

УДК 582.47+632.3/632.4

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЦИДНЫХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДРЕВЕСНОЙ ЗЕЛЕНИ ХВОЙНЫХ

© Т.В. Хуршайнен^{1*}, Н.Н. Никонова¹, Я.И. Назарова², А.А. Широких², Н. Боков², И.Г. Широких²,
А.В. Кучин¹

¹ Институт химии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, ул. Первомайская, 48,
Сыктывкар, 167000, Россия, hurshkainen@chemi.komisc.ru

² Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока
им. Н.В. Рудницкого, ул. Ленина, 166а, Киров, 610007, Россия

В статье представлены результаты исследования экстрактивных веществ хвойной древесной зелени, выделенных способом эмульсионной экстракции. Изучено биологическое действие экстрактивных веществ древесной зелени ели, сосны и лиственницы на рост фитопатогенных грибов *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria* sp., *Parastagonospora nodorum* и бактерий *Erwinia rhapontici*, *Pseudomonas cepacea*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Bacillus* sp., *Bacillus aryabhattai*, *Pedobacter agri*, *Clavibacter michiganensis* в условиях *in vitro*. Полученные результаты свидетельствуют о наличии у исследуемых экстрактивных веществ антибактериальной и антифунгальной активности. Установлены рабочие концентрации, обеспечившие подавление роста фитопатогенных бактерий и грибов с наибольшей эффективностью. Выявлен феномен проявления максимальной ингибирующей активности экстрактов в низких концентрациях с последующим ослаблением их действия на тест-культуры микроорганизмов по мере увеличения доз. Полученные результаты могут быть использованы для разработки экономически и экологически оправданных технологий органического растениеводства.

Ключевые слова: хвойный экстракт, биоцидная активность, фитопатогены, грибы, бактерии.

Для цитирования: Хуршайнен Т.В., Никонова Н.Н., Назарова Я.И., Широких А.А., Боков Н., Широких И.Г., Кучин А.В. Исследование биоцидных свойств экстрактивных веществ древесной зелени хвойных // Химия растительного сырья. 2025. №1. С. 127–138. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20250115053>.

Введение

Актуальность поиска новых соединений с противомикробным действием обусловлена быстрым распространением в популяциях патогенов резистентности к ныне существующим препаратам. Важным направлением такого поиска является исследование биоцидных свойств природных соединений [1]. Из литературы известна антибактериальная активность экстрактивных веществ хвойных растений [2–4]. Экстрактивные вещества, выделенные из хвойного сырья, могут быть экологически чистой и устойчивой альтернативой агрохимикатам для борьбы с патогенами растений [5–7].

Отходы лесозаготовок – кора и ветки деревьев – являются богатыми источниками биологически активных соединений. В Институте химии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН разработан способ выделения экстрактивных веществ из растительного сырья с использованием в качестве экстрагента водно-щелочного раствора. Данный способ не уступает традиционным технологиям экстракции, но при этом позволяет извлекать одновременно комплекс липофильных и гидрофильных соединений различной полярности без использования органических растворителей. На основе эмульсионных экстрактов древесной зелени пихты и ели получены эффективные регуляторы роста растений и кормовые добавки для животных [8, 9].

Цель работы – изучение биологического действия экстрактов ели, сосны и лиственницы, выделенных эмульсионным способом, на рост фитопатогенных грибов и бактерий в чистых культурах.

* Автор, с которым следует вести переписку.

Экспериментальная часть

Объекты исследования. Подготовка сырья, методика получения эмульсионных экстрактов и анализ компонентного состава описаны в статье [10].

Растительный материал. Древесную зелень сосны (*Pinus sylvestris* L.) собирали в пригородных лесах Сыктывкара, Республика Коми, Россия, лиственницы (*Larix sibirica* Ledeb.) – в пригородных лесах г. Печора, Республика Коми, Россия.

Подготовка сырья к экстракции. Размол хвойной древесной зелени проводили до фракции 2–5 мм.

Методика получения эмульсионных экстрактов. Экстракцию сырья проводили в лабораторном экстракторе объемом 1 л с механическим перемешиванием (1000 об./мин). Измельченное сырье обрабатывали в 5% водном растворе NaOH при соотношении объема щелочного раствора к массе сырья 10 : 1 в течение 60 мин при температуре 45–50 °С. Полученный эмульсионный раствор фильтровали для отделения твердой фазы.

Методика разделения эмульсионного раствора на кислые и нейтральные фракции. Водно-щелочной раствор, полученный после фильтрации, переносили в делительную воронку и экстрагировали нейтральные компоненты петролейным эфиром. Эфирный экстракт промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции, сушили над безводным сульфатом натрия, отфильтровали и упаривали под вакуумом. Сухой остаток содержит нейтральные вещества.

Далее водно-щелочной раствор подкисляли 12% раствором H_2SO_4 до достижения pH=2–3, экстрагировали кислые компоненты диэтиловым эфиром. Органический раствор промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции, сушили над безводным сульфатом натрия, отфильтровали и упаривали под вакуумом. Сухой остаток содержит кислые вещества.

Омыление нейтральных веществ лиственницы. Омыление нейтральных веществ лиственницы проводили 15% спиртовым раствором KOH при 60 °С в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, переносили в делительную воронку с дистиллированной водой и экстрагировали петролейным эфиром. Эфирный экстракт промывали насыщенным раствором NaCl, сушили над безводным сульфатом натрия, отфильтровали и упаривали под вакуумом. Сухой остаток содержит нейтральные неомыляемые вещества лиственницы.

Водный раствор подкисляли до pH=2–3 и экстрагировали диэтиловым эфиром. Экстракт промывали водой, сушили над безводным сульфатом натрия, отфильтровали и упаривали под вакуумом. Сухой остаток содержит нейтральные омыляемые вещества.

Химический состав полученных образцов определяли спектральными методами после разделения методом колоночной хроматографии на силикагеле Alfa Aesar 70–230 mesh на фракции и индивидуальные компоненты. Спектры ЯМР 1H и ^{13}C экстрактивных веществ записывали на спектрометре Bruker-300, в качестве внутреннего стандарта использовали сигналы растворителей $CHCl_3$ (δ_H 7.21 м.д. δ_C 76.90 м.д.) и CH_3OH (δ_H 3.31 м.д. δ_C 49 м.д.). ИК-спектры записывали на спектрофотометре IR Prestige-21 (Shimadzu), твердые вещества – в таблетках KBr. УФ-спектры записывали на УФ-спектрофотометре UV-1700 (Shimadzu).

Контроль за разделением веществ осуществляли методом ТСХ на пластинках силифол, элюент – петролейный эфир-диэтиловый эфир, хлороформ-метанол. Индивидуальные компоненты идентифицировали в сравнении со спектрами стандартных образцов и с литературными данными. Монотерпеноиды анализировали методом ГЖХ-МС на газо-жидкостном хроматографе Thermo Focus GC.

Методика исследования биологической активности

Тест-культуры микроорганизмов. Бицидное действие экстрактивных веществ древесной зелени изучали, используя в качестве тестовых следующие культуры фитопатогенных грибов *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria* sp. и бактерий *Erwinia rhapontici*, *Pseudomonas cepacea*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Bacillus* sp., *Bacillus aryabhattai*, *Pedobacter agri* из рабочей коллекции микроорганизмов ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока, гриба *Parastagonospora nodorum* и бактерии *Clavibacter michiganensis* из коллекции ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии».

Тест-культуры выращивали на агаризированных средах, используя для грибов среду Чапека [11], а для бактерий – среду RHM (Rich High Medium) [12].

Ход анализа. Для получения микробных суспензий каждую из тест-культур фитопатогенов выращивали на скошенном агаре соответствующего состава и смывали с поверхности 5 мл стерильной воды. Посев на чашки со средой осуществляли методом «газона» в трехкратной повторности. На поверхности свежесейанного «газона» размещали по 4–5 стерильных дисков диаметром 5 мм из фильтровальной бумаги и притирали их к поверхности агара. На бумажные диски наносили по 10 мкл растворов испытуемых соединений в 96% этаноле, приготовленных в концентрациях 20, 50, 100 и 200 мг/мл. В контроле использовали чистый растворитель. Антибактериальную активность тестируемых экстрактов сравнивали с действием антибиотика амоксициллина (20 мкг/мл), антифунгальную активность – с действием коммерческого фунгицида Profit Gold, WDG (1 мг/мл), состав которого включает цимоксанил и фамоксадон (1 : 1).

Чашки с газонными культурами культивировали при 28 °С, учёт результатов производили на 2–3 (для бактерий) и 4–5 (для грибов) сутки. Измеряли диаметр зон ингибирования роста тест-культур в двух взаимно перпендикулярных направлениях и усредняли полученные значения.

Данные обрабатывали стандартными методами параметрической статистики с использованием программы Microsoft Office Excel 2007: находили средние значения из трех параллельных определений и их стандартные отклонения. На основе данных о величине зон ингибирования роста фитопатогенов экстрактами, растворителем и препаратами сравнения была построена тепловая карта с использованием электронного сервиса <https://build.ngchm.net/NGCHM-web-builder/#> [13].

Интерпретация результатов. Биоцидное действие испытуемых соединений характеризовали, используя следующий критерий: соотношение суммы средних значений диаметров зон подавления роста всех тест-культур ($\Sigma_{\text{общ.}}$) грибов или бактерий и суммы средних значений диаметров зон подавления роста всех тест-культур грибов или бактерий растворителем ($\Sigma_{\text{раств.}}$). В зависимости от величины $\Sigma_{\text{общ.}}/\Sigma_{\text{раств.}}$ степень антифунгальной и антибактериальной активности соединения считали высокой (соотношение 2.0 и более), умеренной (соотношение 1.2–1.9) или низкой (≤ 1.2). В зависимости от количества тест-культур, чувствительных к экстракту, его относили к группе с широким (от 5 до 7 культур), умеренным (4 культуры) или узким (3 и менее культур) спектром действия.

Для выявления рабочих концентраций экстрактов-лидеров по биоцидному действию тестировали активность образцов Э1, Э2, Э5 и Э6 в градиенте концентраций и находили суммы средних значений диаметров зон подавления ими роста всех тест-культур грибов ($\Sigma_{\text{гриб.}}$) и бактерий ($\Sigma_{\text{бакт.}}$) при заданных концентрациях 20, 50, 100 и 200 мг/мл. На основании полученных результатов для каждого из образцов строили графики, отражающие зависимость антифунгального и антибактериального действия (суммарное ингибирование, мм) от концентрации испытуемого образца. Находили аппроксимирующие кривые и уравнения, описывающие зависимость с максимально возможной величиной достоверности аппроксимации (R^2).

Обсуждение результатов

Компонентный состав исследованных образцов. Экстрактивные компоненты древесной зелени ели, сосны и лиственницы были выделены эмульсионным способом с использованием водного раствора NaOH [10].

Из эмульсионных растворов ели, лиственницы и сосны петролевым эфиром были извлечены нейтральные компоненты, группа кислых веществ выделена диэтиловым эфиром. Далее нейтральные компоненты лиственницы были разделены на омыляемые и неомыляемые. Таким образом были подготовлены образцы для исследований биологической активности: Э1 – нейтральные вещества ели; Э2 – кислые вещества ели; Э3 – кислые вещества хвои лиственницы; Э4 – нейтральные омыленные вещества лиственницы; Э5 – нейтральные неомыленные вещества лиственницы; Э6 – кислые вещества сосны; Э7 – нейтральные вещества сосны.

В составе нейтральных компонентов ели (образец Э1) идентифицированы: монотерпеноиды камфен – 8.1%, α -пинен – 3.3%, камфара – 4.8%, борнеол – 20%; дитерпеновый спирт абиетинол – 7.8%; тритерпеновый спирт ситостерин – 3%; полиненасыщенные алифатические спирты полипренолы – 10%; насыщенные алифатические спирты – 1.2%.

Химический состав образцов Э2, Э3, Э5, Э6 и Э7 представлен в таблице 1. В составе кислых веществ ели (образец Э2) преобладают биологически активные фенольные соединения, известные антиоксидантным действием, противогрибковой и антибактериальной активностью [2]. Основной компонент *para*-гидроксиацетофенон обладает вирулицидной, бактерицидной и фунгицидной активностью. В образце Э3 установлено значительное содержание дитерпеновых кислот.

В образце Э4 нейтральных омыленных компонентов лиственницы идентифицированы жирные кислоты, мажорные – линолевая (15%) и линоленовая (41%).

Результаты анализа нейтральных неомыляемых веществ лиственницы образца Э5 показали преобладание в нем дитерпеновых спиртов. Основными среди них являются дегидроабетинол, эпиманоол и эпитулолол (табл. 1).

Основными компонентами образца Э6 кислых веществ сосны являются дитерпеновые кислоты (табл. 1). Среди дитерпеноидов отмечено высокое содержание пинифоловой кислоты и ее метилового эфира. Известно, что данные соединения обладают цитотоксической и антимикробной активностью [14, 15].

В нейтральной фракции экстракта сосны образца Э7 установлено большое содержание монотерпеноидов, обладающих антимикробным действием, идентифицирован лабдановый спирт изоабиенол, обладающий высокой антимикробной и фунгицидной активностью (табл. 1) [16, 17].

Таблица 1. Компоненты, идентифицированные в образцах Э2, Э3, Э5, Э6 и Э7

Компоненты	Содержание, % от массы экстракта
1	2
Образец Э2	
терпеноиды	13.7
жирные насыщенные кислоты	1.3
жирные ненасыщенные кислоты,	24.1
в т.ч. линолевая	15.0
<i>para</i> -гидроксиацетофенон	10.5
3,4-дигидроксиацетофенон	2.5
<i>para</i> -кумаровая кислота	4.8
ванилиновая кислота	0.5
кофейная кислота	3.7
феруловая кислота	5.8
Образец Э3	
Дитерпеновые кислоты, в том числе:	20.13
Изопимаровая кислота	10.74
Абетиновая кислота	4.03
Дегидроабетиновая кислота	5.36
Жирные кислоты, в том числе:	31.2
Линоленовая кислота	13.1
Линолевая кислота	7.04
Пальмитиновая кислота	11.07
Дитерпеновые кислоты, в том числе:	20.13
Изопимаровая кислота	10.74
Абетиновая кислота	4.03
Дегидроабетиновая кислота	5.36
Образец Э5	
Дитерпеновые спирты, в том числе:	37.70
Эпиманоол	8.46
Дегидроабетинол	12.69
Эпитулолол	3.86
Полипренолы	16.93
β -ситостерин	12.69
Образец Э6	
Дитерпеноиды, в том числе:	62.3
пинифоловая кислота	10.97
метиловый эфир пинифоловой кислоты	21.21
метиловый эфир имбрикатоловой кислоты	19.79
Жирные кислоты, в том числе:	20.17
Линоленовая	11.37
Линолевая	5.01
Пальмитиновая	3.79
Ароматические соединения, в том числе	17.71
4-гидроксibenзойная кислота	4.23

Окончание таблицы 1

1	2
Образец Э7	
Монотерпеноиды, в том числе:	33.83
α-пинен	0.3
Δ ³ -карен	1.8
β-фелландрен	0.6
терпинолен	0.3
борнеол	0.9
пара-цимол	13.81
пара-цимен-8-ол	16.12
Сесквитерпеноиды, в том числе:	19.8
β-кариофиллен	2.1
δ-кадинен	3.6
гермакрен	6.9
Дитерпеноиды, в том числе:	15.18
Изоабиенол	11.50
Дегидроабиетинол	3.03
Изопимариналь	0.65
Полипренолы	9.20
β-ситостерин	6.91

Изучение биологического действия экстрактов на рост фитопатогенных грибов и бактерий в чистых культурах, идентификация экстрактов-лидеров. Спиртовые растворы всех образцов в концентрации 100 мг/мл оказали ингибирующее действие на рост от одной до семи тест-культур бактерий и грибов. Совокупность полученных данных визуализировали в виде тепловой карты, на которой величины зон угнетения роста отдельных тест-культур экстрактивными соединениями отображены цветом (рис. 1). Все образцы проявили в различной степени ингибирующую активность в отношении грамположительных бактерий *Pedobacter agri* и *Clavibacter michiganensis*, тогда как против грамотрицательных бактерий *Erwinia rhapontici* и *Pseudomonas cepacea* активных среди испытуемых экстрактов, а также коммерческих препаратов сравнения, не обнаружено. На грибные фитопатогены, за исключением *Bipolaris sorokiniana*, максимальное ингибирующее действие оказали образцы Э1 и Э5. Другие экстрактивные соединения селективно подавляли рост не более 1–2 тест-культур грибов.

В ходе тестирования биоцидное действие растворов экстрактов по силе часто было сопоставимо с действием растворителя – этилового спирта. В связи с этим для идентификации экстрактов-лидеров по биоцидному действию сравнивали суммарный ингибирующий эффект, обусловленный спиртовым раствором экстракта, с суммарным эффектом чистого растворителя. Статистически значимое ($p \geq 0.95$) превышение суммарного ингибирующего эффекта экстрактов в отношении бактерий выявлено для образцов Э2 и Э6, а в отношении грибов – для образцов Э1 и Э5 (табл. 2).

Согласно величинам $\sum_{\text{общ.}} / \sum_{\text{раств.}}$ степень антибактериальной активности образцов Э2 и Э6 относилась к умеренной (соотношение 1.2 и 1.5 соответственно). По сравнению с препаратом сравнения амоксициллином (20 мкг) образец Э6 проявил достоверно более высокую активность и более широкий спектр действия.

Выраженной антифунгальной активностью с широким спектром действия отличались образцы Э1 и Э5. Оба экстракта существенно превосходили по действию коммерческий фунгицид Профит Голд, при этом концентрация экстрактов Э1 и Э5 была на порядок ниже, чем рекомендуемая для использования производителем коммерческого фунгицида.

Таким образом, на первом этапе работы были определены экстракты-лидеры, проявившие избирательную (специфическую) активность в подавлении роста фитопатогенных бактерий и грибов. Высокой и умеренной антифунгальной активностью характеризовались нейтральные вещества эли Э1 и лиственницы Э5, образовавшие единую группу при иерархической кластеризации данных по биоцидному действию испытуемых экстрактов (рис. 1). Умеренной бактерицидной активностью отличались кислые вещества эли (Э2) и сосны (Э6), объединенные автоматизированным алгоритмом в другой кластер, достаточно далеко отстоящий от первого на тепловой карте. Отметим также, что спектры фитопатогенов, чувствительных к данным экстрактам, на тепловой карте шире спектров, характеризующих препараты сравнения БКЦ и ФГЦ. Образцы Э3, Э4, Э7, не проявившие ингибирующего действия на фитопатогены в данном эксперименте, выделены в отдельный третий кластер.

Таблица 2. Образцы с установленным статистически значимым ($p \geq 0.95$) ингибирующим действием на тест-культуры фитопатогенов

Образец	Σ диаметров отсутствия роста тест-культур, мм	Степень активности	Количество чувствительных культур	Спектр действия
антибактериальное действие				
Этиловый спирт (растворитель)	64	–	–	–
Э2	78	умеренная	4	умеренный
Э6	97.5	умеренная	5	широкий
Амоксициллин 20 мкг/мл (препарат сравнения)	83	–	3	узкий
антифунгальное действие				
Этиловый спирт (растворитель)	40	–	–	–
Э1	101,5	высокая	7	широкий
Э5	75	умеренная	6	широкий
Цимоксанил + Фамоксадон (1 : 1), 1 мг/мл	47	–	2	узкий

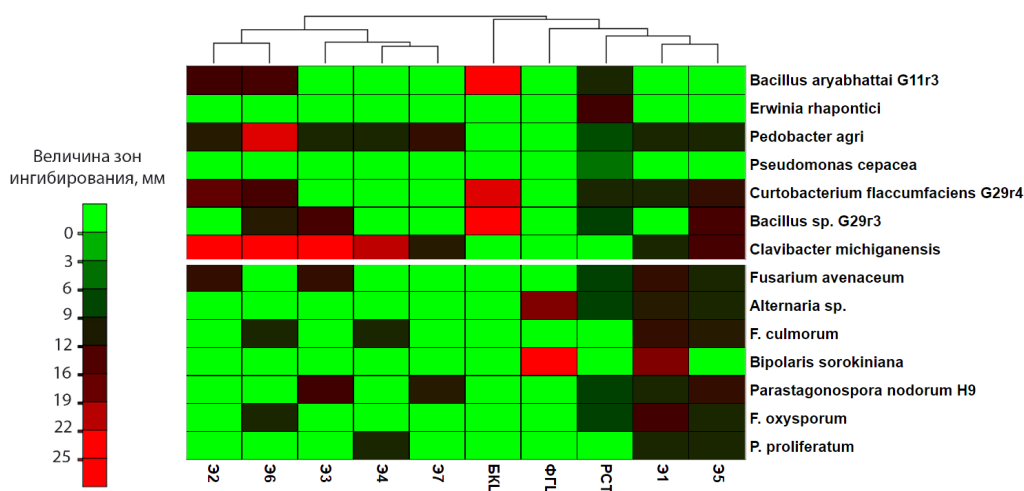


Рис. 1. Тепловая карта, отражающая различия в ингибировании роста тест-культур фитопатогенных бактерий и грибов спиртовыми растворами экстрактов (100 мг/мл) Э1–Э7, 96% этанолом (PCT) и препаратами сравнения: бактерицид амоксициллин (20 мкг) (БКЦ), фунгицид Профит Голд (1 г) (ФГЦ). Цвет указывает на величину зон ингибирования роста тест-культур в соответствии со шкалой

Определение рабочих концентраций экстрактов-лидеров. Следующей задачей исследования являлось определение эффективных концентраций экстрактов-лидеров Э1, Э2, Э5 и Э6, подавляющих рост грибных и бактериальных культур. Зоны ингибирования роста фитопатогенов определяли в диапазоне концентраций 20–200 мг/мл.

Против бактерий статистически значимое ($p \geq 0.95$) действие проявили все четыре экстракта-лидера, но в различных концентрациях. В зависимости от состава экстракта и его концентрации суммарное ингибирование семи тест-культур бактерий изменялось от 34 до 147 мм (рис. 2)

Наиболее активно в диапазоне взятых концентраций образцы Э1, Э2, Э5, Э6 ингибировали рост грамположительных тест-бактерий, включая *Clavibacter michiganensis*, известную в качестве причины заболеваний семейства пасленовых (черная кольцевая гниль картофеля и бактериальный рак томатов), и *Curtobacterium flaccumfaciens*, вызывающую бактериальное увядание фасоли (*Phaseolus* spp.), гороха (*Pisum sativum*), сои (*Glycine max*) и некоторых других бобовых растений. Рядом международных комиссий по карантину и защите растений возбудитель *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* включен в число карантинных объектов (<https://www.eppo.int>).

Если при первичном скрининге экстрактов древесной зелени хвойных не были обнаружены соединения, способные подавлять рост грамотрицательных бактерий *E. rhapontici* и *P. cepacea*, то взятые в других концентрациях растворы экстрактов-лидеров проявили активность в отношении данных бактерий. Виды *E. rhapontici* и *P. cepacea* часто входят в состав патоккомплексов и способны вызывать некрозы, ожоги, увядание и мягкие гнили у различных сельскохозяйственных культур, а также плодовых деревьев, благодаря продукции целлюлаз и пектиназ [18].

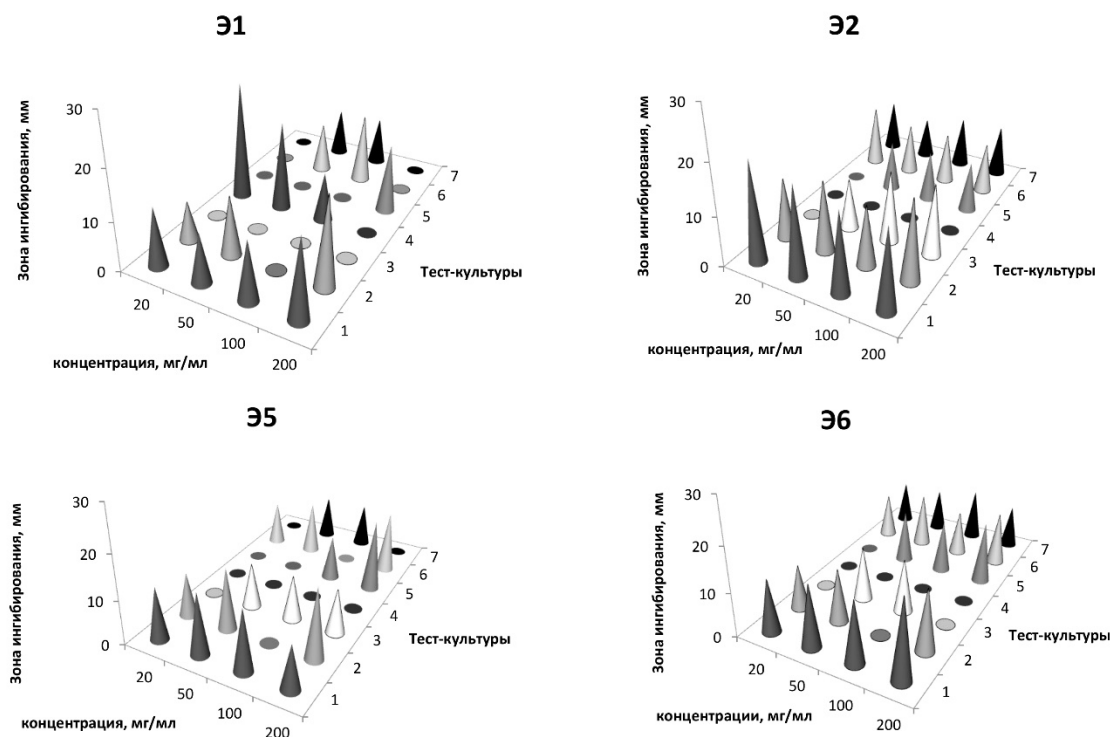


Рис. 2. Зоны ингибирования роста бактерий образцами-лидерами: 1 – *Bacillus aryabhattai*; 2 – *Erwinia rhapontici*; 3 – *Pedobacter agri*; 4 – *Pseudomonas cepacea*; 5 – *Curtobacterium flaccumfaciens*; 6 – *Bacillus sp.*; 7 – *Clavibacter michiganensis*

Против грибных фитопатогенов действие соединений-лидеров Э1, Э2, Э5, Э6 отличалось, в сравнении с антибактериальным, формированием меньших по величине зон ингибирования во всем диапазоне взятых концентраций. Суммарное ингибирование семи культур тест-грибов варьировало от 32 до 76 мм в зависимости от конкретного образца и его концентрации (рис. 3).

Особый интерес представляет способность испытуемых экстрактов угнетать рост грибов родов *Alternaria* и *Bipolaris*, для которых характерен активный синтез меланинов [19]. Меланиновые пигменты повышают адаптивность организмов к условиям существования, облегчают колонизацию растения патогеном [20].

Альтернариозы поражают растения как открытого, так и закрытого грунта, вызывая, например, пятнистость томата, оливковую плесень злаков [18]. Кроме того, многие вторичные метаболиты (микотоксины) грибов рода *Alternaria* могут накапливаться в тканях растений и оказывать негативное воздействие на организм человека или животного [21].

Все испытуемые образцы-лидеры угнетали рост тест-гриба *Alternaria sp.* При этом активность растворов экстрактов в концентрациях 20–50 мг/мл была значимо выше, чем в концентрациях 100 и 200 мг/мл.

Рост гриба *Bipolaris sorokiniana*, вызывающего корневые гнили и гельминтоспориоз зерновых культур [22], угнетал только образец Э1 (нейтральные вещества ели) в диапазоне концентраций от 50 до 200 мг/мл.

Невысокую, но статистически значимую ингибирующую активность проявили экстракты-лидеры в отношении грибов рода *Fusarium*, вредоносность которых также обусловлена не только снижением урожайности многих сельскохозяйственных культур, но и накоплением в растениеводческой продукции опасных микотоксинов [23].

На основании расчетов суммарного ингибирования всех тест-культур бактерий и грибов (по отдельности) каждым из испытуемых образцов были построены графики, отражающие зависимость антифунгального и антибактериального действия от концентраций спиртовых растворов экстрактов. Далее находили кривые аппроксимации и уравнения, описывающие зависимость с максимально возможной величиной достоверности (R^2) (рис. 4).

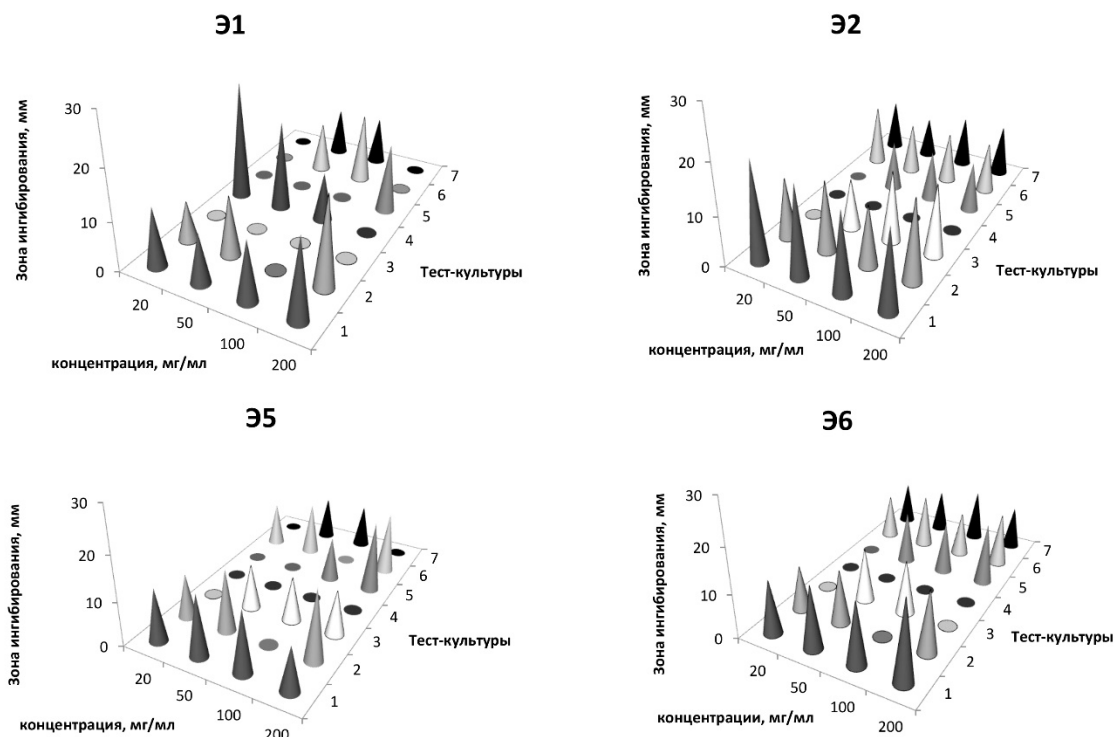


Рис. 3. Зоны ингибирования роста фитопатогенных грибов образцами-лидерами 1 – *Fusarium avenaceum*; 2 – *Alternaria sp.*; 3 – *F. culmorum*; 4 – *Bipolaris sorokiniana*; 5 – *F. moniliforme*; 6 – *F. oxysporum*; 7 – *F. proliferatum*

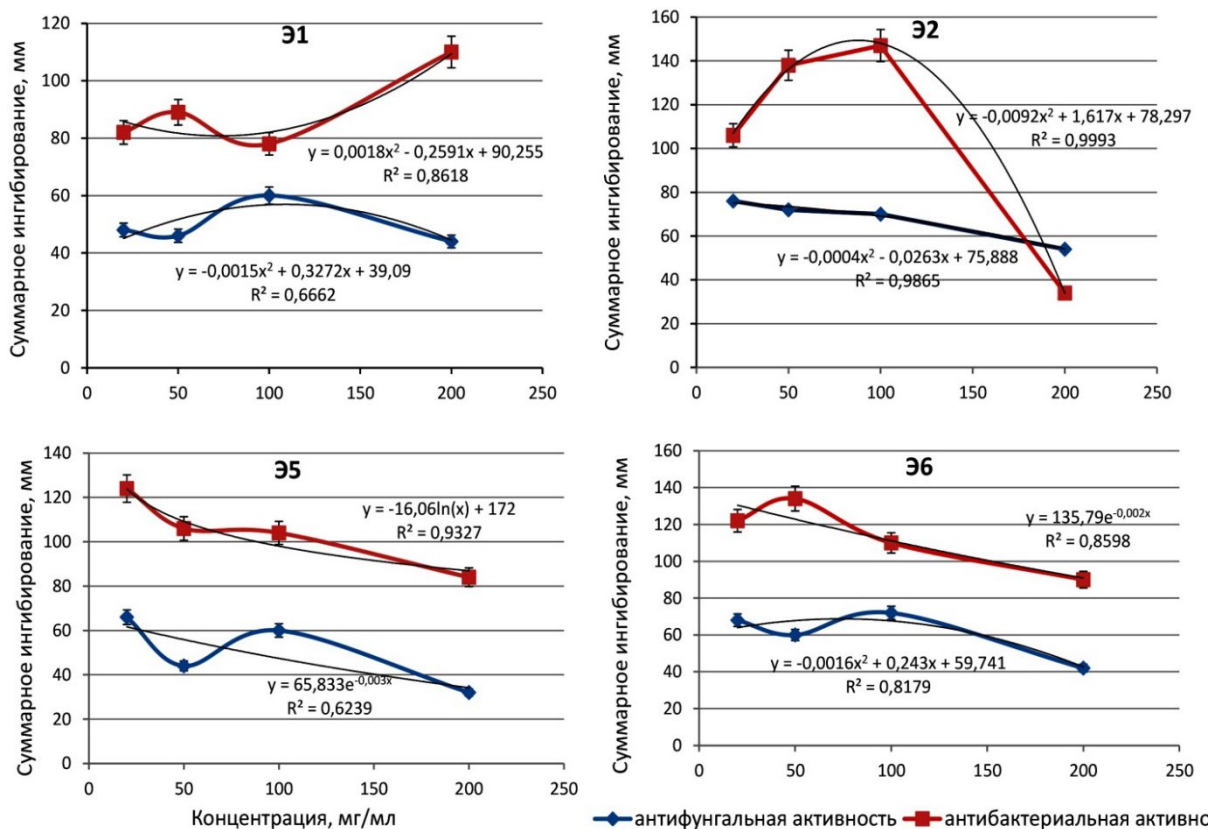


Рис. 4. Изменение антибактериальной и антифунгальной активности экстрактов-лидеров в зависимости от концентраций их спиртовых растворов

Как следует из анализа полученных данных, максимальную антибактериальную активность экстракты хвойной зелени проявили при различных концентрациях: нейтральные вещества ели (Э1) – при наиболее высокой (200 мг/мл), нейтральные неомыленные вещества лиственницы (Э5) – при низкой (20 мг/мл), кислые вещества сосны (Э6) – при относительно низкой (≤ 50 мг/л), кислые вещества ели (Э2) – при ≤ 100 мг/л. Ингибирующая активность образцов Э2, Э5, Э6 в отношении бактерий характеризовалась обратной зависимостью «доза-эффект», тогда как антибактериальная активность образца Э1, напротив, значимо возрастала с увеличением концентрации раствора до 200 мг/мл.

Наиболее высокую антифунгальную активность образцов Э2 и Э5 наблюдали при использовании растворов в концентрации 20 мг/мл, а образцов Э1 и Э6 – в концентрации 100 мг/мл. Антифунгальное действие изменялось в зависимости от концентрации экстрактов в меньшей степени, чем антибактериальное, но активность образцов Э2, Э5, Э6 в угнетении роста грибов также характеризовалась обратной зависимостью «доза-эффект». В отличие от них, значимое снижение антифунгальной активности у образца Э1 проявилось только при повышении концентрации раствора от 100 до 200 мг/мл.

Заключение

Исследовано биоцидное действие семи экстрактов древесной зелени хвойных, полученных экологически безопасным эмульсионным способом. Результаты исследования свидетельствуют о наличии у четырех из них (экстракты-лидеры) антибактериальной и антифунгальной активности. Экстрактивные компоненты различались между собой по степени активности и величине спектра действия в зависимости от используемых концентраций.

Установлено, что рабочие концентрации исследованных образцов определяются как природой самих веществ, так и мишенью целевого действия – разными видами фитопатогенных грибов и бактерий.

Выявлен феномен максимальной ингибирующей активности экстрактов древесной зелени в низких концентрациях с последующим снижением их действия по мере увеличения доз. Парадоксальная реакция культур микроорганизмов на исследуемые соединения в определенных концентрациях предполагает их дальнейшее изучение, как частный случай эффекта действия малых доз в физиологии организмов. Это направление может принести практическую пользу в свете современной тенденции минимизации использования химических препаратов для получения продукции растениеводства, а также в связи с перспективой снижения затратности и повышения экономической рентабельности процесса производства продовольствия и кормов.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, проект № 21-73-20091, <https://rscf.ru/project/21-73-20091/>.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Воронкова М.В. Разработка новых средств защиты для повышения продуктивности органического растениеводства // Вестник аграрной науки. 2020. №1 (82). С. 30–33. <https://doi.org/10.15217/issn2587-666X.2020.1.30>.
2. Metsamuuronen S., Siren H. Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: a review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce // Phytochemistry Reviews. 2019. Vol. 18. Pp. 623–664. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09630-2>.
3. Tanase C., Talmaciu A.I., Bara I.C., Boz I., Volf I., Oroian S., Popa V.I. New aspects of biomass waste valorization: Spruce bark crude extracts as plant growth regulators // BioResources. 2018. Vol. 13(2). Pp. 3994–4007. <https://doi.org/10.15376/biores.13.2.3994-4007>.
4. Metsamuuronen S., Siren H. Antibacterial Compounds in Predominant Trees in Finland: Review // Journal of Bioprocessing and Biotechniques. 2014. Vol. 4. 167. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000167>.
5. Krauze-Baranowska M., Mardarowicz M., Wiwart M., Poblocka L., Dynowska M. Antifungal Activity of the Essential Oils from Some Species of the Genus *Pinus* // Zeitschrift für Naturforschung C. 2014. Vol. 57(5-6). Pp. 478–482. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-5-613>.

6. Rauha J-P., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kahkonen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H., Vuorel P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds // International Journal of Food Microbiology. 2000. Vol. 56. Pp. 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00218-X).
7. Salem M.Z.M., Elansary H.O., Elkesh A.A., Zeidler A., Ali H.M., El-Hefny M., Yessoufou K. In vitro Bioactivity and Antimicrobial Activity of *Picea abies* and *Larix decidua* Wood and Bark Extracts // BioResources. 2016. Vol. 11(4). Pp. 9421–9437. <https://doi.org/10.15376/biores.11.4.9421-9437>.
8. Hurshkainen T.V., Kutchin A.V. Technology for obtaining of biopreparations and investigation of their effectiveness // Chemistry and Technology of Plant Substances. Apple akademik press, USA, 2017. Pp. 227–241. <https://doi.org/10.1201/9781315207469-11>.
9. Чукичева И.Ю., Хуршкainen Т.В., Кучин А.В. Природные регуляторы роста растений из хвойного сырья // Инноватика и экспертиза. 2018. №3(24). С. 93–99.
10. Nikonova N.N., Hurshkainen T.V., Shevchenko O.G., Kuchin A.V. «Green technology» processing of pine (*Pinus sylvestris* L.) and larch (*Larix sibirica* Ledeb.) wood greenery to produce bioactive extracts // Holzforschung. 2022. Vol. 76, no. 3. Pp. 276–284. <https://doi.org/10.1515/hf-2021-0122>.
11. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии. М., 2005. 608 с.
12. Belimov A.A., Dietz K.J. Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations // Microbiological research. 2000. Vol. 155, no. 2. Pp. 113–121. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80046-4](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80046-4).
13. Ryan M.C., Stucky M., Wakefield C., Melott J.M., Akbani R., Weinstein J.N., Broom B.M. Interactive Clustered Heat Map Builder: An easy web-based tool for creating sophisticated clustered heat maps // F1000Research. 2019. Vol. 8. 1750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20590.2>.
14. Teng J., Zhang R., Zhang Y.-W., Duan H.-Q., Takaishi Y. A new labdanic norditerpene from *Pinus sylvestris* // Natural Product Research. 2010. Vol. 24. Pp. 1587–1591. <https://doi.org/10.1080/14786410802696684>.
15. Cheng S.-S., Chung M.-J., Lin C.-Y., Wang Y.-N., Chang S.-T. Phytochemicals from *Cunninghamia konishii* Hayata act as antifungal agents // J. Agric. Food Chem. 2012. Vol. 60(1). Pp. 124–128. <https://doi.org/10.1021/jf2042196>.
16. Santos A.O., Izumi E., Ueda-Nakamura T., Dias-Filho B.P., Veiga-Junior V.F., Nakamura C.V. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil // Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2013. Vol. 108(1). Pp. 59–64. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000100010>.
17. Koutsaviti A., Milenkovic M., Tzakou O. Antimicrobial activity of the essential oil of Greek endemic *Stachys spruneri* and its main component, isoabienol // Nat. Prod. Commun. 2011. Vol. 6(2). Pp. 277–280. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600231>.
18. Станчева Й. Атлас болезней сельскохозяйственных культур. София; М., 2005. 175 с.
19. Орина А.С., Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю., Ганнибал Ф.Б. Микромицеты *Alternaria* spp. и *Bipolaris sorokiniana* и микотоксины в зерне, выращенном в Уральском федеральном округе // Микология и фитопатология. 2020. Т. 54, №5. С. 365–377. <https://doi.org/10.31857/S0026364820050086>.
20. Belozerskaya T.A., Gessler N.N., Averyanov A.A. Melanin pigments of fungi // Fungal metabolites. Reference series in phytochemistry. Springer, 2017. Pp. 263–291. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_29.
21. Tralamazza S.M., Piacentini K.C., Iwase C.H.T., de Oliveira Rocha L. Toxigenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide // Curr. Opin. Food Sci. 2018. Vol. 23. P. 57. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.002>.
22. Manamgoda D., Cai L., Crous P., Madrid H., Chuksatiro E., Hyde K.D. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus Curvularia* complex // Fungal Divers. 2012. Vol. 56. Pp. 131–144. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0189-2>.
23. Диаките С., Поляков А., Алексеева Т., Азопкова М., Муравьева И. Микотоксины грибов рода *Fusarium* и их влияние на здоровье человека // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной профессору Ю.Д. Жилкову «Экология и здоровье человека». М., 2020. С. 93–97.

Поступила в редакцию 15 апреля 2024 г.

После переработки 10 сентября 2024 г.

Принята к публикации 11 сентября 2024 г.

Khurshkaynen T.V.^{1*}, Nikonova N.N.¹, Nazarova Ya.I.², Shirokikh A.A.², Bokov N.², Shirokikh I.G.², Kuchin A.V.¹
 STUDY OF BIOCIDAL PROPERTIES IN EXTRACTIVE SUBSTANCES FROM CONIFEROUS WOOD GREENERY

¹ Institute of Chemistry, Federal Research Center Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Pervomaiskaya st., 48, Syktyvkar, 167000, Russia, hurshkainen@chemi.komisc.ru

² Federal Agrarian Research Center of the North-East named after. N.V. Rudnitskogo, Lenina st., 166a, Kirov, 610007, Russia

To control plant pathogens, extractive substances isolated from conifer raw materials can offer an environmentally friendly and sustainable alternative to agrochemicals. The article presents the results of studying the extractive substances from coniferous wood greenery (WG) extracted by the emulsion extraction method. Samples of wood greenery extracts from spruce, pine and larch were tested for their biological effect on the growth of phytopathogenic fungi *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria* sp., *Parastagonospora nodorum* H9 and bacteria *Erwinia rhapontici*, *Pseudomonas cepacea*, *Curtobacterium flaccumfaciens* G29r4, *Bacillus* sp. G29r3, *Bacillus aryabhattai* G11r3, *Pedobacter agri*, *Clavibacter michiganensis* under *in vitro* conditions. The obtained results indicate the presence of antibacterial and antifungal activity in the studied samples of coniferous extracts. The working concentrations that provided the most efficient growth suppression of phytopathogenic bacteria and fungi were identified. The phenomenon of the maximum inhibitory activity of the extracts at low concentrations followed by the attenuation of their action with increasing doses was revealed.

Keywords: coniferous extract, *Pinus sylvestris*, *Larix sibirica*, phytopathogens, biocidal properties

For citing: Khurshkaynen T.V., Nikonova N.N., Nazarova Ya.I., Shirokikh A.A., Bokov N., Shirokikh I.G., Kuchin A.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2025, no. 1, pp. 127–138. (in Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.20250115053>.

References

1. Voronkova M.V. *Vestnik agrarnoy nauki*, 2020, no. 1 (82), pp. 30–33. <https://doi.org/10.15217/issn2587-666X.2020.1.30>. (in Russ.).
2. Metsamuuronen S., Siren H. *Phytochemistry Reviews*, 2019, vol. 18, pp. 623–664. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09630-2>.
3. Tanase C., Talmaci A.I., Bara I.C., Boz I., Volf I., Oroian S., Popa V.I. *BioResources*, 2018, vol. 13(2), pp. 3994–4007. <https://doi.org/10.15376/biores.13.2.3994-4007>.
4. Metsamuuronen S., Siren H. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 2014, vol. 4, pp. 167. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000167>.
5. Krauze-Baranowska M., Mardarowicz M., Wiwart M., Poblocka L., Dynowska M. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2014, vol. 57(5–6), pp. 478–482. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-5-613>.
6. Rauha J.-P., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kahkonen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H., Vuorel P. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, vol. 56, pp. 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00218-X).
7. Salem M.Z.M., Elansary H.O., Elkelish A.A., Zeidler A., Ali H.M., El-Hefny M., Yessoufou K. *BioResources*, 2016, vol. 11(4), pp. 9421–9437. <https://doi.org/10.15376/biores.11.4.9421-9437>.
8. Hurshkainen T.V., Kutchin A.V. *Chemistry and Technology of Plant Substances*. Apple akademik press, USA, 2017, pp. 227–241. <https://doi.org/10.1201/9781315207469-11>.
9. Chukicheva I.Yu., Khurshkaynen T.V., Kuchin A.V. *Innovatika i ekspertiza*, 2018, no. 3(24), pp. 93–99. (in Russ.).
10. Nikonova N.N., Hurshkainen T.V., Shevchenko O.G., Kuchin A.V. *Holzforschung*, 2022, vol. 76, no. 3, pp. 276–284. <https://doi.org/10.1515/hf-2021-0122>.
11. Netrusov A.I., Yegorova M.A., Zakharchuk L.M. i dr. *Praktikum po mikrobiologii*. [Workshop on microbiology]. Moscow, 2005, 608 p. (in Russ.).
12. Belimov A.A., Dietz K.J. *Microbiological research*, 2000, vol. 155, no. 2, pp. 113–121. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80046-4](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80046-4).
13. Ryan M.C., Stucky M., Wakefield C., Melott J.M., Akbani R., Weinstein J.N., Broom B.M. *F1000Research*, 2019, vol. 8, 1750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20590.2>.
14. Teng J., Zhang R., Zhang Y.-W., Duan H.-Q., Takaishi Y. *Natural Product Research*, 2010, vol. 24, pp. 1587–1591. <https://doi.org/10.1080/14786410802696684>.
15. Cheng S.-S., Chung M.-J., Lin C.-Y., Wang Y.-N., Chang S.-T. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, vol. 60(1), pp. 124–128. <https://doi.org/10.1021/jf2042196>.
16. Santos A.O., Izumi E., Ueda-Nakamura T., Dias-Filho B.P., Veiga-Junior V.F., Nakamura C.V. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2013, vol. 108(1), pp. 59–64. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000100010>.
17. Koutsaviti A., Milenkovic M., Tzakou O. *Nat. Prod. Commun.*, 2011, vol. 6(2), pp. 277–280. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600231>.
18. Stancheva Y. *Atlas bolezney sel'skokhozyaystvennykh kul'tur*. [Atlas of diseases of agricultural crops.]. Sofiya; Moscow, 2005, 175 p. (in Russ.).
19. Orina A.S., Gavrilova O.P., Gagkayeva T.Yu., Gannibal F.B. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2020, vol. 54, no. 5, pp. 365–377. <https://doi.org/10.31857/S0026364820050086>. (in Russ.).
20. Belozerskaya T.A., Gessler N.N., Averyanov A.A. *Fungal metabolites. Reference series in phytochemistry*. Springer, 2017, pp. 263–291. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_29.

* Corresponding author.

21. Tralamazza S.M., Piacentini K.C., Iwase C.H.T., de Oliveira Rocha L. *Curr. Opin. Food Sci.*, 2018, vol. 23, p. 57. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.002>.
22. Manamgoda D., Cai L., Crous P., Madrid H., Chuksatirote E., Hyde K.D. *Fungal Divers*, 2012, vol. 56, pp. 131–144. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0189-2>.
23. Diakite S., Polyakov A., Alekseyeva T., Azopkova M., Murav'yeva I. *Materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem, posvyashchennoy professoru Yu.D. Zhilovu «Ekologiya i zdorov'ye cheloveka»*. [Proceedings of the All-Russian scientific and practical conference with international participation dedicated to Professor Yu.D. Zhilov "Ecology and human health"]. Moscow, 2020, pp. 93–97. (in Russ.).

Received April 15, 2024

Revised September 10, 2024

Accepted September 11, 2024

Сведения об авторах

Хуршкainen Татьяна Владимировна – кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, hurshkainen@chemi.komisc.ru

Никонова Наталья Николаевна – кандидат технических наук, младший научный сотрудник, Lifedream123456789@gmail.com

Назарова Янина Иордановна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, yan1997183@yandex.ru

Широких Александр Анатольевич – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, aleshirokikh@yandex.ru

Бокков Никита – аспирант, младший научный сотрудник, nikita-bokov@mail.ru

Широких Ирина Геннадьевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, irgenal@mail.ru

Кучин Александр Васильевич – доктор химических наук, академик РАН, профессор, заведующий отделом, kutchin-av@chemi.komisc.ru

Information about authors

Khurshkainen Tatyana Vladimirovna – Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor, Leading Researcher, hurshkainen@chemi.komisc.ru

Nikonova Natalya Nikolaevna – Candidate of Technical Sciences, Junior Researcher, Lifedream123456789@gmail.com

Nazarova Yanina Iordanovna – Candidate of Biological Sciences, Researcher, yan1997183@yandex.ru

Shirokih Aleksandr Anatolyevich – Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, aleshirokikh@yandex.ru

Bokov Nikita – Postgraduate Student, Junior Researcher, nikita-bokov@mail.ru

Shirokih Irina Gennadyevna – Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, irgenal@mail.ru

Kuchin Aleksandr Vasilyevich – Doctor of Chemical Sciences, Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Head of Department, kutchin-av@chemi.komisc.ru