

Муниципальное автономное общеобразовательное учреждение «Гимназия №9»
Красноярский край, г. Назарово
662200, Красноярский край, г. Назарово, Кузнечная ул., д. 6
(39155) 7-00-92, scool9@nazarovo.krskcit.ru

Кружок юных биологов «Экоотряд»

Всероссийский конкурс школьных лесничеств имени Г.Ф. Морозова
Номинация: Жизнь леса

Исследовательская работа:

**Влияние термической обработки на фитонцидную продуктивность
некоторых недревесных лесных ресурсов**

Выполнила: Шагидуллина Алиса Ильдаровна,
ученица 6 класса МАОУ «Гимназия №9» г. Назарово Красноярский край

Руководитель: Лисунова Наталья Леонидовна,
Учитель биологии МАОУ «Гимназия №9» г. Назарово Красноярский край

Научный руководитель - Ерохина Зоя Валерьяновна,
канд. с.-х. наук, доцент кафедры Лесоводства, охраны и защиты леса
Института лесных технологий СибГУ им. ак. М.Ф. Решетнёва.

Содержание

Введение	2
Глава 1. Теоретическая часть	4
Глава 2. Методики исследования	6
Глава 3. Экспериментальная часть	8
Выводы	10
Список литературы	10
Приложение	11

Введение

Актуальность исследования. В современном мире наблюдается устойчивый рост. Развитие лесного комплекса сегодня невозможно без комплексного подхода к использованию всех ресурсов леса. Наряду с древесиной, особое значение приобретают недревесные лесные ресурсы, особенно дикорастущие ягоды - клюква и брусника, черемша (дикий лук). Эти виды имеют не только пищевую ценность, но и содержат уникальные биологически активные соединения - фитонциды, обладающие выраженной антимикробной активностью.

Проблема исследования заключается в противоречии между потенциальной ценностью дикоросов как источника природных антимикробных веществ и фактическим использованием их преимущественно в пищевых целях после интенсивной термической обработки. Существующие технологии переработки лесных ягод и черемши, часто не учитывают сохранение их фитонцидной активности, что приводит к потере значительной части биологической ценности сырья. Это снижает экономическую эффективность заготовки дикоросов и не позволяет в полной мере реализовать потенциал лесного комплекса в области производства функциональных продуктов и фитопрепаратов.

Отсутствие научно обоснованных данных о влиянии различных режимов термической обработки на фитонцидные свойства лесных ягод и дикого лука ограничивает возможности разработки технологий их рациональной переработки с максимальным сохранением биологической активности.

Цель исследования - Экспериментальная оценка и сравнение влияния различных видов термической обработки на фитонцидную активность лука репчатого (*Allium cepa*), чеснока посевного (*Allium sativum*), плодов клюквы обыкновенной (*Vaccinium oxycoccos*) и брусники (*Vaccinium vitis-idaea*).

Задачи исследования

1. Отобрать и подготовить стандартные образцы растительного сырья (лук, чеснок, клюква, брусника).
2. Определить исходную фитонцидную активность свежего сырья в отношении тест-культур микроорганизмов (например, Инфузорий *Paramecium caudatum*).
3. Подвергнуть образцы различным видам термической обработки:
 - Кратковременному бланшированию (1-3 мин при 90-100°C).
 - Длительной варке (10-15 мин при 100°C).
4. Оценить фитонцидную активность полученных после обработки образцов с использованием тех же тест-культур и методов (метод агаровых лунок).
5. Провести сравнительный анализ полученных данных, выявить наиболее и наименее устойчивые к термическому воздействию виды сырья.

6. Разработать практические рекомендации по щадящим режимам обработки для сохранения фитонцидной активности исследуемых растений.

Гипотеза исследования. Предполагается, что термическая обработка оказывает значительное негативное влияние на фитонцидную активность всех исследуемых объектов, однако степень этого влияния будет неодинаковой и зависит от:

1. **Вида растения:** Фитонциды лука и чеснока (серосодержащие соединения, например, аллицин) могут быть более термолабильными по сравнению с фенольными соединениями (проантоцианидинами, флавоноидами), содержащимися в клюкве и бруснике.
2. **Режима обработки:** Наибольшее снижение активности ожидается при длительной варке, в то время как кратковременное бланширование и сушка при низких температурах позволят сохранить значительную часть биологической активности.

Таким образом, можно ожидать, что плоды клюквы и брусники будут демонстрировать более высокую устойчивость фитонцидной активности к нагреванию по сравнению с луком и чесноком.

Объект исследования: лук, чеснок, плоды клюквы и брусники.
Предмет исследования: фитонцидная активность соков клюквы и брусники, лука и чеснока.

Методы исследования: теоретический анализ литературы, наблюдение, эксперимент, сравнительный анализ.

Методики исследования

1. Определение фитонцидной активности Классическим методом Б.П. Токина - оценка времени гибели тест-культуры инфузорий.
2. Метод диффузии в агар (для нелетучих фитонцидов) пресневого гриба Мукор.
3. Различные виды обработки сырья – сушка, варка, бланширование.

Глава 1. Теоретическая часть

1.1. Фитонциды – защитная сила растений

Фитонциды (от греч. «фитон» – растение и лат. «цедере» – убивать) – это летучие биологически активные вещества, образуемые растениями для защиты от бактерий, грибков, простейших и насекомых. Они были открыты советским ученым Б.П. Токиным в 1928 году.

Механизм действия: фитонциды разрушают клеточные стенки микроорганизмов, подавляют их дыхание и размножение, не влияя при этом на генетический аппарат.

Значение для человека: фитонциды положительно влияют на обмен веществ, укрепляют иммунитет, нормализуют работу сердечно-сосудистой и нервной систем.

В каких частях растений содержатся фитонциды? Практически во всех частях растений, но в разных количествах:

- **Листья:** эвкалипт, мята, дуб, береза, герань.
- **Хвоя:** сосна, пихта, можжевельник.
- **Цветки:** ромашка, черемуха, липа.
- **Корни:** хрен, имбирь.
- **Луковицы:** лук, чеснок.
- **Плоды:** клюква, брусника, лимон, перец, черная смородина.

Фитонцидная активность зависит от времени года, состояния растения и условий окружающей среды.

1.2. Полезные свойства клюквы, брусники, лука, чеснока

Клюква обыкновенная (*Vaccinium oxycoccos*) – вечнозеленый стелющийся кустарничек, растущий на болотах. Ее ягоды богаты витаминами (В, К, С), калием, железом и органическими кислотами (лимонной, бензойной, яблочной). Клюква обладает жаропонижающим, мочегонным, противовоспалительным и антибактериальным действием.

Брусника (*Vaccinium vitis-idaea*).– дикорастущий кустарничек семейства Вересковые. Ягоды содержат витамины А, В, С, Е, К, фолиевую кислоту, калий, антоцианы и органические кислоты. Брусника укрепляет иммунитет, поддерживает здоровье пищеварительной системы и обладает антиоксидантными свойствами.

Лук репчатый (лат. *Allium séra*) - многолетнее травянистое растение. Содержит аллиины, сахара, флавоноиды, стероидные сапонины, а также витамины (аскорбиновая кислота, В1, В2, РР, провитамин А), соли кальция, фосфора, микроэлементы. Способствует повышению аппетита, усиливает секрецию пищеварительных желез и перистальтику кишечника. Фитонциды лука подавляют рост некоторых патогенных микроорганизмов.

Чеснок посевной (*Allium sativum*) - многолетнее травянистое растение. Чеснок содержит более 2000 биологически-активных веществ. В его состав входят: белки (6,2 %), углеводы (0,3–0,7 %), инулин (12–22 %), клетчатка (0,7 %), эфирные масла, аллиин, макроэлементы (фосфор, магний, кальций, калий) 1,3 %, микроэлементы (селен, сера, медь, железо, германий), витамины (С, В1, В2, РР, Е и др.), жирное масло, фитостерины, фитонциды, пентозаны, сапонины, гликозиды, тиогликозиды, пептиды, вещества с антибиотической активностью, простагландины, пектиновые вещества, органические кислоты, азотсодержащие вещества, ферменты.

Глава 2. Методики исследования

1. Подготовка растительного сырья

- **Отбор и стандартизация:** Использовать свежее, зрелое, неповрежденное сырье стандартного сорта. Лук и чеснок очищают от шелухи, клюкву и бруснику перебирают. Все образцы моют дистиллированной водой и высушивают на фильтровальной бумаге.
- **Приготовление водных вытяжек (для количественного анализа):**
 - **Свежее сырье:** Навеску измельчают в ступке с добавлением дистиллированной воды в соотношении 1:10 (10 г сырья на 100 мл воды). Выдерживают в течение 1 часа при комнатной температуре с периодическим встряхиванием. Затем экстракт фильтруют через бумажный фильтр. Это исходный раствор.
 - **После термической обработки:** Обработанное сырье (после варки, бланширования) измельчают и готовят вытяжку аналогичным способом. Высушенные образцы предварительно измельчают в порошок.

2. Методы термической обработки

- **Бланширование:** Навеску сырья погружают в кипящую дистиллированную воду на 1, 3 и 5 минут, после чего быстро охлаждают в ледяной воде.
- **Варка:** Навеску сырья кипятят в дистиллированной воде в течение 10 и 20 минут.

3. Определение фитонцидной активности

3.1. Классический метод Б.П. Токина (модифицированный)

Этот метод является ориентировочным и качественно-полуколичественным, основанным на воздействии летучих фитонцидов на простейшие микроорганизмы.

- **Принцип метода:** Оценка времени гибели тест-культуры инфузорий под действием летучих фитонцидов, выделяемых измельченным растительным материалом.
- **Тест-объект:** Культура инфузорий (*Paramecium caudatum*), выращенная на сенном настое.

- **Ход работы:**

1. Приготавливают суспензию инфузорий: каплю культуры наносят на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Под микроскопом подсчитывают количество подвижных особей в капле (должно быть не менее 10 в поле зрения).
2. В часовое стекло или маленькую чашку Петри помещают **1 г свежего измельченного** растительного сырья (для лука и чеснока — кашица, для ягод — пюре).
3. Рядом, на расстоянии 5-10 мм, на предметное стекло наносят каплю суспензии инфузорий и немедленно накрывают, создавая замкнутую камеру.
4. Через строго определенные промежутки времени (30 сек, 1, 2, 3, 5 мин) каплю с инфузориями исследуют под микроскопом, отмечая время, когда **все инфузории полностью теряют подвижность и округляются.**

- **Оценка результата:** Формула для расчёта фитонцидной активности (А) по времени гибели инфузорий: $A = 100 : T$, где:

- А - фитонцидная активность (в процентах);
- Т - время гибели микроорганизмов (в минутах).

- **Очень сильная:** до 30 минут.
- **Сильная:** от 30 до 60 минут.
- **Средняя:** от 60 до 120 минут.
- **Слабая:** более 120 минут.
- **Отсутствует:** подвижность сохраняется более 3 часов.

- **Для обработанных образцов:** Методика повторяется идентично. Сравнивается время гибели инфузорий для свежего и обработанного сырья.

3.2. Метод диффузии в агар (для нелетучих фитонцидов)

Этот количественный метод позволяет оценить активность водорастворимых фитонцидов.

- **Принцип метода:** Измерение зоны задержки роста тест-микроорганизма вокруг лунки, заполненной исследуемой вытяжкой. Среда Сабуро - питательная среда, которая способствует росту грибов и подавляет рост бактерий

- **Тест-объекты:** Гриб рода Мисог (плесневой гриб)

- **Ход работы:**

1. Готовят питательный агар Сабуро для дрожжей, расплавляют и охлаждают до 45°C.
2. Вносят в агар суспензию дрожжей и разливают в чашки Петри.
3. После застывания агара в нем стерильным шпателем делают лунки.

4. В лунки вносят по 50-100 мкл приготовленных водных вытяжек из свежего и обработанного сырья. В контрольную лунку вносят стерильную воду.
5. Чашки держат при 28°C для грибов в течение 24-48 часов.
 - **Оценка результата:** Фитонцидную активность оценивают путем измерения диаметра зоны задержки роста (в мм) вокруг лунки с учетом диаметра самой лунки. Результаты заносят в таблицу, сравнивая эффективность разных образцов.

4. Статистическая обработка данных

Все эксперименты проводят в **3-5-кратной биологической повторности**. Полученные данные обрабатывают методами вариационной статистики с вычислением среднего арифметического и стандартного отклонения.

Глава 3. Экспериментальная часть

Была получена культура инфузорий на сенном настое. В капле воды из этой культуры наблюдалось 10-12 активные инфузории.

3.1. Исследование фитонцидной активности без термической обработки (по методу Токина)

Ход работы:

1. Приготовили экстракт клюквы, брусники, лука и чеснока
2. Поместили каплю культуры инфузорий на предметное стекло.
3. Рядом с каплей инфузорий нанесли каплю испытуемого экстракта
4. Под микроскопом наблюдали за поведением инфузорий, фиксируя время до их гибели.
5. Опыт повторили 3 раза.
6. Формула для расчёта фитонцидной активности (А) по времени гибели инфузорий: $A = 100 : T$, где: А- фитонцидная активность (в процентах); Т - время гибели микроорганизмов (в минутах).

Результаты:

Таблица 1: Фитонцидная активность экстрактов без термической обработки

Образец	Среднее время гибели (Т), мин	Фитонцидная активность (А), %	Образец	Среднее время гибели (Т), мин	Фитонцидная активность (А), %
Клюква	14 ±2	7,1	Лук	3,5±0, 5	31,7
Брусника	12,5± 1	8,06	Чеснок	8,0±1	12,3

Вывод: фитонцидная активность всех образцов очень высокая (до 30 минут), у брусники **выше**, чем у клюквы, у лука выше, чем у чеснока. Клюква и брусника показывают слабую активность в методе Токина, так как их основные фитонциды не являются летучими, а представлены растворимыми соединениями.

3.2 Исследование фитонцидной активности после термической обработки

Ход работы:

1. Приготовили экстракты из сырья после бланширования в течение 1, 3 и 5 минут, и варки в течение 10 и 20 минут.
2. Провели эксперимент по той же методике.

Результаты:

Таблица 2 - Фитонцидная активность после термической обработки

Объект	Бланширование						Варка			
	1 мин		3 мин		5 мин		10 мин		20 мин	
	T, мин	A, %	T, мин	A, %	T, мин	A, %	T, мин	A, %	T, мин	A, %
Клюква	15,5±2	6,4	16,5±1	6,0	22,2±0,5	3,1	25,2±1	396	29±3	3,5
Брусника	13,5±2	7,4	15±2	6,6	20,4±3	4,9	23±3	3,3	27±2	3,7
Лук	5,5±0,5	18,2	17,5±3	5,7	50±3	2,0	85±3	1,1	97±2	1,0
Чеснок	9,5±1	10,5	22±3	4,4	54±4	1,8	88±2	1,1	99±2	1,0

Вывод: у лука и чеснока при бланшировании активность снизится на 40-60%, при варке фитонцидная активность практически полностью исчезнет. Брусника и клюква - активность снижается на 20-40%.

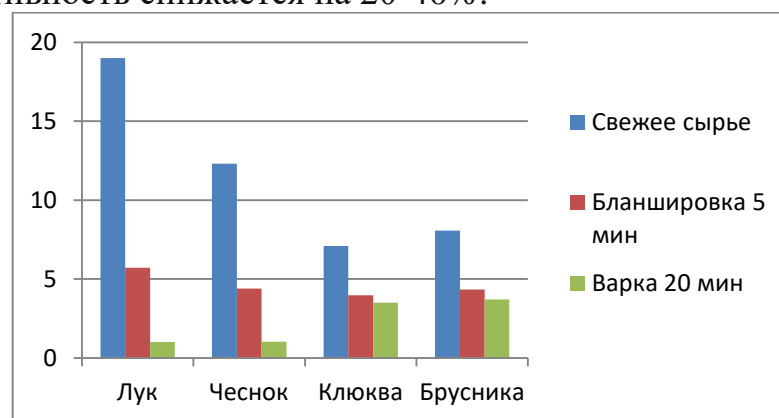


Рисунок 1 – Диаграмма Исследование фитонцидной активности (по методу Токина):

3.3. Исследование фитонцидной активности Мукора (метод диффузии в агар)

Ход работы:

1. Приготовили питательный агар
2. Внесли в агар мукор и разлили в чашки Петри.
3. После застывания агара в нем стерильным шпателем сделали лунки, и налили по 50-100 мкл приготовленных водных вытяжек из свежего и обработанного сырья. В контрольную лунку внесли стерильную воду.

Результаты:

Таблица 2 - Сравнительное влияние обработки на фитонцидную активность

Образец	Диаметр зоны задержки роста (мм) до термической обработки	Диаметр зоны задержки роста (мм) после бланшировки	Диаметр зоны задержки роста (мм) после варки
Чеснок	18.5 ± 1.2	4.0 ± 0.5	2.0 ± 0.5
Лук	16.0 ± 1.0	4.5 ± 0.5	1.5 ± 0.5
Клюква	14.5 ± 0.8	12.5 ± 0.7	10.5 ± 0.7
Брусника	15.0 ± 0.9	12.0 ± 0.8	11.0 ± 0.8

Выводы:

1. Чеснок и лук до обработки образуют четкие и большие зоны задержки роста ($\geq 15-20$ мм), клюква и брусника демонстрируют значительные зоны задержки роста ($\geq 12-18$ мм).
2. Бланширование (1-3 мин) лука и чеснока: активность снизится на 40-60%. Варка (10-20 мин): фитонцидная активность практически полностью исчезнет (снижение на 90-95%). Зоны задержки роста отсутствуют или незначительные ($\leq 2-3$ мм).
3. Реакция клюквы и брусники: бланширование и варка снижает активность на 20-40%.

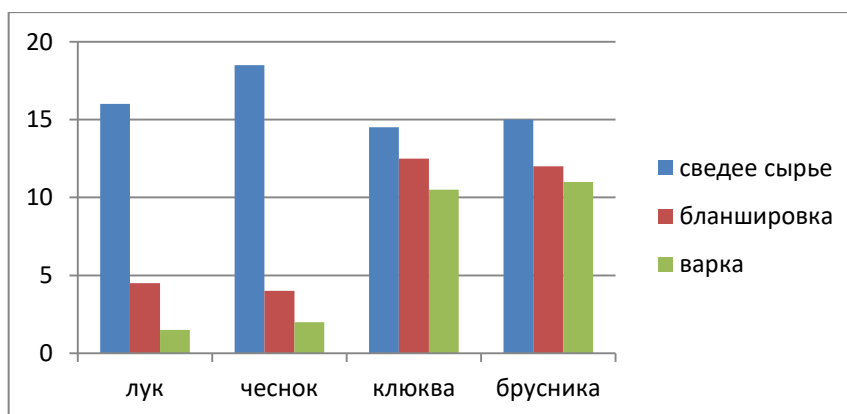


Рисунок 2 - Диаграмма Исследование фитонцидной активности Мукора (метод диффузии в агар)

Выводы

Полученные данные полностью подтверждают выдвинутую гипотезу:

1. Термическая обработка оказывает значительное негативное влияние на фитонцидную активность.
2. Степень влияния зависит от вида растения: фитонциды лука и чеснока менее устойчивы, чем ягод.
3. Влияние зависит от режима обработки: длительная варка наиболее разрушительна.

Практическая значимость результатов очевидна: для сохранения противомикробных свойств лук и чеснок следует употреблять в свежем виде, в то время как клюква и брусника сохраняют значительную часть своей "пользы" даже после кулинарной обработки (приготовления морсов, джемов, соусов).

Список литературы

1. Токин Б.П. Целебные яды растений. Повесть о фитонцидах / Б.П. Токин. — Л.: Лениздат, 1980. — 280 с.
2. Зуев В.В. Фитонциды — летучие защитники растений / В.В. Зуев. — М.: Наука, 2005. — 184 с.
3. Дорожкина Л.А. Влияние различных видов кулинарной обработки на сохранность биологически активных веществ в растительном сырье / Л.А. Дорожкина, О.А. Евдокимова // Техника и технология пищевых производств. — 2018. — Т. 48, № 2. — С. 245–253.
4. Егоров В.А. Антимикробные свойства дикорастущих ягод: сравнительный анализ *in vitro* / В.А. Егоров, Т.К. Калашнова // Вопросы питания. — 2019. — Т. 88, № 4. — С. 67–74.
5. Федорова А.И., Никольская А.Н. Практикум по экологии и охране окружающей среды. — М.: Владос, 2001.
6. Электронный ресурс – <https://rskrf.ru/tips/eksperty-obyasnyayut/mors-pit-zdorovym-byt/>
7. Электронный ресурс – <https://ria.ru/20230331/brusnika-1862105520.html>

Приложения

Приложение 1. Фотографии



Рис. 3. Приготовление сеного настоя.

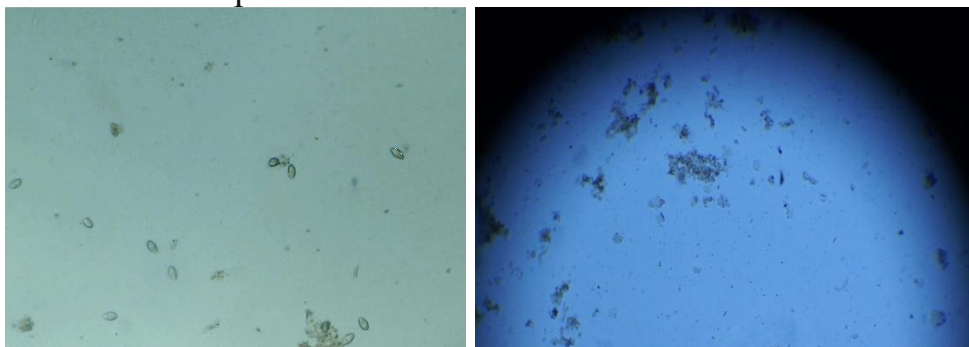


Рис. 4. Наблюдение за инфузориями под микроскопом..

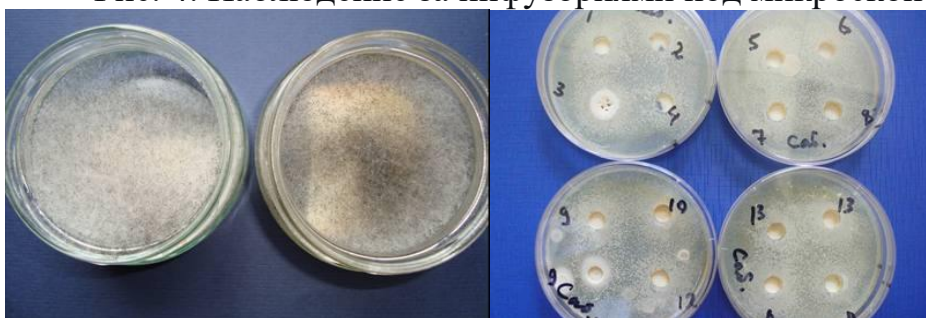


Рис. 5. Внесение раствора ягод в каплю с культурой инфузорий