

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_  
подпись инициалы, фамилия  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01 Биология

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

**Антимикробное действие пероксида водорода на микрофлору объектов  
внешней среды**

Руководитель	_____	профессор, д.б.н.	С. В. Прудникова
Выпускник	_____		В.А. Морозова
Рецензент	_____	доцент, к. б. н.	Н. О. Жила

Красноярск 2019

## Оглавление

1 Обзор литературы.....	6
1.1 Теоретические аспекты антимикробной активности пероксидов: химические и антимикробные свойства пероксидов.....	6
1.1.1 Химические и антимикробные свойства пероксидов.....	6
1.1.2 Применение пероксидов.....	15
1.2. Каталазная активность микроорганизмов как показатель биологической активности.....	23
1.2.1 Характеристика каталазы.....	23
1.2.2 Использование каталазной активности в оценке физиологической активности бактерий.....	27
2 Объекты и методы.....	31
2.1. Характеристика объекта исследования.....	31
2.2. Метод выделения микроорганизмов из воздуха.....	31
2.3. Метод выделения микроорганизмов из почвы.....	31
2.4. Метод выделения микроорганизмов из проростков пшеницы.....	34
2.5. Идентификация микроорганизмов по методике MALDI-TOF.....	35
2.6. Методы определения чувствительности к пероксиду водорода.....	36
3 Результаты.....	38
3.1 Определение чувствительности бактерий к пероксиду водорода.....	38
3.1.1 Микрофлора воздуха.....	39
3.1.2 Микрофлора почвы.....	40
3.1.3 Симбиотическая микрофлора.....	49
3.2 Определение чувствительности мицелиальных грибов к пероксиду водорода.....	56

Выводы.....	59
Список использованной литературы.....	61

## Введение

В настоящее время актуальной проблемой является распространение антибиотикорезистентных штаммов бактерий, в том числе возбудителей инфекционных заболеваний. Широкое применение антибиотических средств в сельском хозяйстве, медицине и ветеринарии обостряет эту ситуацию. В связи с этим необходим поиск новых средств и приёмов для борьбы с микроорганизмами, поэтому роль хорошо известных препаратов с антимикробным действием возрастает. Одними из таких средств являются пероксиды.

Характерная черта химической структуры пероксидов – присутствие двух молекул кислорода, соединенных простой ковалентной связью. Эта структура отличается нестабильностью. Перекиси легко распадаются на высоко реактивные свободные радикалы.

Перекись водорода применяется, как сильный окислитель и отбеливающий агент. Кроме этого перекись водорода используют в качестве стерилизующего средства различных поверхностей, семян растений, а так же в качестве дезинфицирующего средства при обработке ран. Перекись водорода является компонентом антибактериальной системы: пероксидаза – тиокиназа – гидрогеназа. В этой системе перекись проявляет эффективное действие против микроорганизмов. Антибактериальная система тормозит рост определенных бактерий и обладает противокоррозионным действием [62].

Целью данной работы являлось исследование влияния пероксида водорода на микроорганизмы, выделенные из объектов внешней среды.

Задачи:

- выделить микроорганизмы из различных природных объектов;
- провести идентификацию выделенных микроорганизмов;
- оценить действие пероксида водорода на выделенные микроорганизмы;

- провести сравнительный анализ устойчивости микроорганизмов к действию пероксидов в зависимости от условий обитания.

## **1 Обзор литературы**

### **1.1 Теоретические аспекты антимикробной активности пероксидов: химические и антимикробные свойства пероксидов**

#### **1.1.1 Химические и антимикробные свойства пероксидов**

Пероксиды или перекиси – это сложные вещества, атомы кислорода которых соединены между собой.

Пероксиды с легкостью выделяют кислород. Если речь идет о неорганических веществах, рекомендуется применять термин «пероксид», если же об органических, то и в современном русском языке зачастую используется термин «перекись». Пероксиды большого количества органических веществ являются взрывоопасными (пероксид ацетона), например, они с легкостью образуются фотохимически в условиях длительного освещения эфиров при наличии кислорода. Потому перед перегонкой большинство эфиров (тетрагидрофуран, диэтиловый эфир) предполагают проверку отсутствия пероксидов.

Пероксиды замедляют в клетке синтез белка.

В соответствии со структурой принято различать собственно пероксиды, неорганические озониды и надпероксиды [42, с. 185].

Пероксиды – это вещества, которые содержат пероксогруппу -O-O- (к примеру, пероксид натрия ( $\text{Na}_2\text{O}_2$ ), пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )). В пероксидах кислород обладает степенью окисления  $-1$ . Существуют органические и неорганические пероксиды.

Неорганические пероксиды как бинарные или комплексные соединения известны практически для каждого элемента. Пероксиды щелочноземельных и щелочных металлов вступают в реакцию с водой, образуя пероксид водорода и соответствующий гидроксид.

Органические пероксиды делятся на диалкилпероксиды, диацилпероксиды, алкилгидропероксиды, ацилгидропероксиды

(пероксокарбоновые кислоты) и циклические пероксиды [24, с. 222]. Органические пероксиды характеризуются термической неустойчивостью и часто взрывоопасностью. Используются в качестве источников свободных радикалов в промышленности и органическом синтезе (диацетилпероксид, ди-трет-бутилпероксид), окисляющих антисептиков (пероксид бензоила).

Надпероксиды (гипероксиды, надперекиси, супероксиды) – это неорганические соединения, которые содержат анион  $O_2^-$ , к примеру, надпероксид калия  $KO_2$ . Кислородные соединения, в которые входят атомы  $O$  со степенью окисления  $-1/2$ , известны для щёлочноземельных, щелочных металлов, солей тетраалкиламмония, а также ряда комплексов (к примеру, кобальта). Надпероксиды используются с целью регенерации выдыхаемой газовой смеси, например, для изолирующих противогазов.

Неорганические озониды – это соединения, которые содержат анион  $O_3^-$ , к примеру, озонид калия  $KO_3$ . Они известны для щелочноземельных, щелочных металлов, а также солей тетраалкиламмония. Весьма неустойчивы.

Органические озониды – это соединения, в цикле которых содержится группа  $-O-O-O-$ . Они обычно образуются посредством взаимодействия озона и алкенов. Циклические озониды незатрудненных алкенов почти мгновенно преобразовываются в изоозониды (которые также являются пероксидными соединениями).

Гидротриоксиды – это органические соединения, в которых содержится линейная группа  $-O-O-OH$ . Также существуют диалкилтриоксиды  $R-O-O-O-R$ , к примеру, относительно стабильный линейный бис (трифторметил) триоксид  $CF_3-O-O-O-CF_3$  [8, с. 260].

Далее представляется целесообразным несколько слов сказать о физических и химических особенностях пероксидов.

Пероксиды щелочных металлов могут являться восстановителями и окислителями. Окислительные свойства обуславливает наличие в их составе пероксидного иона  $[O_2]^{2-}$ , который способен принимать электроны.

Чаще проходят реакции, которые сопровождается разрушение связи O–O или изменение заряда иона  $O_2^{2-}$ . Можно полагать, что  $O_2^{2-}$  радикал теряет или присоединяет электроны:  $O_2^{2-} + 2 e^- = 2 O^{-2}$  – окислитель,  $O_2^{2-} - 2 e^- = O_2^-$  – восстановитель.

В первом случае пероксиды демонстрируют окислительные свойства, а во втором восстановительные. К примеру:

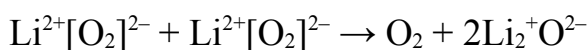


$2KMnO_4 + 5H_2O_2 + 3H_2SO_4 = 2MnSO_4 + 5O_2 + K_2SO_4 + 8H_2O$  – восстановитель.

Окислительные свойства пероксидов представлены сильнее, нежели восстановительные:



Поскольку пероксиды демонстрируют восстановительные и окислительные свойства, то в определенных условиях они подвержены реакции диспропорционирования:



Между тем, реакция диспропорционирования не проходит при обычной температуре, когда пероксид хранится в плотно закрытой емкости в сухом месте. Это объясняет то, что в водном растворе или во влажном воздухе пероксид, являясь солью слабой кислоты подвергается гидролизу, при котором образуется непрочная термически перекись водорода [2, с. 311]. Ее молекулы не находятся в равном энергетическом состоянии, и потому вступают в реакцию диспропорционирования [56].

Из пероксидов большим практическим значением обладает пероксид водорода  $H_2O_2$ .

Энергия связи O–O (210 кДж/моль) практически в 2 раза ниже энергии связи O–H (468 кДж/моль).

В связи с несимметричным распределением связей H–O молекула  $H_2O_2$  сильно полярна ( $\mu = 2,1 \text{ D}$ ). Молекулы  $H_2O_2$  вступают в довольно прочную

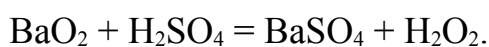
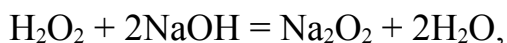


водородную связь, вызывающую их ассоциацию. Потому в стандартных условиях пероксид водорода представляет собой бледно-голубую сиропообразную жидкость (плотность 1,44) с высокой температурой кипения (150,2 °С) и хороший ионизирующий растворитель. Пероксид водорода замерзает при – 0,43 °С. Смешивается с водой в любом отношении благодаря появлению новых водородных связей. Выделяется из растворов как неустойчивый кристаллогидрат  $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (температура плавления – 52 °С). В лабораторных условиях обычно применяются 3 – и 30 %-е растворы  $\text{H}_2\text{O}_2$  (последний называется пергидроль) [16, с. 673].

В водных растворах пероксид водорода – это слабая кислота ( $K_{\text{иониз}} = 2,24 \cdot 10^{-12}$ ):



В составе химических реакций пероксид – радикал может без изменения переходить в иные соединения, к примеру:



Последняя реакция применяется с целью получения пероксида водорода.

Пероксид натрия  $\text{Na}_2\text{O}_2$  – это пероксидное соединение натрия, которое характеризует наличие молекулярного иона  $\text{O}_2^{2-}$ , содержание активного кислорода равно 20,5 вес %. Чистый натрия пероксид – это белый порошок; технический порошок обладает слабожелтой окраской, обусловленной присутствием надпероксида натрия  $\text{NaO}_2$ . Решетка  $\text{Na}_2\text{O}_2$  гексагональная (искаженная); плотность 2,60. Может существовать в 3 модификациях: Q –  $\text{Na}_2\text{O}_2$ , обладает устойчивостью при температуре жидкого воздуха,  $\text{Na}_2\text{O}_2$  (I), до  $512 \pm 1^\circ\text{C}$  и  $\text{Na}_2\text{O}_2$  (II), а также выше данной температуры. Пероксид натрия является диамагнитным.

В случае нагревания пероксида натрия при 311–400 °С можно наблюдать некоторую потерю активного кислорода, а бурное разложение наблюдается при 540 °С. Пероксид натрия плавится при температуре выше

596 °C и отдает весь активный кислород при температуре 675 °C. Растворим в воде. В процессе растворения образуются  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NaOH}$  и выделяется определенное количество кислорода, поскольку повышенная температура и щелочная среда обуславливают разложение  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Пероксид натрия вступает в реакцию разбавленными кислотами с последующим образованием пероксида водорода и соответствующих солей. Энергично реагирует с серой, кислородом, натрием, ди- и монооксидом углерода. Известны также молекулярные соединения пероксида натрия и воды (октагидрат  $\text{Na}_2\text{O}_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$ ), пероксиды водорода (дипероксигидрат  $\text{Na}_2\text{O}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}_2$ ) и воды и пероксида водорода (тетрагидрат дипероксигидрата  $\text{Na}_2\text{O}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ). С углекислым газом воздуха и влагой пероксид натрия вступает в реакцию с выделением кислорода и образованием  $\text{NaOH}$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Это является основанием для применения его с целью регенерации воздуха в закрытых помещениях.

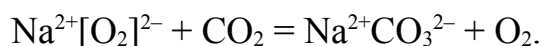
Пероксид натрия образуется в результате окисления расплавленного на противнях металлического натрия в противотоке очищенного от  $\text{CO}_2$  и высушенного воздуха либо форсуночных аппаратах. Чтобы получить высококачественный пероксид натрия рекомендуется восстановление пероксида натрия, полученного при помощи окисления металла, до окиси нагреванием при 130–200 °C с малыми порциями металлического натрия в инертной атмосфере, увлажненной водяными парами, и полученный оксид окислять до пероксида при 250–400 °C во вращающихся печах. В полученном продукте содержится 96 – 98 %  $\text{Na}_2\text{O}_2$ . Так как пероксид натрия очень агрессивен в отношении металлов, при получении его используют обычно реакторы из никелевых сплавов, которые покрыты графитом, и циркониевые мешалки.

Пероксид натрия производится в больших количествах. Применяется, прежде всего, для отбеливания льняных, шерстяных и хлопчатобумажных тканей, а также джутовых материалов. Широко используется данное химическое соединение также при отбелке древесной массы – механической

(молотой древесины), сульфитной и сульфатной пульпы, полухимической пульпы, пульпы из старой бумаги и соломы, вязкой массы и других материалов. В плотно закрытой емкости пероксид натрия не разлагается даже при длительном хранении. Емкости с пероксидом натрия должны храниться в прохладном месте, далеко от легковоспламеняющихся материалов. Пероксид натрия сам по себе не может воспламениться, однако он огнеопасен в случае соприкосновения с органическими веществами, к примеру, с маслом, деревом, бумагой или восстановителями при наличии влаги [14, с. 286].

Он используется при отбелке разнообразных материалов (шелка, костей, соломы, шерсти и пр.) и при изготовлении противогаров, подводных работ, на подводных лодках и пр [66].

В последних случаях основой использования пероксида натрия является процесс взаимодействия пероксида и двуокиси углерода:



Углекислый газ, выдыхаемый легкими, поглощается с образованием выделением газообразного кислорода. Последний может снова использоваться при дыхании [7, с. 458].

Растворы пероксида водорода широко применяются при отбеливании шерсти и тканей, перьев и соломы. Разлагая красители (пигменты), он не вызывает разрушения отбеливаемого материала. В медицине его используют как кровоостанавливающее и дезинфицирующее средство.

В почвенных и агрохимических лабораториях пероксид водорода используется с целью озонения растительного материала или образцов почвы. Концентрированный пероксид водорода в совокупности с горючими материалами используется при изготовлении взрывчатых составов.

В рамках химической практики он используется в качестве окислителя, «не пачкающего» растворы продуктами восстановления, поскольку при этом образуется лишь вода [18, с. 300], [57].

Практически применяется по большей части ВаО<sub>2</sub> (с целью получения Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, в пиротехнике, в органическом синтезе, при покрытии термоионных катодов). Реже применяется пероксид кальция (вулканизация бутилкаучука, хлебопечение), пероксид стронция (пиротехника), гидратные формы пероксидов цинка и магния (медицина) [39, с. 599].

Далее необходимо остановиться на такой биологической роли пероксидов, как их антимикробные свойства. Это целесообразно сделать на примере пероксида водорода, так как он получил весьма широкое применение в качестве антимикробного средства.

Роль пероксидов в рамках биологических процессов на примере биологического окисления была отмечена А. Н. Бахом еще в 1897 г., когда он написал, что в животном организме кислорода может активироваться посредством перекисей, являющихся постоянным фактором любого процесса медленного окисления, какой бы ни являлась природа окисляющего тела [Цит. по: 28, с. 188].

Дыхание и окисление является основным источником энергии живого организма. В данном процессе, в качестве конечного результата которого выступает преобразование органических компонентов в Н<sub>2</sub>О и СО<sub>2</sub>, участвуют некоторые формы активного кислорода, например, супероксид-анион О<sup>-</sup>, NO, гидроксил HO, НООН и др., а не органические пероксиды. Такой полезный путь для утилизации кислорода обуславливает накопление энергии и возникновение разности электрохимических потенциалов ионов Н на мембранах (Ам-Н<sup>+</sup>), образование аденозинтри- и аденозиндифосфатов. В то же время, кислород через эти активные формы приводит к повреждениям ДНК и иных молекул организма [25, с. 107].

Супероксидный радикал, убисемихинон нитроксид, образуется прежде всего ферментативным путем, а также принимает участие в нормальном метаболизме в то время, как высокоактивные и, в связи с этим, неселективные гидроксильные радикалы обуславливают повреждение ДНК и липидов. Данные процессы обуславливают образование в атмосфере

нуклеиновых оснований и гидропероксидов липидов. Лучевое поражение вызывает также развитие свободнорадикальных процессов автоокисления липидов (ПОЛ) [3, с. 209].

Под воздействием радиации на нуклеиновые кислоты при наличии кислорода как первичные продукты радиационного повреждения образуются гидропероксиды нуклеиновых оснований. В качестве наиболее чувствительного и повреждаемого основания выступает тимин [12, с. 114]. В соответствии с термической стабильностью гидропероксиды нуклеиновых оснований в нейтральных водных растворах могут быть объединены в две группы [64].

В процессе распада гидропероксидов ДНК может наблюдаться интенсивное свечение, которое гасят ингибиторы радикальных процессов.

В дальнейшем было определено, что в субклеточных структурах активация ПОЛ происходит также при росте гипероксии и гипоксии, гипертермии, авитаминозах, патогенезе атеросклероза и прочих нарушениях жизнедеятельности. Пероксидные продукты ПОЛ были обнаружены и как метаболиты процессов нормальной жизнедеятельности. Пероксиды идентифицировались в липидах разных органов, тканей микроорганизмов, растений и животных [28, с. 333].

Были установлены и идентифицированы разные эндопероксидные и гидропероксидные продукты окисления жирных полиненасыщенных кислот, которые входят в состав фосфолипидов и липидов [49].

Расход и образование пероксидов осуществляются по свободнорадикальному пути и при участии ферментных систем, регулирующих скорости расхода и образования пероксидных метаболитов. В процессе генерирования в организме липопероксидов в норме принимают участие липоксигеназы, микросомальные НАДФ-зависимые оксигеназы и циклооксигеназы [41, с. 314].

Значительный вклад ферментативных процессов подтверждается и отсутствием корреляции между темпами неферментативного ПОЛ в

нативных мембранах, отлично от автоокисления в гомогенных системах и ненасыщенностью липидов. При этом концентрация пероксидов поддерживается в клеточных мембранах в норме посредством природных антиоксидантов, прежде всего токоферолов, которые регулируют свободнорадикальные процессы, и ферментов, принимающих участие в образовании и последующем преобразовании пероксидных продуктов. Пероксиды в некоторых системах являются эффекторами ферментативного ПОЛ, ингибирующими или повышающими активность ферментов.

Данное действие, которое регулирует активность ферментов, принято связывать с изменением проницаемости мембран (в случае мембраносвязанных ферментов), а также с окислением пероксидами сульфгидрильных групп ферментных белков [22, с. 89].

Пероксидазы разлагаются не только  $\text{HO}_2\text{H}$ , но и некоторыми гидропероксидами и пероксикислотами. Например, пероксидаза хрена (HRP) в данной реакции преобразуется в соединение зеленого оттенка. Как полагают различные авторы, в этом виден характер лимитирующей стадии, которая заключается в проникновении гидропероксида к активному центру через ворота с отрицательным зарядом, в связи с чем, анионы  $\text{ROO}^-$  доходят до активного центра. Увеличение числа ионов  $\text{K}^+$  обуславливает снижение концентрации диссоциированных молекул гидропероксидов, а также отражает уменьшение плотности электронов (заряд отрицательный) у кислорода, который связан с протоном [1, с. 43], [54].

Биолюминесценция морских организмов, холодное свечение светлячков и прочих организмов связывается с промежуточным формированием  $\alpha$ -пероксилактонов, и их распад, как и прочих диоксетанов, сопровождается хемилюминесценцией [20, с. 104].

Токсичность пероксидных соединений принято связывать с окислительным их действием. Биохимический механизм действия органических пероксидов одновременно с влиянием на ПОЛ также включает окислительное воздействие на  $\gamma$ -группы глутатиона и белков [31, с. 299].

На уровень фитотоксичности органических пероксидов в значительной степени влияет способ обработки растений. Известно также о поражении смоговой атмосферой, которая содержит пероксинитраты, плантаций диких и культурных растений [38, с. 17].

Обработка растений водным раствором гидропероксида, как полагают Грибова и Антоновский, приводит к подавлению электронного транспорта в хлоропластах и угнетению роста проростков пшеницы лишь при концентрациях –  $10^{-10}$  М и более, то есть пероксид действует намного слабее обычных гербицидов [32, с. 504].

Одновременно с этим ингибирующее воздействие гидропероксида бутилпербензоата на рост суспензионной и каллусной культур клеток табака можно было наблюдать как при концентрациях  $10^{-10}$  М, так и при внезапно низких значениях  $10^{-10}$  М [55].

Было обнаружено наличие мутагенного эффекта при действии на культуру *Salmonella* некоторых гидропероксидов. Данное действие в некоторых случаях носило экстремальный характер, то есть максимальный эффект был отмечен при некоторой концентрации, а меньшее и большее содержание пероксидов обуславливает снижение мутагенного эффекта. Так как токсичность химикатов как правило определяется как максимально возможные концентрации в атмосфере, растворе и пр., для пероксидов подобный метод оценки токсичности может быть неоднозначным [69].

### **1.1.2 Применение пероксидов**

Органические пероксиды шире всего применяются в химической, резиновой и пластиковой промышленности, а также в производстве пластмасс. Их используют как инициаторы свободно-радикальной полимеризации мономеров в термопластичные полимеры и в качестве средств отверждения полиэфирных смол, полиэтилена и эластомеров [21, с.

37]. Органические перекиси используют в качестве источников свободных радикалов в разнообразных органических синтезах.

К примеру, 2-бутанон пероксид выступает в качестве отвердителя армированных пластмасс и стекловолокна, и отвердителя ненасыщенных полиэфирных смол. Циклогексанон пероксид, например, используется как катализатор с целью упрочнения ряда стекловолоконных смол; отбеливатель растительных масел, муки, воска и жиров, как средство полимеризации в условиях пластиковой промышленности и как вулканизатор в условиях резиновой промышленности [24, с. 400].

Дилаурил пероксид успешно применяется в фармацевтических отраслях промышленности и косметике, и как агент выгорания ацетатных нитей. При добавлении к применению как катализатора полимеризации, трет-бутил пероксид используется для ускорения самовоспламенения легкого дизельного топлива. Бензоил пероксид используется прежде всего в рамках полимерной промышленности с целью инициирования сополимеризации и свободно-радикальной полимеризации стирола, хлористого винила, уксусного эфира винилового спирта и акрилатов. Кроме того, его используют как отвердитель силиконовых каучуков и полиэфирных смол, и для упрочнения ряда стекловолоконных смол. Бензоил пероксид в медицине применяется для обработки прыщей. Его предпочитают для отбеливания муки, растительных масел, сыров, жиров, воска и пр [10, с. 178].

Гидропероксид кумол применяется в производстве ацетона и фенолов. Перуксусная кислота – бактерицид и фунгицид, использующийся, главным образом, в условиях пищевой промышленности. Также она выступает как отбеливающее средство для бумаги, текстиля, масла, крахмала и восков, а также может быть использовано в качестве катализатора полимеризации [4, с. 200].

Пероксид водород очень широко применяется, как отбеливающий агент и окислитель. Также он применяется как реактив в рамках синтеза



химических соединений. Разные концентрации пероксида водорода используются для различных целей, например:

- 6 % и 3 % растворы применяются в косметической и фармацевтической промышленности;

- 30 % раствор при осуществлении реакций в условиях лаборатории;

- 50 % и 35 % растворы применяются в промышленности;

- 70 % раствор применяется в ряде реакций окисления органических веществ;

- 90 % раствор применяется в промышленности и в качестве ракетного топлива в космических и военных программах [42, с. 302].

Растворы концентрации выше 90 % применяются в особых военных целях.

Пероксид водорода также применяется в производстве мягчителей, глицерина, отбеливающих средств, косметики, фармацевтических препаратов, осушителей для масел, восков и жиров, и оксидов амина для домашних моющих средств. Его используют в текстильной промышленности при отбеливании текстиля, в особенности хлопка, в целлюлозно-бумажной промышленности при отбеливании древесных масс. В рамках добывающей промышленности пероксид водорода используют с целью повышения растворимости урана в щелочных растворах. Его также используют для окисления и травления металла в рамках электронной промышленности и при обработке металлических поверхностей. Помимо этого, пероксид водорода – это стерилизующее средство пищевой промышленности и применяется как источник кислорода в оборудовании, которое предохраняет дыхательную систему [19, с. 288].

Перекись водорода используется для дезинфекции с начала 20-го века. По настоящий период времени накопилось большое количество работ по ее воздействию на микробные клетки. Но следует подчеркнуть, что работы, доступные в русском переводе, не содержат информации по детальным электронно-микроскопическим исследованиям воздействия перекиси

водорода на ультраструктуру микробов. Потому, перед исследованием взаимодействия новых дезинфектантов и микроорганизмов, особый интерес представляет изучение механизма воздействия перекиси водорода на микробные клетки [36, с. 211].

Перекись водорода – прозрачная, бесцветная жидкость, имеющая специфический запах, сильный окислитель. В чистом виде это вязкая жидкость ( $d=1,45$ ), смешивается с водой в любом соотношении. Имеет выраженные бактерицидные, спороцидные, фунгицидные свойства. Выпускается в форме 30 – 90 % раствора с добавлением стабилизатора с целью предохранения от разложения. Хранится в полиэтиленовой или стеклянной емкости, закрытой пробкой с отверстием для выхода газа, при температуре не выше 30 °С. Раствор перекиси водорода входит в 3 класс опасности в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 (умеренно опасные вещества) Рабочие растворы являются неустойчивыми и готовятся перед непосредственным использованием [23, с. 171].

Воздействие перекиси водорода на бактерии целесообразнее демонстрировать на примере *Escherichia coli*, штамм К-12.

Для исследования воздействия перекиси водорода на структуру бактерий *E. coli* использовалась 18-часовая культура, выращенная на МПБ при 37 °С. К суспензии концентрацией  $2 \times 10^8$  кл/мл добавляли перекись водорода до достижения концентрации 1,5 %, и инкубировали на протяжении течения 15 – 60 мин при комнатной температуре. После действия дезинфектанта на микроорганизмы перекись водорода нейтрализовывалась посредством введения в суспензию гипосульфита концентрацией 1 %. Часть биомассы высевалась в плотную питательную среду для установления доли живых клеток в суспензии, часть суспензии же использовалась при проведении электронно-микроскопических исследований [9, с. 613].

В ходе исследования клеток *E. coli* в электронном микроскопе до действия препарата было установлено, что микробная популяция включает

около 93% клеток интактной ультраструктуры, другие микробы находятся на разных этапах естественного повреждения, старения и гибели.

В условиях кратковременного воздействия 1,5 % перекиси водорода на клетки *E. coli* на протяжении 15 мин почти 80 % микробной популяции получает разные необратимые и обратимые повреждения. Почти 10 % клеток обладает интактной ультраструктурой. Около 5 % клеток плазмолизированы, т.е. наблюдается полное или локальное отслоение оболочки клетки от цитоплазматической мембраны (ЦПМ). У 10 – 15 % микробов имеют место разрывы либо разрушение ЦПМ. Вероятно, перекись водорода первоначально действует на ЦПМ, расширяя периплазматическое пространство и/или разрушая ЦПМ. После чего в микробах наблюдаются вторичные повреждения, связанные с нарушением функций ЦПМ. Данные изменения могут проявляться в виде полной или частичной деструкции нуклеотида и/или цитоплазмы, которые на ультраструктурном уровне проявляются как фрагментация хроматина, разрушение и растворение полисом и рибосом, появление в цитоплазме и в месте нуклеотида электронно-прозрачных зон [48].

Необходимо подчеркнуть, что полученные сведения о степени повреждения ультраструктуры микроорганизмов воздействием перекиси водорода совпадают со сведениями микробиологического контроля живых микроорганизмов в образцах.

При более продолжительной обработке перекисью водорода микробной популяции (30 – 60 мин) все микробы получают необратимые или обратимые повреждения. Существенная часть клеток микроорганизмов полностью разрушена или автолизирована.

Итак, в процессе обработки микробных клеток *E. coli* 1,5 % перекисью водорода уже на ранних этапах воздействия (до 15 мин) основная часть популяции (почти 80 %) разрушается или повреждается. Первичные повреждения, которые вызывает дезинфектант, выявляемые в ходе

электронно-микроскопического исследования, происходят на уровне мембранного аппарата [60].

Для грамотрицательных бактерий первое соприкосновение клетки и молекул дезинфектанта осуществляется на поверхности наружной мембраны. Химически самыми реакционноспособными при взаимодействии с перекисью водорода являются белки, в особенности сульфгидрильные группы, а также нуклеиновые кислоты (которые отсутствуют во внешней мембране). Между тем повреждение наружной мембраны не летально для бактериальной клетки. Непрореагировавшие молекулы дезинфектанта проходят через гидрофильные поры внешней мембраны в периплазматическое пространство, в котором могут вступать в реакцию с пептидной частью муреинового каркаса и присутствующими там ферментами [50].

Повреждения данных компонентов также не заканчиваются летальным исходом. Преодолев периплазматическое пространство, перекись водорода попадает на цитоплазматическую мембрану, а ее повреждение может вызвать гибель клетки. Белками составлена значительная часть ЦПМ, они выполняют разные ферментативные и транспортные функции. С ЦПМ так же связана и система клеточной репликации. Окисление транспортных белков обуславливает нарушение барьерных функций ЦПМ и утечку компонентов ее в периплазматическое пространство, что подтверждают биохимические исследования [17, с. 200], а также дает возможность перекиси водорода попадать в клетку. Взаимодействие перекиси водорода и ферментов приводит к инаktivации последних. Последующее взаимодействие дезинфектанта и компонентов мембран, например, окисление жирнокислотных ненасыщенных компонентов липидов по двойным связям, приводит к ее деструкции. Для прошедших через ЦПМ молекул перекиси водорода открывается доступ к цитоплазматическим белкам и нуклеиновым кислотам, ДНК и РНК. Взаимодействие с ними вызывает полную гибель

клетки и видимые изменения ультраструктуры нуклеотида и цитоплазмы [46], [65].

Далее представляется целесообразным кратко охарактеризовать особенности применения отдельных пероксигидратов.

Пероксигидрат фторида калия – это кристаллический белый порошок, малогигроскопичный, хорошо растворяется в воде, полностью диссоциирует на молекулы  $H_2O_2$  и ионы K, F. В соответствии с пропорциями исходных компонентов  $H_2O_2$  и KF получают пероксигидраты фторида калия с разным содержанием перекиси водорода: для KF  $H_2O_2$  – 36,9 % для KF  $2H_2O_2$  – 53,9 % для KF  $3H_2O_2$  – 63,7 % [6, с. 301].

При отсутствии влаги пероксигидраты фторида калия стабильны на протяжении двух лет. Пероксигидраты фторида калия более перспективны в форме двух сольватов, которые содержат разное количество перекиси водорода (ПФК-1 – 28 – 35 % и ПФК-2 – 40 – 45 %) [9, с. 615].

Рабочие растворы ПФК (2,5 – 10% по перекиси водорода) стабильны на протяжении двух недель. Препарат является умеренно токсичным веществом 3 класса опасности согласно ГОСТ 12.1.007-76 при введении в желудок, при нанесении на кожу – 4 класса малоопасных веществ. Оказывает местно-раздражающее и кожно-резорбтивное действие при повторном воздействии. При попадании рабочего раствора в глаза может вызвать конъюнктивит. Сенсibiliзирующий эффект не установлен. Ингаляционное воздействие посредством орошения вызывает раздражение верхних дыхательных путей [27, с. 52].

Результаты экспериментального изучения воздействия пероксигидратов на споровые и вегетативные формы бактерий показали, что препараты ПФК-1 и ПФК-2 имеют высокую бактерицидную и спороцидную активность. Препараты очень активны при деконтаминации тест-поверхностей, обсемененных взвесями *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *B. thuringiensis*, *B. anthracoides* [15, с. 401]. Физико-химические свойства рабочих растворов пероксигидратов, низкая коррозионная

активность препаратов, высокая спороцидная и бактерицидная препаратов позволяют применять новую группу дезинфектантов в микробиологической промышленности взамен перекиси водорода [61].

Методами ультраструктурного анализа также исследовали характер воздействия сублетальных доз пероксигидратов на ультраструктуру бактериальных спор.

Электронно-микроскопический анализ спор *B. anthracis* до воздействия на них препаратом (в контроле) продемонстрировал, что большая часть споровых клеток в биомассе (83,8 % от общего пула) обладают интактной ультраструктурой, остальные же споры повреждены.

При недолгой обработке *B. anthracis* 10 %-ным раствором препарата ПФК-1 (2 мин) наблюдалось уменьшение числа интактных спор в биомассе в сравнении с контролем почти на 80 %. В популяции было обнаружено примерно 70 % спор с разрыхленной споровой оболочкой или с многочисленными разрывами ее мембран. Повреждения эти возникают как результат прямого дестабилизирующего воздействия препарата на структуру мембран споровых оболочек. В популяции возникают также споры с разрывом споровых оболочек, сердцевины и кортекса или споровые клетки со значительными деструктивными изменениями сердцевины, кортекса (9 %). Почти столько же находится спор в состоянии автолиза.

С увеличением экспозиции действия препарата на *B. anthracis* (7 мин) число интактных спор снижается до 2,3 % от общего пула. Остальные споры имеют первичные структурные нарушения, такие, как разрыхление и разрыв споровых оболочек (22,7 % от общего пула), или находятся на разных стадиях деструкции и автолиза.

Более длительное воздействие препаратом на *B. anthracis* (15 мин) приводит к инактивации и повреждению всех спор с интактной ультраструктурой в биомассе. В микробной популяции обнаруживается не более 17 % спор с первичными нарушениями споровых оболочек, остальные споровые клетки находятся на стадиях деструкции и автолиза.

Таким образом, при воздействии препаратом ПФК-1 на *B. anthracis*, наиболее чувствительными структурными элементами спор к дезинфектанту являются споровые оболочки. Контакт препарата с ними приводит к дестабилизации структуры мембран, а затем к нарушению их целостности. Контакт молекул препарата со структурами кортекса и сердцевины вызывает их деструкцию и лизис [53], [72].

В биомассе *B. thuringiensis* до обработки препаратом содержится около 70 % спор с интактной ультраструктурой, остальные микробы повреждены или автолизированы. Интактные споры по своей ультраструктуре не отличаются от споровых клеток *B. anthracis*.

При воздействии 10 %-ным раствором дезинфектанта на *B. thuringiensis* в течение 2 минут наблюдали снижение числа интактных спор в биомассе примерно на 40 – 50 % от их исходного содержания. Примерно 15 – 16 % спор популяции имела повреждения структуры споровой оболочки и кортекса. Остальная часть спор биомассы после нарушения целостности споровых оболочек приобрела глубокие дегенеративные изменения в кортексе и сердцевине.

Воздействие дезинфектантом на *B. thuringiensis* в течение 7 и 15 мин приводит к резкому снижению числа спор с интактной ультраструктурой в популяции или к их полной инактивации и повреждению споровых клеток [47].

## **1.2. Каталазная активность микроорганизмов как показатель биологической активности**

### **1.2.1 Характеристика каталазы**

Каталаза ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$  – оксидоредуктаза) – фермент, катализирующий реакцию разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ . Биологическая роль каталазы заключается в деградации перекиси водорода, образующейся в клетках в результате

действия ряда флавопротеиновых оксидаз (ксантиноксидазы, глюкозооксидазы, моноаминоксидазы и др.), и обеспечении эффективной защиты клеточных структур от разрушения под действием перекиси водорода [17, с. 190].

Каталаза – фермент, обнаруженный почти во всех живых организмах. Основная его функция – катализировать реакцию разложения перекиси водорода до безвредных для организма веществ. Каталаза имеет большое значение для жизнедеятельности клеток, так как защищает их от разрушения активными формами кислорода [11, с. 93].

Фермент каталаза относится к оксидоредуктазам – обширному классу ферментов, которые катализируют перенос электронов от молекулы-восстановителя (донора) к молекуле-окислителю (акцептору).

Оптимальный рН для работы каталазы в человеческом организме около 7, однако, скорость реакции существенно не изменяется при значениях показателя водорода от 6,8 до 7,5. Оптимальное значение рН для других каталаз колеблется от 4 до 11, в зависимости от вида организма. Оптимальная температура также различается, для человека это около 37 °С [35, с. 326].

Каталаза – один из самых быстрых ферментов. Всего одна его молекула способна превращать миллионы молекул перекиси водорода в воду и кислород за секунду. С точки зрения энзимологии это значит, что для фермента каталазы характерно большое число оборотов [5, с. 149].

Каталаза представляет собой тетрамер из четырех полипептидных цепей, каждая из которых имеет длину более 500 аминокислот. Фермент имеет в составе четыре группы порфиринового гема, благодаря которым и вступает в реакцию с активными формами кислорода. Окисленный гем представляет собой простетическую группу каталазы [33, с. 240].

Каталаза не была известна ученым до 1818 года, пока Луи Жак Тенар - химик, обнаруживший в живых клетках перекись водорода, не предположил, что ее разрушение связано с действием ранее неизвестного биологического вещества.



В 1900 году немецкий химик Оскар Лев первым ввел термина «каталаза» для обозначения таинственного вещества, разлагающего перекиси. Он же сумел ответить на вопрос, где содержится фермент каталаза. В результате многочисленных экспериментов Оскар Лев выявил, что данный фермент характерен почти для всех животных и растительных организмов. В живой клетке, как и многие другие ферменты, каталаза содержится в пероксисомах [29, с. 497].

В 1937 году впервые удалось кристаллизоваться каталазу из говяжьей печени. В 1938 году была определена молекулярная масса фермента – 250 кДа. В 1981 году ученые получили изображение трехмерной структуры бычьей каталазы [34, с. 151].

Несмотря на то, что пероксид водорода – продукт многих нормальных метаболических процессов, для организма он не является безвредным. Чтобы предотвратить разрушение клеток и тканей, перекись водорода должна быть быстро превращена в другое, менее опасное для организма вещество. Именно с этой задачей и справляется фермент каталаза - он разлагает молекулу перекиси до двух молекул воды и молекулы кислорода. Реакция разложения пероксида водорода в живых тканях выглядит следующим образом:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  [26, с. 185].

Молекулярный механизм расщепления перекиси водорода ферментом каталазой пока точно не изучен. Предполагается, что реакция проходит в два этапа - на первом этапе железо в составе простетической группы каталазы связывается с атомом кислорода перекиси, при этом выделяется одна молекула воды. На втором этапе окисленный гем взаимодействует с другой молекулой перекиси водорода, в результате чего образуется еще одна молекула воды и одна молекула кислорода [37, с. 223].

Благодаря такому действию фермента каталазы на пероксид водорода, наличие этого активного вещества в образцах ткани легко определить. Для этого достаточно добавить к исследуемому образцу небольшое количество перекиси водорода и наблюдать за реакцией. О наличии фермента говорит

формирование пузырьков кислорода. Эта реакция хороша тем, что не требует никакого специального оборудования или инструментов – её можно наблюдать невооруженным глазом [43, с. 341].

Стоит заметить, что ион любого тяжелого металла может выступать как неконкурентный ингибитор каталазы. Кроме того, всем известный цианид ведет себя как конкурентный ингибитор каталазы, если в тканях много перекиси водорода. Арсенаты играют роль активаторов [44].

Разлагающее действие фермента каталазы на пероксид водорода нашло применение в пищевой промышленности – с помощью этого фермента из молока удаляется  $H_2O_2$  до приготовления сыра. Еще одно применение – специальные пищевые упаковки, которые защищают продукты от окисления. Каталаза также применяется в текстильной промышленности для удаления пероксида водорода из тканей [58].

Каталаза в небольших количествах используется в гигиене контактных линз. Некоторые дезинфицирующие средства имеют в составе перекись водорода, и каталаза используется для расщепления этого компонента перед повторным использованием линз.

Активность фермента каталазы зависит от возраста организма. В молодых тканях активность фермента значительно выше, чем в старых. С возрастом и у людей, и у животных активность каталазы постепенно снижается как результат старения органов и тканей [40, с. 19].

Согласно недавним исследованиям, снижение активности каталазы является одной из возможных причин поседения волос. Перекись водорода постоянно образуется в человеческом организме, однако не приносит вреда – каталаза быстро разлагает ее. Но если уровень этого фермента снижен, очевидно, что не вся перекись водорода катализируется ферментом. Таким образом, она обесцвечивает волосы изнутри, растворяя естественные красители. Это неожиданное открытие сейчас проверяется исследователями, и, возможно, сыграет роль в разработке препаратов, приостанавливающих поседение волос [74].

## 1.2.2 Использование каталазной активности в оценке физиологической активности бактерий

Каталаза – это фермент, катализирующий реакцию разложения перекиси водорода с образованием воды и кислорода. Каталазу содержат аэробы и факультативные анаэробы, но она отсутствует у облигатных анаэробов. Обнаружить каталазу можно по пузырькам кислорода, которые начинают выделяться сразу же после смешивания микробных клеток с 3 % раствором перекиси водорода [30, с. 450].

На предметное стекло помещают каплю перекиси водорода и суспензируют в ней небольшое количество культуры микроорганизмов, выращенной на плотной среде.

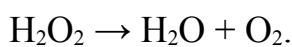
Каталазная активность свойственна большинству патогенных аэробных микроорганизмов. Облигатные анаэробы и многие микроаэрофилы каталазу не образуют [51].

Известно, что отсутствие способности образовывать каталазу является характерным признаком молочнокислых бактерий. Однако у некоторых молочнокислых бактерий ряд авторов обнаружили каталазную активность при использовании определенных субстратов благодаря наличию у них каталазной активности, осуществляемой так называемой псевдокаталазой и собственно каталазой [9, с. 612]. Так, например, псевдокаталаза была обнаружена у штаммов *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostas mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* при выращивании их на питательном агаре с 0,05 %, но не с 1 % глюкозы.

Собственно каталаза проявляет свою активность на средах с гретой кровью или гематином, тогда как псевдокаталаза – на средах с низкой концентрацией глюкозы (до 0,05 %). Эти ферменты не образуются при выращивании микроорганизмов на агаре с 1% глюкозы без добавления гематина или гретой крови. На активность каталазы не влияет присутствие в среде 2 % глюкозы, а также изменение pH среды от 7,0 до 4,5. Поэтому продуцирование псевдокаталазы и каталазы осуществляют на следующих

средах: основная среда, гематиновый агар, основная среда с 0,05 % глюкозы, основная среда с 1 % глюкозы [67].

Каталаза разлагает перекись водорода с образованием кислорода:



Положительный контроль – тест-штамм: *Staphylococcus aureus* 6538-P АТСС;

Отрицательный контроль – тест-штамм: *Enterococcus faecalis* 2442 ССМ [45].

Состав основной среды: мясной экстракт – 0,5 г; пептон – 0,5 г; дрожжевой экстракт – 0,5 г, Твин 80 – 0,05 мл;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,01 г; глюкоза – 1 %; агар – 1,5 г; вода очищенная – до 100 мл; pH среды 6,8 – 7,0. Стерилизацию проводят при 121 °С в течение 15 мин. К 95 мл расплавленной основной среды добавляют 5 мл смеси (1:1) дефибринированной бычьей крови и воды, после чего её прогревают при 100 °С в течение 15 мин для разрушения каталазы крови.

Состав гематинового агара. Пропись среды аналогична прописи основной среды. Вместо крови добавляют гематин в количестве 50 мкг/мл из основного раствора. Его готовят внесением 50 мг гематина в 10 мл воды, после чего добавляют столько 0,1 N NaOH, сколько требуется для растворения гематина. После этого раствор прогревают при 100 °С в течение 15 мин [70].

Первые две среды разливают в чашки Петри, две другие используют в виде агаровых косяков. Посев испытуемых кисломолочных культур и тест-культуры (каталазо-положительной) осуществляют так, чтобы получить рост колоний. На выросшие колонии наносят каплю пероксида, наличие каталазы определяют по выделению пузырьков газа.

Для выявления псевдокаталазы используют среду Фелтона (Felton et al. 1958).

Состав среды Фелтона (в %): триптон – 1,0; глюкоза – 0,05;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,5; агар – 1,5; вода очищенная до объема

100, рН 6,8 – 7,0. Среду стерилизуют, разливают в чашки Петри. На этой среде исследуется способность бактерий разлагать пероксид в присутствии незначительных концентраций глюкозы [63].

Также представляется целесообразным дать характеристику еще одного эксперимента, в котором каталазная активность используется в качестве показателя физиологической активности бактерий.

Одним из бактерицидных факторов, вырабатываемых некоторыми лактобациллами (палочкой Додерлейна), является перекись водорода. Лактобациллы, продуцирующие перекись водорода, угнетают рост других бактерий, особенно при рН=4,5. Перекись водорода является токсичной для широкого круга бактерий. Кроме того, жидкость организма, особенно вагинальный секрет, содержит большие запасы ионов хлора. При взаимодействии перекиси водорода с хлором образуются вещества токсичные для большинства бактерий [52], [68].

Присутствие каталазы обеспечивает эффективную защиту микроорганизмов от деградации под действием перекиси водорода, продуцируемой нейтрофилами. По нашим данным, 69,3 % изученных штаммов обладали каталазной активностью. В частности, такие микроорганизмы, как бактероиды и протей, продуцировали этот фермент в 100 % случаев [73].

Полученные результаты свидетельствуют, что значительное число штаммов патогенного стафилококка (93,75 %) и *Bacteroides fragilis* (66,7 %) продуцировали фермент гиалуронидазу. В меньшей степени гиалуронидазной активностью обладала кишечная палочка (5,88 %). Способность гиалуронидазы увеличивать проницаемость тканей облегчает бактериям проникновение через мембраны [71].

Таким образом, можно сделать общий вывод о том, что у бактерий, обладающих высокой каталазной активностью, данный фактор можно определять путем нанесения петлей капли перекиси водорода непосредственно на колонию (подозрительные колонии на мембранных

фильтрах) или на рост в штрихе. Образование пузырьков газа – «вскипание» отмечают как положительный результат [59].

## **2 Объекты и методы**

### **2.1. Характеристика объекта исследования**

В качестве объекта исследования были взяты бактерии и мицелиальные грибы, выделенные из различных экотопов:

- воздушная среда – аудитории 4 корпуса СФУ;
- почва – чистая почва и почва загрязненная нефтепродуктами или пестицидами;
- эндофитная микрофлора проростков пшеницы;
- эпифитные мицелиальные грибы с поверхности семян пшеницы;
- микрофлора человека (коллекционные штаммы *Escherichiacoli* 25922 и *Staphylococcus aureus* 25923).

### **2.2. Метод выделения микроорганизмов из воздуха**

Выделение микроорганизмов из воздуха помещений проводили седиментационным методом Коха, основанным на оседании бактериальных частиц и капель под действием силы тяжести на поверхность питательной среды открытой чашки Петри (Нетрусов, 2016). Для посева чашку Петри со стерильным питательным агаром (Nutrientagar, HiMedia, Индия) открывали в помещении на 30 – 40 мин. Затем чашки закрывали, подписывали и ставили в термостат при 30 °С на 48 часов для культивирования. Для исследования отбирали изолированные колонии.

### **2.3. Метод выделения микроорганизмов из почвы**

В работе использовали общепринятые методы почвенной микробиологии (Нетрусов, 2016). Почвенные суспензии высевали из разведений  $10^4$ –  $10^6$  на чашки Петри со стерильной агаризованной средой –

мясопептонным агаром (МПА). Инкубировали чашки при температуре 30 °С в термостате в течение 5 – 7 суток.

Для выделения чистых культур отбирали изолированные колонии микроорганизмов и отсеивали их на скошенный МПА.

Изучение фенотипических признаков почвенных микроорганизмов проводили стандартными микробиологическими методами.

При идентификации бактериальных изолятов проводили сравнительный анализ их морфологических, культуральных, биохимических свойств. Определяли морфологию вегетативных клеток, спорообразование, подвижность, грампринадлежность, каталазную, оксидазную, амилазную и протеиназную активность, образование кислоты из глюкозы, лактозы, сахарозы, мальтозы и маннита.

Принадлежность изучаемых культур к группе грамположительных или грамотрицательных бактерий определяли экспресс-методом Греггерсена. Клетки культур помещали бактериологической петлей в каплю 3%-го раствора КОН на предметное стекло, размешивали круговыми движениями и через 5 – 6 секунд петлю поднимали. Суспензия грамотрицательных бактерий становилась вязкой и тянулась за петлей. Грамположительные бактерии равномерно распределялись в капле щелочи. Реакцию считали отрицательной, если образование слизистых тяжей не наблюдалось в течение 60 секунд.

Для выявления амилалитической активности использовали среду следующего состава (г/л): пептон – 10.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 5.0; растворимый крахмал – 2.0; агар – 15.0; рН среды 6,8 – 7.0. Среду стерилизовали при температуре 121 °С 30 минут и разлили в стерильные чашки Петри. Исследуемые микроорганизмы высевали штрихом по диаметру чашки. Продолжительность культивирования составила 7 суток, при температуре 30°С. Гидролиз крахмала обнаруживали после обработки агаровой поверхности раствором Люголя. Для этого на поверхность среды наливали 3 – 5 мл раствора Люголя,



после чего среда окрашивалась в синий цвет, а зоны гидролиза крахмала приобретали красно-бурую окраску.

Так же изучали протеолитическую активность. Для этого культуры высевали на мясопептонную желатину (МПЖ). К 100 мл мясопептонного бульона (МПБ) добавили 15 г желатины, оставили на 15 минут, чтобы она набухла, затем нагрели на водяной бане до полного растворения желатины и разлили в пробирки по 10 мл. Стерилизовали при температуре 121 °С 15 минут. Посев проводили уколом. Продолжительность культивирования составило 10 суток при комнатной температуре. Разжижение желатины отмечали визуально.

Оксидазную активность выделенных изолятов бактерий определяли с помощью тест-полосок окситест (MIKRO-LA-TEST).

Способность исследуемых культур ферментировать углеводы изучали на универсальных средах Гисса. В состав этих сред входят: панкреатический гидролизат кильки, индикатор и различные углеводы (глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза, манит). Среду готовили следующим образом – 15 грамм препарата размешивали в 1 литре дистиллированной воды, кипятили до полного растворения. Разлили в стерильные пробирки. Засев проводили уколом, культивировали в течение 3 дней. Визуально отмечали образование газа и кислоты.

Обнаружение ферментов лецитиназы и липазы проводили на желточном агаре. Состав желточного агара (г/л): пептон – 10,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 2.5,  $\text{NaCl}$  – 2.0,  $\text{MgSO}_4$  – 0.05, Глюкоза – 0.1, Агар - 20 г. Среду стерилизовали в автоклаве при 121 °С в течение 25 минут, затем остужали до 45-50 °С и в остывший агар вносили асептически желточную взвесь (желток, размешанный в 100 мл стерильного физиологического раствора). Желточный агар быстро разливали по чашкам и засевали культурой бактерий штрихом через центр чашки. После инкубации снимали крышку и осматривали поверхность колоний при косом освещении. При положительной липазной реакции вокруг колонии наблюдали маслянистый слой; при положительной

лецитиназной реакции под колониями образовывалась непрозрачная зона помутнения.

#### **2.4. Метод выделения микроорганизмов из проростков пшеницы**

Семена пшеницы проращивали во влажных камерах и на питательных средах по ГОСТ 12044-93.

Сначала семена 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 20 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 10 чашек на расстоянии 2 – 3 см друг от друга.

Остальные 10 стерильных чашек заполняли агаризированной питательной средой и выкладывали в каждую чашку по 5 штук семян 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 и плесневыми грибами, которые были отсеяны в чашки Петри на питательный агар (бактериальные культуры в 2-х повторностях) и агар Сабуро (Sabouraudagar, HiMedia, Индия) (плесневые грибы 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 были выделены чистые культуры бактерий и плесневых грибов, которые хранили в пробирках на скошенном питательном агаре и агаре Сабуро.

Для выделения чистой культуры микроорганизмов делали истощающий посев по методу Дригальского. Для этого на 1-ю чашку петлём или пипеткой наносили каплю исследуемого материала и растирали

стерильным шпателем по всей поверхности питательного агара. Затем шпатель, не обеззараживая, переносили во 2-ю чашку и втирали оставшиеся на нём микроорганизмы в поверхность питательной среды. Далее шпатель переносили в 3-ю чашку и аналогичным образом производили посев. В зависимости от содержания микробных клеток в исследуемом материале на третьей или на второй и третьей чашках вырастали отдельные колонии, пригодные для выделения чистой культуры.

## **2.5. Идентификация микроорганизмов по методике MALDI-TOF**

Появление технологии матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS) внесло существенные изменения в рабочие процессы микробиологических лабораторий, практически не имея себе равных по скорости и точности идентификации микроорганизмов. Данный метод, постепенно становящийся стандартом для современных лабораторий, позволяет сокращать время идентификации чистых культур до нескольких минут.

В основе метода MALDI-ToF MS лежит мягкая ионизация смеси микроколичеств исследуемого субстрата (биомассы микроорганизмов или экстракта) с матриксом под воздействием импульсного лазерного излучения. Матрикс представляет собой вещество, обладающее сильным поглощением оптической энергии в диапазоне излучаемой лазером длины волны.

Идентификацию микроорганизмов проводили методом МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex («BrukerDaltonics», Германия).

Исследуемые бактерии в чистой суточной культуре снимали одноразовой петлей с поверхности скошенного агара и наносили непосредственно (растирали) на лунки стального планшета для MALDI-TOF масс-спектрометрии (MTP 384 massive, «BrukerDaltonics», Германия). Затем

на образцы наслаивали по 2 мкл насыщенного раствора матрицы –  $\alpha$ -СНСА («BrukerDaltonics», Германия) в растворе, содержащем 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты. Планшет с содержимым высушивали на воздухе до образования кристаллов (5 мин). В качестве контрольного образца, а также в качестве внешнего калибратора использовался экстракт штамма *E. coli* DH5a.

Для получения каждого масс-спектра использовали 50 импульсов лазера с мощностью излучения, установленной на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца. Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона  $m/z$  (отношение массы к заряду) от 2000 до 20 000. Внутреннюю калибровку указанного диапазона проводили с использованием точных значений масс известных белков *E. coli*. Образец наносили на три ячейки планшета, для каждой из которых записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 одиночных спектров (500 импульсов лазера). Для записи, обработки и анализа массспектров использовали программное обеспечение фирмы «BrukerDaltonics» (Германия): flexControl 2.4 (Build 38). Идентификация бактерий проводилась автоматически, с использованием программного обеспечения.

При интерпретации масс-спектров исходили из предположения, что большая часть регистрируемых пиков соответствует белковым молекулам, а определяемые массы - массам целых (не фрагментированных) белков.

## **2.6. Методы определения чувствительности к пероксиду водорода**

Определение чувствительности микроорганизмов к пероксиду водорода проводили методом лунок на плотной питательной среде. В чашки Петри на питательный агар был произведен посев газоном выделенных культур бактерий. Затем стерильным цилиндром в центре газона вырезали лунки диаметром 1 см. В каждую лунку вводили по 200 мкл 3%-го раствора

перекиси водорода ( $H_2O_2$ ). Далее все образцы инкубировали в термостате при 30 °С. Анализ чувствительности микроорганизмов проводили на первые и третьи сутки инкубирования, измеряя ширину зоны отсутствия роста бактерий вокруг лунок. По истечении первого и третьего дней все образцы были сфотографированы.

### **3 Результаты**

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## Список использованной литературы

1. Астахова, С. А. Инактивация микроорганизмов ультрафиолетовым излучением эксилампы с использованием пероксида водорода и нанодисперсных частиц диоксида титана. Автореф. дис. .... канд. биол. наук / Астахова Светлана Александровна. – Улан-Удэ, 2009. – 97 с.
2. Ахметов, Н.С. Общая и неорганическая химия: учебник / Н. С. Ахметов.– СПб.: Лань, 2014. – 752 с.
3. Беляев, С.А. Микробиология: учебное пособие / С. А.Беляев. – СПб.: Лань П, 2016. – 496 с.
4. Блинов, Л.Н. Санитарная микробиология: учебное пособие / Л. Н. Блинов.– СПб.: Лань КПТ,2016. - 240 с.
5. Блинов, Л.Н. Микробиология и иммунология: учебное пособие / Л. Н. Блинов.– СПб.: Лань,2013. – 240 с.
6. Борзова, Л.Д. Ветеринарная микробиология и иммунология. Практикум: учебное пособие / Л. Д. Борзова.– СПб.: Лань П, 2016. – 368 с.
7. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Л. Б. Борисов.– М.: МИА,2005. – 736 с.
8. Брюханов, А.Л. Молекулярная микробиология: учебник для вузов / А. Л. Брюханов.– М.: МГУ, 2012. – 480 с.
9. Бухарин, О.В. Каталазная активность углеводородокисляющих бактерий / О. В. Бухарин, О. А. Гоголева, Н.В.Немцева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Том 48. – №6. – С. 612 – 617.
10. Волина, Е.Г. Частная микробиология: учебное пособие / Е. Г. Волина.– М.: РУДН, 2016. – 222 с.
11. Вольнов, И. И. Перекисные соединения щелочных металлов / И. И. Вольнов. – М.: Наука, 1980. 160 с.
12. Госманов, Р.Г. Микробиология и иммунология: учебное пособие / Р. Г.Госманов. – СПб.: Лань, 2013. – 240 с.

13. Госманов, Р.Г. Санитарная микробиология пищевых продуктов: учебное пособие / Р. Г. Госманов.– СПб.: Лань, 2015. – 560 с.
14. Глинка, Н. Л. Общая химия: учебник для академического бакалавриата / Н. Л. Глинка.– Люберцы: Юрайт, 2016. – 729 с.
15. Дейша-Сионицкая, М.А. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учебное пособие / М.А.Дейша-Сионицкая.– СПб.: Лань, 2016. – 588 с.
16. Джей, Д.М. Современная пищевая микробиология / Д.М. Джей, М.Д. Лесснер, Д. Гольден. – М.: Бином, 2014. – 886 с.
17. Емцев, В. Т. Микробиология: учебник для бакалавров / В.Т.Емцев.– Люберцы: Юрайт, 2016. – 445 с.
18. Ершов, Ю. А. Общая химия, биофизическая химия, химия биогенных элементов: учебник для вузов / Ю.А.Ершов.– Люберцы: Юрайт, 2016. – 562 с.
19. Зезеров, Е.Г. Биохимия (общая, медицинская и фармакологическая): курс лекций / Е.Г.Зезеров.– Ереван: МИА, 2014. – 456 с.
20. Ивчатов, А.Л. Микробиология: монография / А.Л.Ивчатов.– М.: АСВ, 2013. – 120 с.
21. Ивчатов, А. Л. Химия воды и микробиология: учебник / А.Л.Ивчатов.– М.: Инфра-М, 2016. – 62 с.
22. Ившина, И.Б. Большой практикум. Микробиология: учебное пособие / И.Б. Ившина.– СПб.: Проспект Науки, 2014. – 112 с.
23. Каленов, С. В. Культивирование дрожжей и галобактерий в условиях контролируемого окислительного стресса. Автореф. дис. .... канд. биол. наук / Каленов Сергей Владимирович. – Москва, 2007. – 184 с.
24. Карапетьянц, М.Х. Общая и неорганическая химия: учебник / М.Х.Карапетьянц.– М.: КД Либроком, 2015. – 592 с.
25. Караулов, А.В. Иммунология, микробиология, иммунопатология кожи / А.В.Караулов.– М.: Бином, 2012. – 328 с.



26. Кисленко, В.Н. Пищевая микробиология: микробиологическая безопасность сырья / В.Н.Кисленко.– М.: Инфра-М, 2017. – 192 с.
27. Кисленко, В.Н. Пищевая микробиология: микробиологическая безопасность сырья и продуктов животного и растительного происхождения: учебник / В.Н.Кисленко.– М.: Инфра-М, 2016. – 81 с.
28. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: учебник / В.Н. Кисленко.– М.: Инфра-М, 2017. – 624 с.
29. Королев, А.А. Микробиология, физиология питания, санитария и гигиена: учебник / А.А.Королев.– М.: Academia, 2017. – 640 с.
30. Коротяев, А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для медицинских вузов / А.И.Коротяев.– СПб.: СпецЛит, 2012. – 760 с.
31. Кочемасова, З. Н. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических институтов / З.Н.Кочемасова.– М.: Альянс, 2014. – 352 с.
32. Левинсон, У. Медицинская микробиология и иммунология /У.Левинсон.– М.: Бином, 2015. – 1181 с.
33. Мартинчик, А.Н. Микробиология, физиология питания, санитария: учебник / А.Н.Мартинчик.– М.: Academia, 2017. – 480 с.
34. Зверев, В.В. Микробиология: учебник /В.В.Зверев.– М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 384 с.
35. Нетрусов, А. И. Микробиология: учебник / А. И.Нетрусов.– М.: Academia, 2016. – 416 с.
36. Просеков, А.Ю. Общая биология и микробиология: учебное пособие / А.Ю.Просеков.– СПб.: Просп. Науки, 2012. – 320 с.
37. Рубина, Е.А. Микробиология, физиология питания, санитария: учебник / Е.А.Рубина.– М.: Форум, 2018. – 248 с.
38. Рыбальченко, О. В. Микробиология и вирусология / О. В.Рыбальченко.– СПб.: Спецлит, 2018. – 81 с.

39. Сбойчаков, В.Б. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований / В.Б.Сбойчаков.– СПб.: Спецлит, 2017. – 608 с.
40. Сидоренко, О. Д. Микробиология: учебник / О.Д.Сидоренко.– М.: Инфра-М, 2017. – 29 с.
41. Сидорчук, А.А. Санитарная микробиология пищевых продуктов: учебное пособие / А.А.Сидорчук.– СПб.: Лань, 2015. – 560 с.
42. Хрущева, И.В. Общая и неорганическая химия: учебник / И.В.Хрущева. – СПб.: Лань П, 2016. – 496 с.
43. Черкес, Ф. К. Микробиология: учебник для мед. училищ / Ф.К. Черкес.–М.: Альянс, 2014. – 512 с.
44. Antunes F., Estimation of  $H_2O_2$  gradients across biomembranes / F. Antunes, E. Cadenas // FEBS Lett. – 2000. – V. 475. – P. 121–126.
45. Araujo, N.C.P. Peroxides with antiplasmodial activity inhibit proliferation of *Perkinsus olseni*, the causative agent of Perkinsosis in bivalves / N.C.P. Araujo [et. al] // Parasitology International. – 2013. – V. 62. – P. 575 – 582.
46. Baldry, M .G .C. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid / M .G .C. Baldry // Journal of Applied Bacteriology. – 1983. – V. 54. – P. 417 – 423.
47. Ball, R. Thermal relaxation oscillations in liquid organic peroxides / R. Ball // Int. J. Energ. Mater. Chem. Propulsion. – 2011. – V. 10. – P. 523–540.
48. Ball, R. Hydrogen peroxide thermochemical oscillator as driver for primordial RNA replication / R. Ball, J. Brindley // J. R. Soc. Interface. – 2014. – V. 11. – P. 1052 – 1077.
49. Ball, R. Thiosulfate–hydrogen peroxide redox oscillator as pH driver for ribozyme activity in the RNA world / R. Ball, J. Brindley // Orig. Life Evol. Biosph. – 2015. – V. 46. – P. 133 – 147.
50. Ball, R. The life story of hydrogen peroxide II: a periodic pH and thermochemical drive for the RNA world. [Electronic source] / R. Ball [et. al]

//Journal of the royal society interface. – 2015. – V. 12. –Access mode: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsif.2015.0366>.

51. Bailly, C. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology / C.Bailly [et. al] // C. R. Biol. – 2008. –V. 331. – P. 806–814.

52. Barba-Espín, G. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings / G.Barba-Espín[et. al]// Plant Cell Environ. – 2010. –V. 33. – P. 981–994.

53. Branco, M. R. Decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma membrane permeability during adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae* / M. R.Branco [et. al] // J. Biol. Chem. – 2004. –V. 279. – P. 6501–6506.

54. De la Haba, C. Effect of oxidative stress on plasma membrane fluidity of THP-1 induced macrophages / C. De la Haba [et. al] // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. – 2013. –V. 1828. – P. 357–364.

55. DeQueiroz, G. A. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces / G. A., DeQueiroz [et. al] // Journal of Applied Microbiology. – 2007. – V. 103. – P. 794 – 802.

56. Fontenelle, C. Resistance to organic hydroperoxides requires ohr and ohrR genes in *Sinorhizobium meliloti* /C.Fontenelle [et. al] // BMC Microbiology. – 2011. – P. 1471 – 2180.

57. Gao, Q.A. transition from propagating fronts to target patterns in the hydrogen peroxide–sulfite–thiosulfate medium / Q.A.Gao[et. al] // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2004. –V. 6. – P. 5389–5395.

58. Hernandez, K. Hydrogen Peroxide in Biocatalysis. A Dangerous Liaison. [Electronic source] / K. Hernandez [et. al] // Current Organic Chemistry. – 2012. – V. 16. – Access mode: <https://core.ac.uk/download/pdf/32320265.pdf>.

59. Identification of bacteria Bergey: V 2-Kh t. [Text]:Transl. from Engl / M.: The world. – 1997. –V.1. – 432p.

60. Identification of bacteria Bergi: V 2-Kh t. [Text]:Transl. from Engl / M.: The world. –1997.–V. 2. – 368p.
61. Ivica, N.Paradox of dual roles in the RNA world: resolving the conflict between stable folding and templating ability / N.Ivica[et. al] // Journal ofMolecular Evolution. – 2013. –V. 77. – P. 55–73.
62. Klebanoff, S. J. The peroxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide Antimicrobial system /S. J. Klebanoff[et. al] // Biochimica et biophysica acta. – 1966. – V. 117. – P. 63 – 72.
63. Lawrence, F. A. Randomized Trial of the Efficacy and Safety of Topical Adapalene-Benzoyl Peroxides / F. A. Lawrence // InternationalJournal of Current Research. – 2013. –V. 12. – P. 611 – 618.
64. Lu, Y.Oxygen–sulfur species distribution and kinetic analysis in the hydrogen peroxide–thiosulfate system / Y.Lu[et. al] // Inorganic Chemistry. – 2010. –V. 49. – P. 6026–6034.
65. Peralta, M.M. Electrochemical Hydrogen Peroxide Production in Acidic Medium Using a Tubular Photo-reactor: Application in Advanced Oxidation Processes / M.M.Peralta // Journal of the Mexican Society.– 2014.–V. 58. – P. 348 – 355.
66. Rábai, G. Temperature compensation in the oscillatory hydrogen peroxide–thiosulfate–sulfite flow system / G. Rábai // Chemical Communications. – 1999. – P. 1965–1966.
67. Rhee, S. G.Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger / S. G.Rhee // Experimental & Molecular Medicine. – 1999. V.31. P. 53–59.
68. Rodriguez-Chueca,J. Inactivation of pathogenic microorganisms in freshwater using  $\text{HSO}_5^-$  / UV-A LED and  $\text{HSO}_5^-/\text{Mn}(\text{II})/\text{UV-A}$  LED oxidation processes / J. Rodriguez-Chueca [et. al]// Water Research. – 2017. – V. 123. – P. 113 – 123.
69. Sies,H. Role of metabolic  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation / H.Sies // Journal of the biological chemistry. – 2014. –V. 289. – P.8735–8741.
70. Siqueira, J. F. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium

hydroxide: a critical review / J. F. Siqueira[et. al]// International Endodontic Journal. – 1999. – V. 32. – P. 361 – 369.

71. Ślesak, I. Oxygen and hydrogen peroxide in the early evolution of life on earth: in silico comparative analysis of biochemical pathways / I. Ślesak // Astrobiology. – 2012. –V. 12. – P. 775–784.

72. Sofos, J. N. Antimicrobial Activity of Sorbate / J. N. Sofos[et. al]// Journal of Food Protection. – 1981. – V. 44, № 8. – P. 614 – 622.

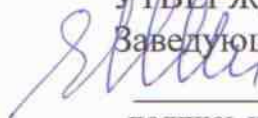
73. Wojtyla, L. Different Modes of Hydrogen Peroxide Action During Seed Germination [Electronic source] / L. Wojtyla// Frontiersin plant science. – 2016. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26870076>.

74. Yuan,L.Temperature-induced bifurcations in the Cu(II)-catalysed and catalyst-free hydrogen peroxide–thiosulfate oscillating reaction / L.Yuan [et. al]// The journal of physical chemistry A. – 2009. –V. 114. - P. 7014–7020.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



подпись инициалы, фамилия

« 5 » июня 20 19 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01 Биология

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

**Антимикробное действие пероксида водорода на микрофлору объектов  
внешней среды**

Руководитель



профессор, д. б. н.

С. В. Прудникова

Выпускник



В. А. Морозова

Рецензент



доцент, к. б. н.

Н. О. Жила

Красноярск 2019