

Попова Мария, 2 год
ГАУ ДО Брянской области «Детский технопарк «Кванториум», Г.Брянск

Биоцидные свойства Сенной палочки (*Bacillus subtilis*) и суспензии из наночастиц меди, как стимуляторов роста бобовых (*Fabaceae*)

Руководитель: Антоненко Ю.А

2022

Содержание:

Введение.....	3
1 Теоретическая часть	5
1.1. Характеристика сенной палочки (<i>Bacillus subtilis</i>) и наночастиц меди.....	5
1.2. Значение и применение сенной палочки (<i>Bacillus subtilis</i>) и наночастиц меди.....	5
1.3. Результаты предыдущего исследования.....	7
2 Практическая часть.....	8
2.1. Материалы и методы исследования.....	8
2.2. Анализ результатов экспериментального исследования.....	9
Заключение.....	13
Литературный обзор.....	14
Приложение.....	16

Введение

Население планеты постоянно увеличивается, из-за чего может возникнуть вероятность столкновения человечества с нехваткой продовольствия. Поэтому важнейший вызов, стоящий перед учёными - поиск способов, увеличивающих скорость прорастания семян и роста культурных растений. Одной из основных причин потери агрокультур является порча их плесневыми грибами и патогенными бактериями. Следовательно, крайне важно найти способ обеззараживать почву, убивать или нейтрализовывать возбудителей различных заболеваний. Для этих целей в аграрном секторе экономики возможно применение наночастиц меди, обладающих уникальным сочетанием противогрибковых и антибактериальных свойств [10]. Для усиления стимулирующих свойств суспензии из наночастиц меди, можно использовать сенную палочку (*Bacillus subtilis*) – распространённый сапрофитный микроб. В качестве опытных образцов в работе мы брали фасоль (*Fabaceae*) – широко возделываемую как пищевое растение бобовую культуру. Таким образом, мы хотим получить раствор, в состав которого будут входить компоненты, обеззараживающие почву и стимулирующие рост бобовых. Работа направлена на повышение урожайности и будет иметь прикладное значение в сельском хозяйстве. Учитывая, что себестоимость данного препарата несколько выше, чем стоимость препарата, изготовленного только из сенной палочки, оправданным будет его применение не на основных сельскохозяйственных угодьях, а на опытных участках при проведении селекционных работ.

Рабочие гипотезы:

1. Суспензия из наночастиц меди и сенной палочки (*Bacillus subtilis*) изменит скорость прорастания семян бобовых (фасоли).

2. Растворы, содержащие разную концентрацию наночастиц меди и сенной палочки (*Bacillus subtilis*), будут иметь разные стимулирующие свойства.

3.Суспензия из наночастиц меди и сенной палочки проявит наилучшие стимулирующие и антибактериальные свойства.

Цель работы: доказать, что использование суспензии из наночастиц меди и сенной палочки (*Bacillus subtilis*) ведёт к увеличению скорости прорастания семян фасоли и дальнейшего роста растения, а также к обеззараживанию почв, вследствие заметного уменьшения количества патогенных почвенных бактерий.

Задачи: изучить литературные источники по данной теме; вырастить сенную палочку (*Bacillus subtilis*), провести синтез и анализ стабильных наночастиц меди; провести эксперимент по выращиванию семян фасоли с использованием растворов, содержащих наночастицы меди и бактерии сенной палочки (*Bacillus subtilis*); провести эксперимент, направленный на выявление биоцидных свойств образцов; проанализировать и запротоколировать полученные результаты.

1. Теоретическая часть

1.1 Характеристика сенной палочки (*Bacillus subtilis*) и наночастиц меди

Сенная палочка (*Bacillus subtilis*) — вид грамположительных (окрашивающиеся по Грамму в синий цвет) спорообразующих факультативно аэробных почвенных бактерий, сапрофитный микроб, относящийся к группе гетеротрофов [1].

Впервые описаны Х.Г. Эренбергом в 1835 г. как *Vibrio subtilis*, в 1872 г. переименованы Коном в *Bacillus subtilis*. Были выделены из прелого сена, экстракт которого необходим для накопления чистой культуры [1].

Сенная палочка - палочковидная бактерия размером $2-5 \times 0,4-0,6$ мкм, имеющая овальные споры, расположенные центрально. Геном палочки - кольцевая двуцепочечная ДНК. Выдерживает экстремальные температуры и сухие среды [1]. Растёт и размножается в присутствии кислорода. Безопасный микроорганизм, не обладающий патогенными свойствами.

Наночастица меди - субмикронная частица на основе меди размером от 1 до 100 нм, имеющая высокое отношение поверхности к объёму. Оказывает антибактериальное действие, участвует в образовании эритроцитов, стимулирует процессы регенерации тканей, имеет противовирусные и противогрибковые свойства [12].

В настоящее время разработаны и успешно используются различные химические, физические и физико-химические методы получения наночастиц меди.

1.2 Значение и применение сенной палочки (*Bacillus subtilis*) и наночастиц меди

Bacillus subtilis применяется в различных отраслях промышленности, представляя медицинский, хозяйственный и научный интерес.

Многие медицинские препараты для лечения заболеваний ЖКТ и гнойных инфекций имеют в составе различные штаммы *Bacillus subtilis* [2].

Применяют в агропромышленности для защиты и обеззараживания почв и растений от возбудителей инфекций, используют для ускорения роста растений. Планируют активно применять в экологии как основной метод борьбы с отходами в рамках «зелёной» экономики [2].

Наночастицы меди применяются в сельском хозяйстве, в медицине и косметологии, в химической и текстильной промышленности, в машиностроении и производстве строительных материалов и др.

Наночастицы используют при создании высокотемпературных сверхпроводников и электролитов. На основе медьсодержащих нанокompозитов изготавливают материалы медицинского назначения [14]. Наночастицы меди входят в состав дезинфицирующих средств. Покрытая наномедью хлопчатобумажная ткань имеет высокую антимикробную и антибактериальную активность [11].

Учёные из Индии показали, что наночастицы меди угнетают развитие плесневых грибов [6]. Мексиканские учёные доказали, что наночастицы проникают вглубь гриба и нарушают процессы его роста и деления. «Наноматериал может быть полезен для борьбы с патогенными грибами, которые влияют на сельскохозяйственные и лесные виды в глобальном масштабе.» [8]. Такая обработка не нарушает фотосинтез и обменные функции растений.

В. Шах и И. Белозерова в ходе исследования, показали, что наномедь не только отрицательно влияет на патогенные микроорганизмы, но и не токсична по отношению к почве [7].

При попадании в почву наночастицы меди образуют легкорастворимые соединения, которые в дальнейшем растения используют при питании в качестве источника микроэлементов, т. е. их применение в сельском хозяйстве несёт сниженную нагрузку на почву, которая не загрязняется и не требует применения дополнительных мер для восстановления плодородности.

1.3 Результаты предыдущего исследования

Данный проект является продолжением работы «Влияние Сенной палочки (*Bacillus subtilis*) на скорость прорастания Пшеницы(*Triticum*)», в ходе которой были получены следующие результаты. Синтезирован маточный раствор сенной палочки и чистая культура, выращенная на питательной среде МПА. Выяснено, что у образцов, которые поливали раствором с сенной палочкой, семена пшеницы взошли быстрее, чем в контрольных. Образцы, которые поливали раствором сенной палочки, взошли уже на первый день, за исключением 1 семени (10% от общего всхода). Среди семян, которые поливались водой, процент всхожести составил 60%. В этих образцах обнаружилось скопления плесени, которые не наблюдались в образцах с сенной палочкой, что говорит о её антисептических свойствах. Образцы, поливаемые сенной палочкой, за 5 дней эксперимента выросли в 7-10 раз, а контрольные - в 5-6 раз. Пшеница, поливаемая сенной палочкой выросла в 1,5 раза выше, чем та, которую поливали водой.

По итогам работы было установлено, что сенная палочка положительно влияет на период прорастания и скорость роста пшеницы.

2. Практическая часть

2.1 Материалы и методы исследования

Данная работа проводится на базе ГАУ ДО Брянской области «Детский технопарк «Кванториум» под руководством Антоненко Ю.А.

В ходе работы была использована следующая методика выращивания сенной палочки. 25 г сена измельчают, помещают в колбу и заливают 200 мл водопроводной воды (Рис.1 и 2).

Для нейтрализации в колбу добавляют щепотку мела и кипятят 30 мин.

При кипячении в раствор переходят питательные вещества и отмирает большое количество микроорганизмов. Споры сенной палочки не погибают, выдерживая кипячение в течение 2 ч.

Полученный отвар сена цвета чая средней густоты сливают в другую колбу слоем 1-2 см, закрывают ватной пробкой и помещают в термостат при температуре +25... + 30° С.

Через 2-3 суток жидкость помутнеет и покроется беловатой пленкой, состоящей из сенных бактерий (Рис. 3).

Навески пептона мясного ферментативного 0,5 г и агар-агар микробиологического 0,75 г помещают в химический стакан, объёмом 100 см³, и растворяют в 50 см³ дистиллированной воды. Химический стакан помещают на электрическую плитку и доводят среду до кипения, постоянно перемешивая. Питательную среду, не охлаждая, осторожно через воронку разливают в пробирки. При этом среда не должна попадать на верхнюю часть пробирки. Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве при +121° С в течение 15 мин. После этого пробирки с расплавленной питательной средой МПА (+50–55 °С) переносят в ламинарный бокс и разливают в стерильные чашки Петри. Заполненные чашки с питательной средой МПА остужают, этикетируют и перевернутыми помещают в инкубатор-термостат.

Для получения суспензии с наночастицами меди использовали следующую методику. Приготовили стабильную наносуспензию (раствор на

основе CuSO_4 с добавлением желатозы, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ - аскорбиновой кислоты); провели спектрофотометрический анализ; микроскопирование образцов с различными стабилизаторами - ПВП, крахмалом и глюкозой (Рис.4).

Спектрофотометрический анализ проводили дважды. Он помогает определить примерный размер частиц, количественный состав, показывает высокий коэффициент точности. Мы пользовались одним из основных методов определения анализируемого вещества в спектрофотометрии: методом градуировочного графика. Проведя анализ, нашли максимальную благоприятную длину волны – 590 Нм, которая указывает на наличие наноразмерных частиц в золях. Судя по небольшой интенсивности максимумов и значительному поглощению, количество наночастиц мало, они сильно окислены и не стабильны, поэтому мы использовали различные стабилизаторы (ПВП, глюкозу и крахмал), выявляли лучший из них. Сравнение оптических спектров гидрозолей с различной исходной концентрацией меди показало, что с её увеличением количество наночастиц изменяется не монотонно: сначала наблюдался максимум при 0,01 моль/л, затем снижение в интервале 0,03-0,06 моль/л.

Была разработана схема первоначального эксперимента по обработке почв (Табл.1), где сочетаются варианты с разным содержанием наночастиц меди и сенной палочки (*Bacillus subtilis*). Опытные образцы поливались в соответствии со схемой опыта и схемой полива (Табл. 2).

Был проведён эксперимент, доказывающий биоцидные свойства образцов. Учёт количества микроорганизмов производился методом обрастания комочков почвы на среде МПА. Была заложена микробиологическая проба образцов, показавших лучшие свойства. Для определения жизненных форм и состава клеточной стенки микроорганизмов проведена окраска по Грамму. Техника: на фиксированный мазок нанести раствор генцианвиолета на 1-2 минуты, нанести раствор Люголя на 1-2 минуты, нанести спирт на 30-60 сек, смыть водой, докрасить раствором

фуксина в течение 1-2 минут, промыть водой, высушить при помощи спиртовки, провести микроскопирование.

2.2. Анализ результатов экспериментального исследования

Был получен стабильный золь из наночастиц меди, обладающий биоцидными и стимулирующими свойствами. Выяснилось, что время хранения суспензий оказывает влияние на антибактериальные свойства наночастиц меди. Проанализировав данные, полученные в результате опыта, было выяснено, что образцы, семена которых замачивались в растворе с наночастицами меди, взошли быстрее, чем контрольные. Установлено: у семян, вымачиваемых в растворе с наночастицами меди со стабилизатором ПВП, ростки всходят уже на первый день; семена, которые поливали раствором с наночастицами, взошли только на второй день. За 7 дней эксперимента фасоль, семена которой вымачивали в растворе с наночастицами меди, выросла в 2,5 раза больше, чем фасоль, поливаемая водой. На семена фасоли, вымачиваемые в растворе с наночастицами, уходило в 2 раза меньше суспензии, чем на полив растений, поэтому способ вымачивания более эффективный и дешёвый.

Была исследована способность наночастиц меди угнетать бактерии и грибки, доказаны противомикробные свойства золь, выращены почвенные бактерии на агарозной среде и изучено влияние наносуспензий на рост микроорганизмов. Выяснилось, что золи оседают на бактериях и приостанавливают их размножение, но не убивают выросшие микробы. Лучше всего на рост микроорганизмов повлияла суспензия со стабилизатором ПВП (Рис.5). Она оказалась лучшей и в увеличении скорости прорастания семян фасоли. Золь приостановил рост колоний: площадь, покрытая бактериями, составила <30%; бактерии, не обработанные ничем, распространились на площадь > 45% (Рис. 5).

В ходе работы были проведены эксперименты. Первый - для выяснения действия приготовленных растворов с большим спектром концентраций для

выбора лучшего результата. Для опыта было приготовлено 9 зелей (Рис.6) и контрольный полив, которыми мы поливали фасоль на протяжении 8 дней.

На третий день проведения эксперимента наблюдался рост почти всех образцов (Рис.7). В контрольном образце появилась плесень (Рис.8), все остальные варианты не были поражены на протяжении всего эксперимента. Делаем вывод: наночастицы меди и сенная палочка (*Bacillus subtilis*) обладают бактерицидными свойствами.

Быстрый и значительный скачок в росте был замечен на 5 день опыта у образцов 1, 2, 3, 9, была произведена их пересадка.

За 8 дней наибольший скачок в росте наблюдался у образцов 1,2,4,6, поэтому для дальнейших опытов мы отобрали суспензии 1,2,4,6 и контрольный образец.

Далее был проведён повторно эксперимент с поливом образцов.

Была составлена (Табл.3) - длины стеблей. Образцы, поливаемые сенной палочкой и наночастицами меди, разбавленными в 5 раз, выросли в 1,4 раза больше, чем контрольный. Процент всхожести 100%. Образцы, поливаемые чистым раствором сенной палочки, выросли в 1,06 раз больше, а поливаемые наночастицами, разбавленными в 15 раз, в 1,2 раза больше. Исходя из полученных результатов, выяснено, что образцы с большой концентрацией наночастиц (разбавленные всего в 5 раз) угнетают рост. Самыми быстро растущими образцами оказались те, которые мы поливали раствором из наночастиц и сенной палочки, что частично подтверждает гипотезу.

На (Табл.4) представлены результаты измерений корневых систем. У контрольного образца (Рис. 17) хорошо развитая корневая система имеет самую большую поглощающую поверхность, но и одна из самых коротких. Менее разветвлённая корневая система у образцов, которые мы поливали раствором из наночастиц и сенной палочки, говорит о том, что растения получали достаточное количество питательных веществ. Самая длинная корневая система оказалась у образца, поливаемого наночастицами,

разбавленными в 15 раз: в 1,5 раза длиннее, чем у контрольного. Также достаточно длинной оказалась корневая система у образца, поливаемого наночастицами, разбавленными в 5 раз и сенной палочкой: в 1,218 раз длиннее, чем у контрольного.

В ходе недельного эксперимента с обрастанием почвенных комочков были получены следующие результаты (Табл.5). Была заложена микропроба образцов 1,2,4,6 и контроля. Рост колоний бактерий выявлен только у контрольного образца (Рис.18).

Была проведена микробиологическая окраска по Грамму, в ходе которой выявлено, что в пробах земли, на которых была выращена фасоль, поливаемая разными вариациями растворов из сенной палочки и наночастиц меди, преобладают грамотрицательные микроорганизмы. В образце с сенной палочкой и наночастицами преобладают бациллы, стенки которых окрашены в розовый цвет и бациллы, стенки которых окрашены в фиолетовый, предположительно сенной палочки. В контроле преобладают фиолетовые кокки, в других образцах также были обнаружены фиолетовые кокки, являющиеся грамположительными.

Заключение

В ходе работы проведен повторный литературный анализ данных о сенной палочке (*Bacillus subtilis*) и наночастицах меди и выявлены их свойства: антибактериальность, противогрибковость, стимуляция роста.

Были использованы данные, полученные в ходе предыдущей работы «Влияние сенной палочки (*Bacillus subtilis*) на скорость прорастания пшеницы (*Triticum*)».

Сенная палочка обладает бактерицидными, защитными и противомикробными свойствами, является стимулятором роста растений. Для того, чтобы создать полноценную подкормку, был проведён ряд экспериментов по добавлению к раствору сенной палочки наночастиц меди, обладающих противобактериальными и противогрибковыми свойствами. Наночастицы меди усилили и дополнили свойства сенной палочки.

По результатам работы был создан раствор (состоящий из наночастиц, разбавленных в 5 раз и сенной палочки), который показал наилучшие результаты стимуляции роста бобовых культур и биоцидные свойства. По сравнению с контролем побег вырос в 1,4 раза; корень оказался в 1,218 раз длиннее.

В ходе микробиологического анализа была выявлено, что в образце с сенной палочкой и наночастицами в 5 раз содержатся только граммотрицательные микроорганизмы, что доказывает антибактериальные и противомикробные свойства комплексного препарата.

Литературный обзор

1. Сенная палочка: [Электронный ресурс]
https://ru.wikipedia.org/wiki/Сенная_палочка (дата обращения 25.12.2020).

2. Сенная палочка для человека. Вред и польза: [Электронный ресурс]
<https://odermat.ru/sennaya-palochka-dlya-cheloveka-vred-i-polza.html> (дата обращения 27.12.2020).

3. Получение культуры сенной палочки: [Электронный ресурс]
http://labx.narod.ru/documents/bacillus_subtilis.html (дата обращения 27.12.2020).

4. Е. М. Васильева, Т. В. Горбунова, Л. И. Кашина Эксперимент по физиологии растений в средней школе: пособие для учителей - Москва: Просвещение, 1978 (дата обращения 28.12.2020)

5. Изучение спор сенной палочки: [Электронный ресурс] (дата обращения 28.12.2020)

6. Структура, свойства и токсичность наночастиц оксидов серебра и меди/И.Н. Андрусичина, И.А. Голуб, Г.Г. Дидикин, С.Е. Литвин, В.Ф. Горчев, В.А. Мовчан//Біотехнологія. -2011. -Т. 4. -№ 6. -С. 51-59. (дата обращения 13.12.2021)

7. Влияние водных дисперсных систем с наночастицами серебра и меди на прорастание семян/С.Н. Маслоброд, Ю.А. Миргород, В.Г. Бородина, Н.А. Борщ//Электронная обработка материалов. -2014. -Т. 50. -№ 4. -С. 103-112. (дата обращения 13.12.2021)

8. Гладкова, М.М. Инженерные наноматериалы в почве: Источники поступления и пути миграции/М.М. Гладкова, В.А. Терехова//Вестн. Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. -2013. -№ 3. -С. 34-39. (дата обращения 15.12.2021)

9. Влияние загрязнения наночастицами оксидов никеля и железа на биологические свойства чернозема обыкновенного североприазовского/С.И. Колесников, А.Н. Тимошенко, К.Ш. Казеев, Ю.В. Акименко//Известия вузов.

Северо-Кавказский регион. Естественные науки. -2016. -Т. 1. -С. 71-75. (дата обращения 15.12.2021)

10. Применение наночастиц меди в аграрной промышленности: [Электронный ресурс] https://nmt-9.com/copper_effect (дата обращения 15.12..2021)

11.Препарат на основе наночастиц меди для длительной противовирусной обработки: [Электронный ресурс] <https://misis.ru/university/news/misc/2020-04/6622/> (дата обращения 16.12.2021)

12.Медь и её значение в медицине [Электронный ресурс] <https://cyberleninka.ru/article/n/med-i-ego-znachenie-v-medicine> (дата обращения 29.12.2021)

13. Изучение антибактериального действия наночастиц меди и железа на клинические штаммы staphylococcus aureus [Электронный ресурс] https://ssmj.ru/system/files/201001_011_014.pdf (дата обращения 29.12.2021)

14. Антибактериальные свойства полимерных композитов с наноразмерными частицами меди [Электронный ресурс] <https://cyberleninka.ru/article/n/antibakterialnye-svoystva-polimernyh-kompozitov-s-nanorazmernymi-chastitsami-medi> (дата обращения 10.12.2021)

Приложение



Рис.1 и 2. Приготовленная сеной палочки

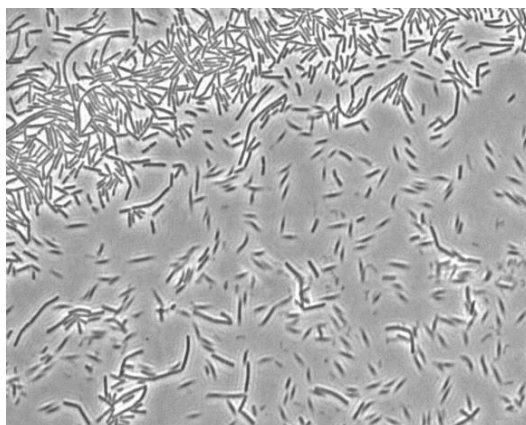


Рис.3. Фото полученной сеной палочки под микроскопом

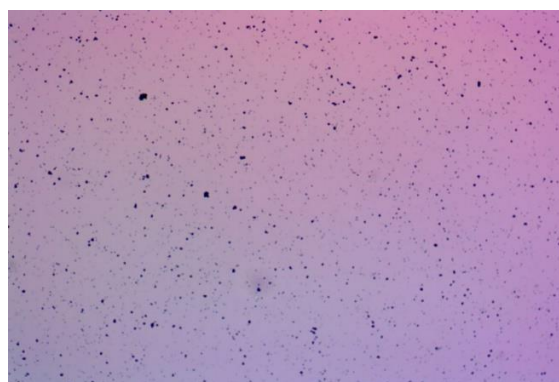
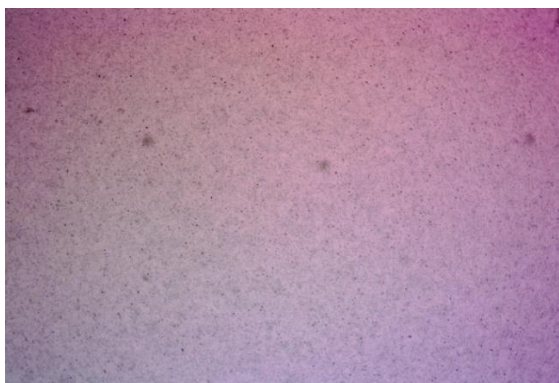


Рис.4. Наночастицы меди с разными стабилизаторами: с ПВП и крахмалом

Таблица 1

Схема первоначального эксперимента

Раствор	Сенная палочка	Наночастицы меди	Вода
1.Сенная палочка	40 мл	-	-
2.Наночаст.меди, разбавленные в 5 раз	-	5 мл	25 мл
3.Наночаст.меди в 10	-	3 мл	30 мл
4.Наночаст.меди в 15 раз	-	2 мл	30 мл
5.Наночаст.меди в 20 раз	-	2 мл	40 мл
6.Сенная палочка+наночаст.меди в 5 раз	20 мл	4 мл	20 мл
7.Сенная палочка+наночаст.меди в 10 раз	20 мл	2 мл	20 мл
8.Сенная палочка+наночаст.меди в 15 раз	30 мл	2 мл	30 мл
9.Сенная палочка+наночаст.меди в 20 раз	20 мл	1 мл	20 мл
10.Контрольный образец	-	-	40 мл- проточной

Таблица 2

Схема полива

	Дата	Кол-во раствора
1 полив	07.10	6 мл
2 полив	09.10	4 мл
3 полив	10.10	4 мл
4 полив	14.10	5 мл
5 полив	16.10	4 мл
6 полив	21.10	6 мл

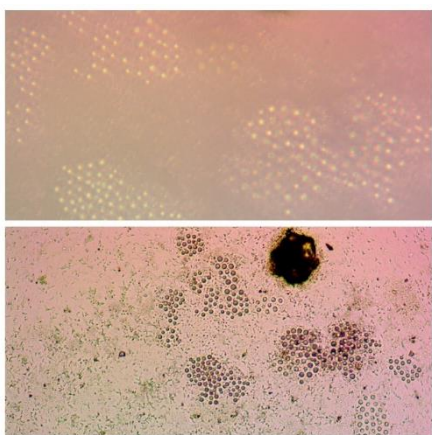


Рис.5. Почвенные бактерии / бактерии, обработанные суспензией

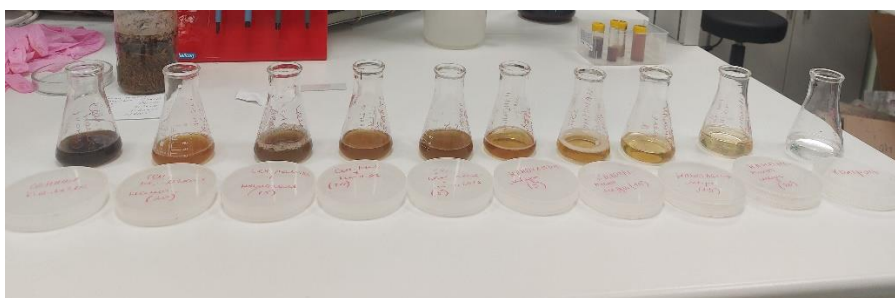


Рис.6. Приготовление растворов



Рис.7. День 3 после посадки



Рис.8. Споры плесени на контроле



Рис. 9. День 7 после посадки (растворы 2,1,4)



Рис. 10. День 8 после посадки (растворы 4,1)



Рис.11. День 3 после посадки



Рис.12. Контрольный образец на 3 день после посадки



Рис.13 День 7 после посадки



Рис.14. Контрольный образец на 7 день посадки



Рис.15. День 9 после посадки



Рис.16. Контрольный образец
на 9 день после посадки

Таблица 3

Длина образцов на 9 день эксперимента

	Длина образцов Контр.обр(мл)	Н.ч.в 5	Н.ч. в 15	Сен.п.	Сен.п.+н.ч.в 5
Дата					
09.12	13,6	4	16,55	11,2	12,8
13.12	16,3	14,1	19,85	14,25	18,75
16.12	18,4	15,25	20,4	18,75	23,75
21.12	19	17,6	22,5	20,3	26,5



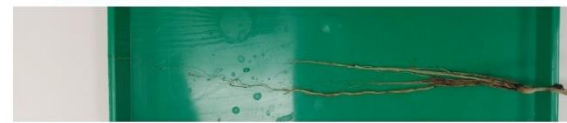
Контрольный образец



Сенная палочка + наночастицы в 5 раз



Сенная палочка



Наночастицы в 5 раз



Наночастицы в 15 раз

Рис.17. Корневая система образцов



График 1. Длина корня

Таблица 4

Длина корневой системы

Варианты	Длина корня
Контрольный образец	16,5
Сенная палочка	21
Наночастицы меди в 15 раз	24
Наночастицы меди в 5 раз	19
Сенная палочка+ наночастицы меди в 5 раз	20,1

Таблица 5

Таблица распространения бактерий

Характеристика	Контроль	Сенная палочка	Наночастицы в 15 раз	Наночастицы в 5 раз	Сенная палочка+ наночастицы в 5 раз
Рост бактерий	Выявлен	приостановлен	приостановлен	приостановлен	не выявлен
Площадь распространения	>95%	<75%	<85%	<80%	<80%



Рис.18. Обрастание комочков почвы на среде МПА

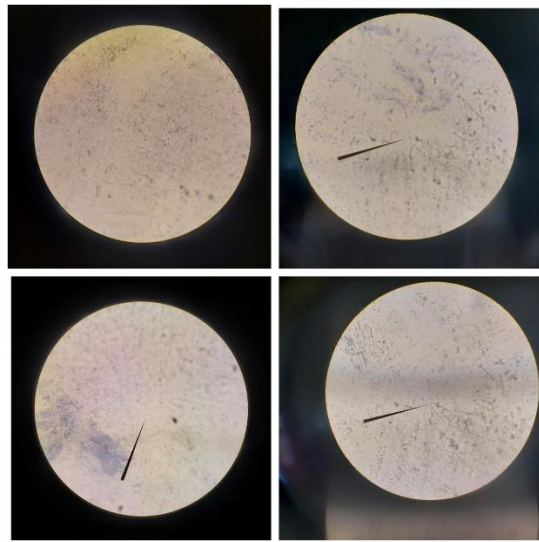


Рис.19. Результаты окраски по Грамму



Рис.20. Окраска по Грамму (контроль)