

Всероссийский конкурс научно-технологических проектов «Большие вызовы»
в 2022/23 учебном году

Исследовательская работа

**«Изучение влияния фитонцидов комнатных растений на рост
микроорганизмов»**

Направление « *Агропромышленные
и биотехнологии* »

Выполнила:

Тищенко Александра Павловна,
ученица 7 класса МБОУ СОШ №52
г. Брянск

Руководитель:

Захарова Оксана Николаевна,
кандидат ветеринарных наук,
старший методист
ГАНОУ «РЦПД»

Брянск

2023

Содержание

Введение.....	3
1. Обзор литературы.....	
1.1. Что такое фитонциды.....	4
1.2 Классификация фитонцидов.....	4
1.3 Комнатные растения, обладающие бактериальными свойствами.....	6
2. Материалы и методы исследования.....	9
3. Результаты исследования и их обсуждение.....	11
3.1 Приготовление водно-спиртовых экстрактов комнатных растений.....	11
3.2 Изучение влияния экстрактов комнатных растений на микрофлору воздуха	11
3.3 Определение антибактериальной активности экстрактов комнатных	
растений с помощью тест - культуры <i>Bac.subtilis</i>	13
3.4 Влияние фитонцидов комнатных растений на развитие плесневых грибов...	13
Выводы.....	15
Дальнейшие перспективы развития проекта.....	16
Список литературы.....	17

Введение

Распространенность микробных инфекционных заболеваний и их осложнений постоянно увеличивается во всем мире, в основном за счет лекарственной устойчивости микробов к широко применяемым противомикробным препаратам. Потребность в новых противомикробных препаратах, которые могли бы эффективно бороться с резистентными микробами, чрезвычайно возросла. По данным центра космических исследований США и Кёльского университета, воздух в городских домах и офисах содержит более 200 различных токсических субстанций. Присутствие паров формальдегида, ацетона, метанола, бензола - всё это результат цивилизации. Поэтому у людей, проводящих долгое время в закрытых помещениях, всё чаще появляется чувство тошноты, аллергия, катар верхних дыхательных путей. В этих условиях нормальное развитие и здоровье детей во многом зависят от качества среды обитания закрытых помещений – школ, детсадов и т. д. Защищаясь от пыли и шума, современные помещения становятся все более герметичными, и концентрация потенциально опасных веществ в них увеличивается. Снижение факторов риска можно достичь средствами озеленения. Поэтому тема исследовательской работы интересна и актуальна.

Проблема: Устойчивость микроорганизмов к химическим антибактериальным препаратам.

Актуальность работы - необходимость поиска экологически безопасных и, с учетом растущей устойчивости микроорганизмов к химическим антибактериальным препаратам, эффективных средств защиты окружающей современного человека среды от патогенных микроорганизмов. Растительные фитонциды, как правило, не нарушают баланс естественной микрофлоры человека, не загрязняют окружающую среду, к ним реже вырабатывается устойчивость микроорганизмов.

Цель исследования- изучить влияние фитонцидов комнатных растений на рост микроорганизмов.

Гипотеза: фитонциды комнатных растений обладают антибактериальными свойствами.

Для достижения цели мы поставили перед собой следующие **задачи исследования:**

1. Провести анализ информации из источников по данной теме.
2. Приготовить экстракты растений на спиртовой основе.

3. Изучить влияние экстрактов комнатных растений на микрофлору воздуха микробиологическим методом.
4. Выявить антибактериальную активность экстрактов комнатных растений с помощью тест - культуры *Bac.subtilis*.
5. Оценить влияние экстрактов комнатных растений на сохранность продуктов питания.

1. Обзор литературы

1.1. Что такое фитонциды

Фитонциды – (фито- (греч.) – «растение», цидо- (лат.) – «убиваю») -это образуемые растениями биологически активные вещества разнообразной химической природы. Они обладают способностью тормозить развитие бактерий, вирусов, простейших одноклеточных животных, микроскопических грибов и даже убивать их.

Сам термин фитонциды – был предложен русским учёным Б.П.Токиным в 1934 году для обозначения летучих веществ, обладающих антимикробными свойствами, которые выделяются растениями. Б. П. Токин в 1928 г. описал интересное наблюдение: если на предметное стекло нанести кашицу из растертого лука или чеснока, а рядом капельку воды, в которой плавают инфузории, то через несколько минут клетки погибнут. Подобные опыты были поставлены со многими растениями и различными микроорганизмами, и результат в той или иной степени повторялся. Лабораторией профессора Б.П. Токина было обнаружено более 500 видов растений, обладающих фитонцидными свойствами. На основании многочисленных исследований было установлено время гибели простейших после бесконтактного воздействия фитонцидных растений [2].

Кроме того, Б. П. Токин обратил внимание на то, что пищевые продукты, приготовленные на восточных базарах, в антисанитарных условиях, не вызывают вспышек инфекционных заболеваний. Ученый предположил, что обилие восточных пряностей каким-то образом предохраняет пищу от порчи. Он исследовал вещества, содержащиеся в пряностях, и обнаружил, что антисептическое действие дают летучие компоненты. Эти «летучие яды растений» он предложил назвать фитонцидами.

1.2 Классификация фитонцидов

Фитонциды – главный фактор иммунитета растений, это защитники от болезнетворных микробов человека и животных. Фитонцидами называют все

секретируемые растениями фракции летучих веществ, в том числе те, которые практически невозможно собрать в заметных количествах. Их называют также «нативными антимикробными веществами растений» (Аникеев, 1983).

С химической точки зрения фитонциды – это комплекс газообразных и легко испаряющихся соединений, в состав которых могут входить как неорганические, так и органические соединения: простые соединения типа сильной кислоты и аммиака, предельные и непредельные углеводороды, летучие формальдегиды, спирты, эфиры низкомолекулярных жирных кислот, смолы. Таким образом, фитонцидные комплексы имеют сложный химический состав, который и обуславливает специфичность их действия на разные группы микроорганизмов (табл.1).

Таблица 1.

Виды фитонцидов

Бактерицидные, фунгицидные и протистоцидные фитонциды, продуцируемые высшими и низшими растениями, а также фитонциды, стимулирующие жизнедеятельность определённых групп организмов	Б. Фитонциды, токсичные для насекомых, клещей, червей и других макроорганизмов	В. Фитонциды высших и низших растений, стимулирующие или тормозящие прорастание пыльцы, рост и развитие других растений
1. Воздушные фитонциды (летучие фракции фитонцидов)		
2. Почвенные фитонциды (жидкости и летучие вещества, продуцируемые подземными частями растений)		
3. Водные фитонциды (продуцируемые водными растениями)		
Неэскреторные фитонциды		Эскреторные фитонциды
1. Нативно-активные		1. Летучие фракции
2. Внеклеточно-активные		2. Жидкости

Растения вырабатывают фитонциды для того, чтобы обеспечить себе защиту от бактерий, грибков и др. микроорганизмов, которые могут вызвать различные заболевания. Количество фитонцидов, выделяемых растением, изменяется в ходе онтогенеза, увеличивается при ранении растения. По словам профессора Б.П. Токина растение с помощью фитонцидов «само себя стерилизует». В здоровом растении фитонциды участвуют также в разнообразных обменных процессах [1].

Фитонциды разных видов растений различны по своему составу и действию. Защитная роль фитонцидов проявляется не только в уничтожении микроорганизмов, но и в подавлении их размножения, в стимулировании жизнедеятельности

микроорганизмов, являющихся антагонистами патогенных форм для данного растения, в отпугивании насекомых и т.д. Есть фитонциды, содержащиеся в тканях растений в растворенном виде, и летучие фракции фитонцидов, выделяемые в атмосферу, почву, воду (у водных растений). Летучие фитонциды способны оказывать своё действие на расстоянии, например, фитонциды листьев дуба, эвкалипта, сосны и др. Кроме того летучие фитонциды вызывают появление отрицательных ионов в воздухе и снижают в нем содержание тяжелых положительно заряженных ионов, что хорошо влияет на самочувствие и здоровье человека.

Активные фитонциды содержатся в луке и чесноке: пары и вытяжки из них убивают холерный вибрион, дифтерийную палочку, гноеродных микробов. По родовому латинскому названию чеснока – *allium* – его активное начало названо аллицином. Стоит пожевать несколько минут чеснок, как большинство бактерий, живущих в полости рта, погибают. Употребление растений с высоким содержанием фитонцидов способствует освобождению от микробов полости рта и желудочно-кишечного тракта. Бактерицидные свойства растений используются при профилактике и лечении многих заболеваний, в частности, верхних дыхательных путей [3].

1.3 Комнатные растения, обладающие бактериальными свойствами

В настоящее время ведутся исследования по подбору видов комнатных растений, обладающих бактерицидными и протистацидными свойствами, способными вызвать гибель бактерий и одноклеточных организмов. Фитонцидные свойства выявлены более чем у 40 видов оранжерейных растений. Учеными был составлен ассортимент комнатных растений тропического происхождения, которые можно использовать для профилактических и лечебных целей дома и в местах массового скопления людей: в детских садах, школах, лечебно-профилактических и других учреждениях, которые можно объединить в 3 группы:

1-я группа – растения, летучие выделения которых обладают выраженной антибактериальной, антивирусной, антифунгальной активностью в отношении воздушной микрофлоры (сансевьера трехполосная, диффенбахия пятнистая, сциндапус пестрый, циссус антарктический, тетрастигма Вуанье, пеларгония (герань) душистейшая, колеус, кипарис вечнозеленый пирамидальный, олеандр обыкновенный, самшит вечнозеленый, фикус Бенджамина).

2-я группа – растения, летучие выделения которых улучшают сердечную деятельность, повышают иммунитет, обладают успокаивающим,

противовоспалительным и другими лечебными действиями (монстера привлекательная, пеларгония (герань) душистейшая, жасмин Самбак, мирт обыкновенный, лимон).

3-я группа – растения- фитофильтры, поглощающие из воздуха вредные газы. Например, комнатное растение спатифиллум способно поглощать ацетон, нефролепис и фикусы поглощают формальдегид. К этой же группе растений относятся: хлорофитум хохлатый, фикус Бенджамина, циссус антарктический [5].

Характеристика некоторых комнатных растений

1. Сансевиерия (лат. Sansevieria)

Сансевиерия, или щучий хвост, содержит такие биологически активные вещества, как:

- Гемолитический сапогенин
- Органические кислоты
- Абамагенин
- Эфирные масла
- Сапонины

2. Шлюмбергера (лат. Schlumbergera)

3. Тигровая бегония (лат. Begonia bowerae)

В составе зеленых частей бегонии обилие разнообразных микро- и макроэлементов:

- калий, кальций, магний и цинк;
- органические кислоты;
- белки и сахар;
- сапонины;
- алкалоиды;
- слизистое, смолистое вещество.

Все части растения содержат кислоты: янтарную, аскорбиновую, в некоторых сортах есть щавелевая. В листьях растения присутствуют жирные кислоты (олеиновая, линолевая).

4. Сенполия (лат. Saintpaulia)

Надземная часть сенполии содержит:

- Флавоноиды
- Антоцианы(виоланин)
- Метилловый эфир кислоты салициловой
- Каротиноиды

- Сапонины
- Слизь (до 25 %)

5. Алоэ Вера (лат. *Áloë véra*)

Листья алоэ содержат:

- Антрахиноновые гликозиды
- Алоин
- Алоэзин (до 15%)
- Алоэ-эмодин (1,66%)
- Наталоин
- Гомонаталоин
- Рабарберон
- Полисахариды
- Стероиды
- Гелонины
- Хромоны
- Смолистые вещества (до 20%)
- Следы эфирных масел.

6. Фигус Бенджамина (лат. *Ficus Benjamina*)

В химический состав фикуса входят:

- Флавоноиды(рутин)
- Фурукумарины
- Псорален бергаптен
- Пальмовая кислота
- Триоксистероидный сапонин(фикусогенин)
- Эфирное масло.

7. Замиокулькас (лат. *Zamiocúlcas*)

8. Герань (лат. *Geranium*)

В корнях герани содержатся:

- Дубильные вещества
- Фенолкарбоновые кислоты
- Сапонины
- Углеводы в виде крахмала, сахарозы и глюкозы

- Флавоноиды.

В надземной части герани содержатся витамины К, С и каротин. Цветок содержит витамин С. В семенах - лейкоцианидин.

2. Материалы и методы исследования

Материалы, необходимые для исследования: комнатные растения (Сансевиерия, Шлюмбергера, Тигровая бегония, Сенполия, Алое Вера, Фикус Бенджамина, Замиокулькас, Герань), спирт, питательные среды, продукты питания (хлеб), весы электронные, термостат, паровой стерилизатор, сухожаровой шкаф, лабораторная посуда.

Исследования проводились в лаборатории Регионального центра выявления, поддержки и развития способностей и талантов у детей и молодежи г. Брянска.

Методы исследования

Стерилизация лабораторной посуды

Под стерилизацией (обеспложиванием) понимают полное уничтожение микроорганизмов и их спор в питательных средах, посуде, на инструментах и других предметах лабораторного оборудования. Стерилизация проходила в автоклаве при 120⁰С в течение 15-20 мин.

Приготовление водно-спиртовых экстрактов комнатных растений

Для получения тканевого сока из растений приготовили кашицы, растирая листья растений с помощью пестика и ступки. Залили небольшим количеством 40% раствора спирта. Оставили настаиваться на сутки. Фильтровали экстракты в стерильную посуду. Готовые экстракты комнатных растений хранили в холодильнике.

Приготовление питательной среды

Среды сухие, производство г. Оболенск (ГНЦ ПМБ)

Приготовление ГРМ – агар: к 1 л дистиллированной воды добавляют 38 г агара. Приготовление среды Сабуро: к 1л дистиллированной воды 76 г агара. Среды нагревают до растворения агара (температура его плавления — 100⁰ С, затвердевания — 40⁰ С), фильтруют, определяют рН. Далее подготовленные питательные среды стерилизуют в автоклаве при 120⁰ С течение 15-20 мин.

Посев микроорганизмов седиментационным методом

Седиментационный метод предложен Р. Кохом, заключается в способности микроорганизмов под действием силы тяжести и под влиянием движения воздуха (вместе с частицами пыли и капельками аэрозоля) оседать на поверхность питательной среды в открытые чашки Петри. Чашки устанавливаются в точках отбора на горизонтальной поверхности. При определении общей микробной обсемененности чашки с питательной средой оставляют открытыми на 5—10 мин. Затем чашки закрывают и помещают в термостат при температуре 37 °С на 48 часов. Для пересчёта количество микробов на 1 м³ воздуха использовали формулу В.Л.Омелянского.

$$X = \frac{A \times 100 \times 1000 \times 5}{v \times 10 \times T}$$

где X – количество микробов в 1 м³ (1000 л) воздуха;

A – число колоний, выросших на питательной среде в чашках;

v – площадь чашки (78 см²);

5 – время экспозиции по правилу Омелянского;

T – время, в течение которого чашка была открыта;

10 – 10 л воздуха по правилу Омелянского;

1000 – 1 м³ воздуха;

100 – 100 см² питательной среды.

Метод диффузии в агар

В качестве тест - культуры использовали *Bac.subtillis*. Тестируемые микроорганизмы инокулировали в питательный бульон и инкубировали 24 часа при 37°С. Перед формированием лунок на поверхность питательного агара наносили 0,1 мл бульонной культуры микроорганизма и распределяли по поверхности шпателем Дригальского. Затем формировали лунки, в которые заливали образцы экстрактов комнатных растений, не допуская переливания через край лунки. После инкубации чашек Петри наблюдали за образованием светлой зоны (зоны лизиса) вокруг лунки, что соответствует антимикробной активности тестируемых объектов [4].

Влияние фитонцидов комнатных растений на развитие плесневых грибов

Для исследования на поверхность подготовленных кусочков черного хлеба нанесли по несколько капель экстрактов комнатных растений. На контрольный образец – несколько капель воды, так как для роста плесневых грибов необходимы влажные условия. Затем куски хлеба поместили в полиэтиленовые пакеты.

Второй вариант- в отдельные полиэтиленовые пакеты поместили кусочки черного хлеба и части растений комнатных растений для определения влияния летучих фитонцидов на рост плесневелых грибов.

3. Результаты исследования и их обсуждение

3.1. Приготовление водно-спиртовых экстрактов комнатных растений

Выбрали комнатные растения для исследования. Листья растений измельчили стерильными ножницами, растерли пестиком до состояния кашицы в ступке. Залили 40%- раствором спирта этилового.

Оставили на сутки для экстрагирования тканевых соков, по истечении срока экстракты профильтровали. Хранили в холодильнике при 4-6 °С.

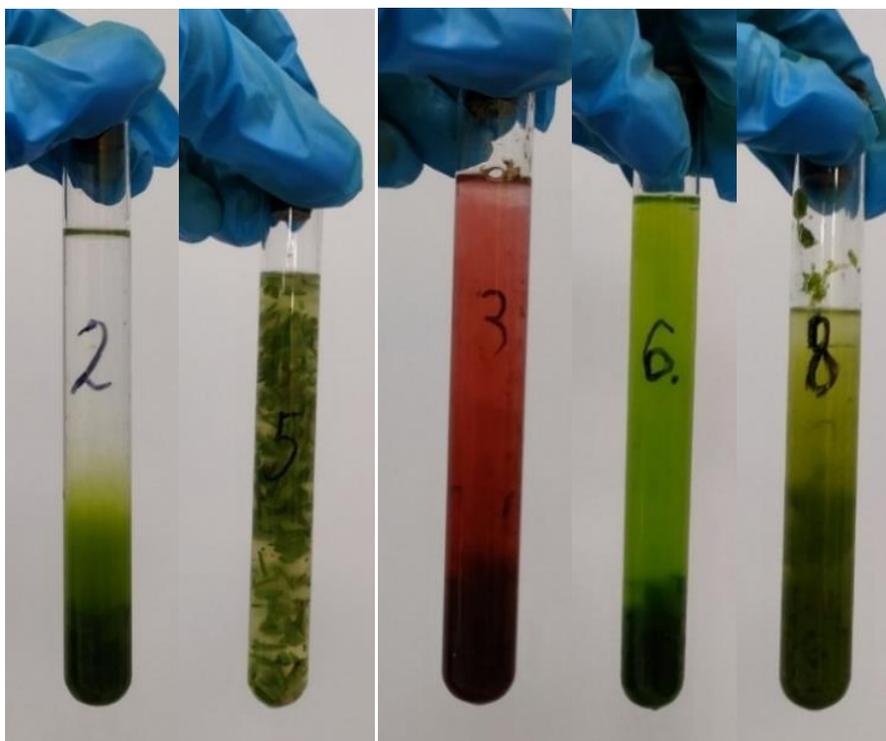


Рис. 1. Экстракты комнатных растений

3.2. Изучение влияния экстрактов комнатных растений на микрофлору воздуха

В чашки Петри с питательной средой Сабуро добавили экстракты комнатных растений. Выполнили посев воздуха седиментационным способом (таблица 2).

Таблица 2.

Результаты определения микробной чистоты воздуха

Номер образца	Вид комнатного растения	Количество микроорганизмов, КОЕ/ г
1	Сансевиерия	Сплошной рост
2	Шлюмбергера	9×10^1 КОЕ / г
3	Тигровая бегония	1×10^1 КОЕ/ г
4	Сенполия	1×10^1 КОЕ/ г
5	Алое Вера	Сплошной рост
6	Фикус Бенджамина	1×10^1 КОЕ/ г
7	Замиокулькас	1×10^1 КОЕ/ г
8	Герань	8×10^1 КОЕ/ г
Контроль	–	Сплошной рост

Было установлено, что экстракты комнатных растений обладали противомикробной активностью. В образцах № 6 (фикус Бенджамина), № 4 (сенполия), № 3 (тигровая бегония) присутствовало минимальное количество микроорганизмов. В образцах № 1 (сансевиерия), № 5 (алое вера) и контрольном образце, в который не вносили экстракты комнатных растений, обнаружили сплошной рост микроорганизмов (рис.2).



Рис.2. Рост микроорганизмов на среде Сабуро

3.3. Определение антибактериальной активности экстрактов комнатных растений с помощью тест - культуры *Bac.subtilis*

На питательную среду ГРМ - агар наносили тест-культуру *Bac.subtilis*. Посев выполняли «газоном», чтобы обеспечить максимальное покрытие поверхности питательной среды микроорганизмами. В центральную лунку вносили экстракты растений. Рост микроорганизмов вокруг центральной лунки с экстрактом задерживался в образцах № 3 (тигровая бегония) и № 6 (фикус Бенджамина), обнаруживали прозрачную зону лизиса. Такая картина свидетельствует о наличии антибактериальной активности у исследуемых образцов. Остальные образцы не проявили антибактериальную активность (рис.3).

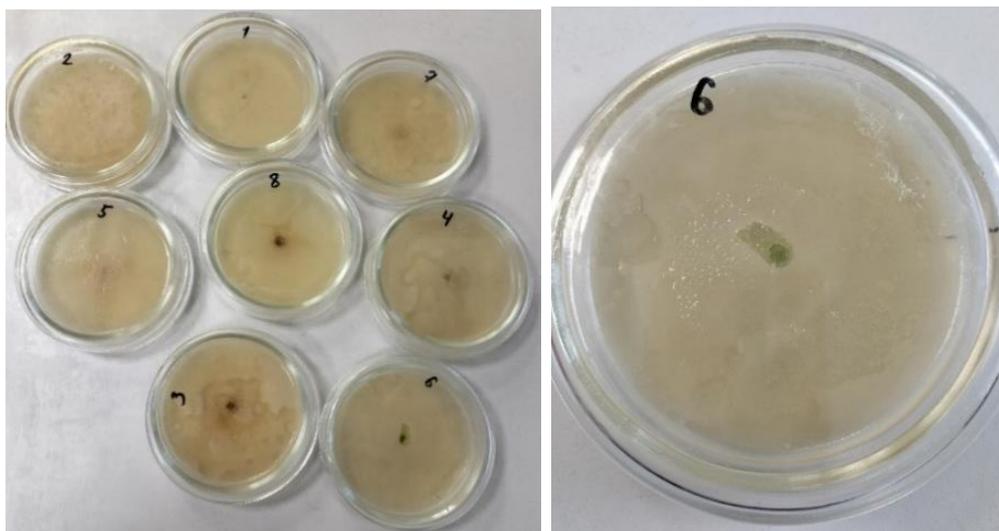


Рис. 3. Определение антибактериальной активности экстрактов комнатных растений

3.4 Влияние фитонцидов комнатных растений на развитие плесневых грибов

Для изучения влияния летучих фракций фитонцидов комнатных растений провели следующий эксперимент. В полиэтиленовые пакеты помещали кусочек черного хлеба и листья комнатных растений. Выдерживали несколько дней до появления плесени. Учитывали результаты по скорости образования плесневых грибов на поверхности кусочка хлеба и сравнивали с контрольным образцом. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Влияние фитонцидов на скорость роста плесневых грибов
(листья - летучие фракции)

	1	2	3	4	5	6	7	8	Контр.
На 3 день	–	–	–	–	–	–	–	–	–
На 7 день	–	–	–	–	–	–	–	–	–
На 8 день	–	–	+	–	+	–	+	+	–
На 10 день	–	–	+	+	+	–	+	+	+
На 11 день	+	+	+	+	+	–	+	+	+
На 13 день	+	+	+	+	+	–	+	+	+

В течение первых 7 суток рост плесневых грибов не наблюдался. На 8-е сутки рост грибов обнаружили в образцах № 3, 5, 7 и 8. На 10-е сутки количество образцов с

ростом грибов увеличилось, добавились образец № 4 и контрольный образец. К 11- м суткам в образцах № 1 и №2 отмечали характерный рост. Лишь образец № 6 (фикус Бенджамина) к 14- м суткам остался без изменений, роста грибов не было обнаружено, что свидетельствует о наличии противомикробных свойств в выделяемых фитонцидах.

Второй вариант эксперимента- наносили на кусочек черного хлеба несколько капель экстракта комнатных растений, помещали в полиэтиленовые пакеты и отмечали скорость роста плесневых грибов. Результаты представлены в таблице 4.

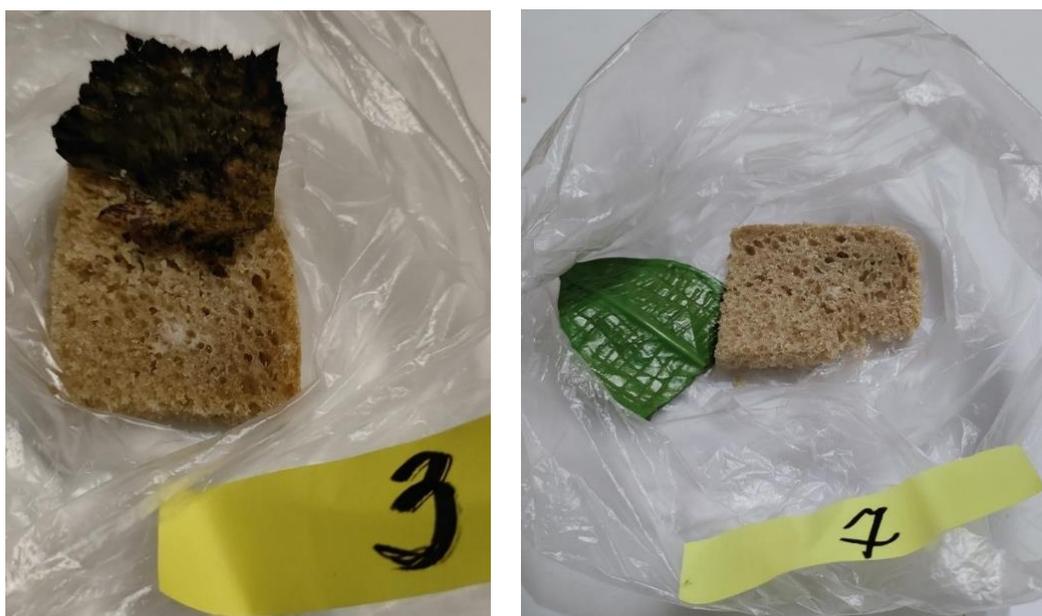


Рис. 4. Образцы чёрного хлеба с листьями растений

Таблица 4.

Влияние фитонцидов экстрактов на скорость роста плесневых грибов

	1	2	3	4	5	6	7	8	Контр.
На 3 день	–	–	–	–	–	–	–	–	–
На 7 день	–	–	–	–	–	–	–	–	–
На 8 день	–	–	–	–	–	–	–	–	–
На 10 день	+	–	+	–	–	–	+	+	+
На 11 день	+	–	+	–	–	+	+	+	+
На 13 день	+	–	+	–	+	+	+	+	+

Рост грибов отмечали на 10-е сутки в образцах № 1, 3, 7, 8 и в контрольном образце. На 11- е сутки количество образцов с ростом грибов увеличилось, в образце № 6 наблюдали характерный рост грибов. К 13- м суткам только в образцах № 2

(шлюмбергера) и № 4 (сенполия) не отмечали характерный рост грибов, что свидетельствует о присутствии в экстрактах этих комнатных растений противомикробных свойств.



Рис. 5. Образцы чёрного хлеба с экстрактами растений

Выводы

1. Фитонциды, содержащиеся в экстракте фикуса Бенджамина, сенполии, тигровой бегонии задерживают рост микроорганизмов и благотворно влияют на микрофлору воздуха в помещении.
2. Образцы № 3 (тигровая бегония) и № 6 (фикус Бенджамина) обладают высокой антибактериальной активностью по отношению к тест-культуре *Bac.subtilis*.
3. Летучие фитонциды образца №6 (фикус Бенджамина) обладают противогрибковой активностью.
4. Экстракты образцов №2 (шлюмбергера) и № 4 (сенполия) подавляют рост плесневых грибов.

Дальнейшие перспективы развития проекта

Комнатные растения действительно обладают противомикробной активностью, очищают воздух, обогащая его кислородом и подавляя рост патогенных микроорганизмов. Хотелось бы продолжить исследование о влиянии комнатных растений на сохранность продуктов. Нами было сконструировано с помощью 3D-ручки саше, куда помещаются листья комнатных растений. Дальнейшее использование- размещение в холодильнике для создания благоприятного микроклимата, воздействие

на патогенных микроорганизмов и влияние на сохранность продуктов. Это исследование планируем провести в ближайшие сроки и возможно к защите работы на конкурсе «Большие вызовы» уже сможем представить полученные результаты.

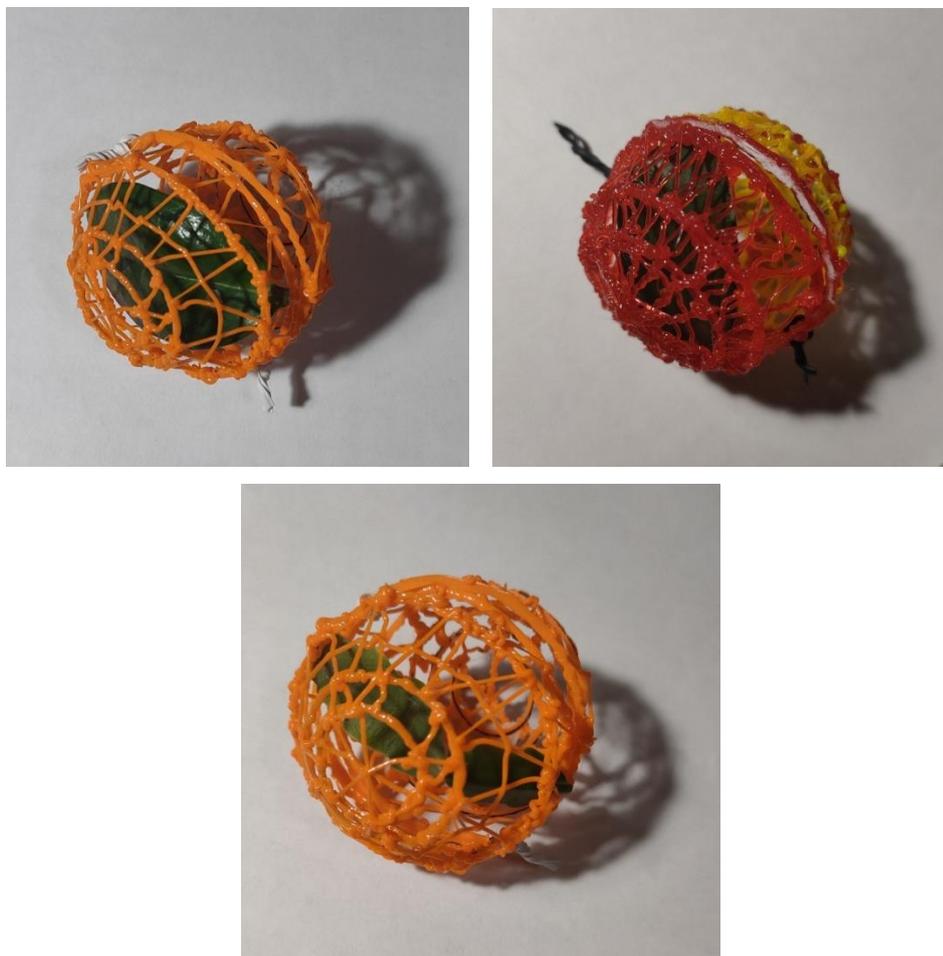


Рис. 6. Фото конструкции саше

Список литературы

1. Аракелян И. Г. Изучение антимикробных свойств различных растений / И. Г. Аракелян, А. М. Магомедкеримова, И. Ф. Прасолова. — Текст: непосредственный // Молодой ученый. — 2022 — № 27 (422). — С. 201-204.
2. Власенко Е.Н. Целительные свойства комнатных растений / Е. А. Власенко. — М.: ОЛМА Медиа Групп, 2012. - 223 с.
3. Лыков И. Н. Загрязнение различных поверхностей антибиотико-резистентными микроорганизмами / И.Н. Лыков, Т.А. Голик, А.А.Жихор, А.Н.Ушакова // Молодой учёный. —2021 — № 33(375).- С. 77–81.

4. Лыков И. Н. Лабораторный практикум по общей микробиологии: учебное пособие для студ. высш. учебн. заведений Калуга: Издатель Захаров С. И. («СерНа»), 2020. — 244 с.

5. Хессайон Д.Г. Всё о комнатных растениях/ М.: Кладезь - Букс, 2000.