lab. Przem. Tyton. 1964. Р. 13-19.
32. Авдеенко С.С. Особенности применения регуляторов роста на зеленных культурах / С.С. Авдеенко // Сборник научных трудов по овощеводству и бахчеводству. – М.: ВНИИО, 2006. – С. 22-26.
33. Баранова, Т.В. Влияние предпосевной обработки семян перекисью водорода на всхожесть и развитие сеянцев цветочных культур / Т.В.Баранова // журнал: Гавриш / Научно-исследовательский институт овощеводства защищенного грунта – Москва ;2014. С. 26-28
34. Овчинникова Т.А. О возможности индикации очищения почвы после разовых фенольных загрязнений // Интродукция, акклиматизация, охрана и использование растений: межвуз. сб. – Куйбышев, 1990. – С. 138–141.
35. Новая химия [Электронный ресурс] : Полимерные системы доставки лекарств. - Режим доступа: https://www.newchemistry.ru/printletter.php?n_id=6794
36. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук. - Москва: Академия, 2005. - 608 с.
37. ГОСТ 12044-93. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями. Взамен ГОСТ 12044-81; введ. 01.01.1995. – Москва: Стандартинформ, 1995. – 58 с.
38. Наумова Н.А. Анализ семян на грибную и бактериальную инфекцию. – Л.: Колос, 1970. – 205 с.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Т.Г. Волова
« 5 » июня 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01. Биология

код – наименование направления

Влияние пероксидов на микроорганизмы in vitro
тема

Научный руководитель


3.04.19

проф. д.б.н.

С.В. Прудникова

Выпускник



П.А. Тимошенко

Красноярск 2019