

УДК 632.937.19+582.475+674.032.475.4+634.0.174.154

ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТЕРПЕНОВ И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ: МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Гольдин Е. Б., Гольдина В. Г.

*Южный филиал Национального университета биоресурсов и природопользования Украины
«Крымский агротехнологический университет», Симферополь, Evgeny_goldin@mail.ru*

На основании результатов многолетних исследований проведен анализ биоцидной активности терпеновых соединений и создана методологическая база работы с этими веществами, включающая специальные подходы к их выделению, идентификации и тестированию.

Ключевые слова: терпеновые соединения, биоцидная активность, цианобактерии, микроводоросли, растительоядные организмы, условно патогенные бактерии.

ВВЕДЕНИЕ

Терпеновые соединения (сегодня их насчитывается свыше 55000) – обширная и разнообразная группа ненасыщенных углеводородов (терпенов), в основе которых находится пятиатомная разветвленная углеродная цепь (изопреновая единица), и которые образуют производные, содержащие гетероатомы (терпеноиды). По числу атомов углерода терпеновые соединения делятся на моно-, сескви-, ди-, три-, тетра- и политерпены. Терпены и терпеноиды широко распространены в природе и имеют важное значение для сохранения экологического баланса в межвидовых взаимоотношениях бактерий, цианобактерий, микроводорослей и их симбионтов, макрофитов, простейших, беспозвоночных и растений, а также между различными трофическими уровнями – паразитами, фитофагами, хищниками и жертвами [1, 2]. Терпеновые соединения действуют как средства коммуникации между растениями, растительными сообществами, растениями и насекомыми, оказывают влияние на внутривидовую структуру популяций насекомых (в первую очередь, общественных – муравьев, пчел и термитов) [1, 3, 4]. Будучи вторичными метаболитами микроорганизмов [2, 5], растений [1, 2, 6] и беспозвоночных [7–9], терпеновые соединения принимают участие в формировании ряда жизненных функций организма-продуцента, его межвидовых связей и защитных систем, направленных против врагов, конкурентов или видов-вселенцев. Например, проанализировав межвидовые отношения, существующие в системах «растение-фитофаг», мы выделили ряд групп биологически активных терпеновых соединений – токсины, репелленты, детерренты (антифиданты), стимуляторы и ингибиторы репродуктивной функции, гормоны, ингибиторы роста и развития, антиаттрактанты, пищевые аттрактанты, стимуляторы опыления, половые аттрактанты. При этом терпеновые соединения аналогичного строения могут входить в состав как феромонов тревоги, защитных секретов, половых и пищевых аттрактантов растительноядных организмов, так и вторичных метаболитов

растений. Ряд соединений известен в качестве агентов, защищающих растения от фитофагов. К ним относятся терпеновые спирты (α -терпинеол, терпен-4-ол), альдегиды (цитраль, цитронеллаль, гераниаль) и т. д. Терпены и терпеноиды характеризуются высоким уровнем видовой специфичности, а в ряде случаев могут служить хемотаксономическими маркерами. Для некоторых растительных видов они могут служить репеллентами и детеррентами (антифидантами), например, для колорадского жука [10], для других – токсинами [6], а для определенных видов – аттрактантами [9, 11]. В зависимости от фазы развития растения терпены могут стимулировать питание фитофагов или их отпугивать [12]; аналогичное влияние может оказывать концентрация веществ [12, 13]. Повреждение растений насекомыми стимулирует включение метаболических механизмов, которые способствуют усиленному продуцированию терпенов и формированию защитных систем [14]. Терпеновые соединения могут защищать растения косвенным путем в качестве аттрактантов хищников или паразитоидов, ограничивающих численность и вредоносность фитофагов [15, 16].

Таким образом, благодаря соединениям терпенового ряда и другим вторичным метаболитам, вопреки сложившемуся мнению, происходит не только выбор фитофагом растения-хозяина, но и отбор растительных организмов самим растением.

Применение терпенов для ограничения численности целевых организмов весьма интересно и перспективно. Однако их практическое использование тормозится отсутствием стабильных и экономически выгодных источников первичного сырья. Так, для метаболитов насекомых характерно кратковременное действие, причем некоторые из них бифункциональны. Непосредственное использование растений-продуцентов терпеновых соединений затруднено из-за изменчивости содержания, состава и свойств вторичных метаболитов в зависимости от ряда факторов, а выделение этих веществ из растительного сырья многостадийно, требует значительных затрат и сложного аппаратного оформления. Терпеновые вещества, полученные путем органического синтеза, не свободны от посторонних примесей и могут представлять опасность для широкого круга живых организмов (энтомофагов, пчел, многих гидробионтов и т. д.) и окружающей среды в целом, также реально формирование резистентных рас вредителей.

В качестве альтернативы нами разработана концепция получения терпеновых соединений путем микробного синтеза. В частности, для этой цели могут быть использованы цианобактерии, т. к. в составе их метаболитов обнаружены разнообразные группы терпенов – углеводороды, спирты, эфиры, альдегиды и т. д. [5]. Некоторые из них идентифицированы у насекомых и растений и проявляют высокую биологическую активность в природе. Изучение материалов, отражающих избирательное действие терпеновых соединений во взаимоотношениях между организмами, показывает необходимость исследований аналогичных веществ среди метаболитов микроорганизмов (включая цианобактерии и микроводоросли), растений и беспозвоночных. Основная цель работ в этой области заключается в поиске терпеновых комплексов с высокой биологической активностью,

проявляемой по отношению к растительноядным организмам, и разработке практических аспектов их использования в системах защиты растений [17, 18]. На основании результатов многолетних исследований биологической/биоцидной активности терпеновых соединений нами разработана методологическая база работы с этими веществами, включающая специальные подходы к их выделению, идентификации и тестированию. Для получения исходного сырья – необходимых объемов биомассы цианобактерий и микроводорослей – мы предложили ряд технологий, основанных на добыче природного материала, непрерывном культивировании и использовании отходов переработки биомассы, образующихся в процессе различных производств (например, белково-витаминного концентрата).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Терпеновые фракции и их отдельные компоненты могут быть выделены из природного микробного, а также растительного или животного материала. Биомассу высушивают лиофильным или тепловым (37°C) способами; такой режим обработки оптимален для сохранения естественного состава терпеновых веществ. Затем следует измельчение сухого материала при помощи лабораторных мельниц и его просеивание через сита диаметром 0,063–0,1 мм. Выделение терпеновых фракций из порошка проводят путем водно-паровой отгонки по методам Гинзберга и Далматова, что способствует получению соединений в чистом виде. Для достижения более полного извлечения фракции используют экстракцию гексаном в аппарате Сокслета.

Качественный и количественный состав компонентов определяют методами газо-жидкостной хроматографии. При низкой концентрации терпеновых соединений в водно-паровом дистилляте проводят его дополнительное концентрирование путем экстракции диэтиловым эфиром с последующим упариванием на водяной бане.

В качестве тест-объектов рекомендуется выбирать широко распространенные, доступные и принятые в практике лабораторных исследований виды различного эволюционного уровня. Например, использование коллекционных культур условно патогенных бактерий и лабораторной популяции мухи-дрозофилы *Drosophila melanogaster* Meigen (дикий тип) обеспечивает быстрое получение результатов, отражающих уровень биоцидности, который включает проявления антибактериального, детеррентного (антифидантного), энтомоцидного, метатоксического и других ингибирующих эффектов. Желательно также проведение комплексных исследований, ежедневно дающих полную информацию о состоянии тест-объектов. (для бактерий – рост колоний на твердых средах и сохранение жизнеспособности, а для насекомых – поведение, питание, рост, метаморфоз, выживаемость и плодовитость). Биоцидную активность летучих фракций определяют путем их добавления в питательную среду для насекомых. Затем мухами-дрозофилами (группой из четырех самцов и четырех самок в каждой из повторностей в вариантах опытов) заселяют поверхность среды. Для оценки наиболее активных фракций и отдельных компонентов личиночные фазы растительноядных насекомых, собранные в природных и природно-антропогенных

экосистемах, рассаживают в стеклянные сосуды, по 10–15 особей в каждый. В качестве корма используют наиболее типичные растения-хозяева, на листья которых при помощи лабораторного опрыскивателя наносят тестируемые соединения, после чего размещают подопытных насекомых; каждый вариант эксперимента включает от трех до пяти повторностей. Наблюдения за питанием, поведением, метаморфозом и выживаемостью насекомых проводят ежедневно. В контрольных вариантах корм обрабатывается водой или остается без обработки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обоснованность предложенного направления подтверждается фактическими данными, полученными в лабораторных, полевых и производственных экспериментах.

Бактериальные тест-объекты. Исследование роли терпеновых соединений в проявлении антибактериальной активности лабораторной культуры цианобактерии *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenk. показало, что наиболее выраженным бактериостатическим действием на *Staphylococcus aureus* обладает терпеновая фракция в целом, а также эвгенол. У других бактериальных культур (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* и *Vibrio paracholerae*) ингибирование роста было значительно слабее (цитронеллол в вариантах с *E. coli* и *V. paracholerae*), гераниол, эвгенол и фракция в целом по отношению к *V. paracholerae*) или же вообще не наблюдалось [19].

Растительноядные насекомые. Природные популяции цианобактерий (доминирующий вид *M. aeruginosa* – 98,0%), содержащие терпеновые соединения, ингибировали питание, рост, метаморфоз и размножение растительноядных насекомых – колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say, американской белой бабочки *Huphantria cunea* Drury, непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L., плодовой моли *Hyponomeuta padella* L., златогузки *Euproctis chryorrhae* L. и кольчатого коконопряда *Malacosoma neustria* L. Личиночные фазы насекомых, особенно на стадии младших возрастов, были наиболее чувствительны к действию альгометаболитов, и на протяжении этого периода развития большая часть подопытных особей (70,0–100,0%) погибала. Смертность последующих личиночных стадий, куколок и имаго была не столь высока, но в этих случаях наблюдался метатоксический эффект. Например, в природных популяциях колорадского жука происходило снижение общей численности насекомых из-за смертности особей, непосредственно подвергшихся действию цианобактерий, на всех фазах развития (89,3–97,4%) и отдаленного эффекта на второго поколения, который снижал численность популяции на 22,8–62,7% (в контрольном варианте без обработки этот показатель возрос на 717,3%). Биоцидность терпеновых соединений, экстрагированных из биомассы цианобактерий, проявилась при скормливании обработанных ими листьев клена ясенелистного *Acer negundo* L. гусеницам американской белой бабочки второго возраста. Это приводило к гибели 51,7–76,0% насекомых на 10 сутки; 68,3–91,3% – на 15-е; и 81,7–96,0% на 20-е сутки. В составе фракции были обнаружены линалоол, линалилацетат, терпинеол и β-фенилэтанол. Из них наиболее активна смесь линалоола и линалилацетата (1:1), от которой на

пятые сутки опыта насекомые полностью погибали. Гистологическое исследование пораженных гусениц выявило дистрофические и некробиотические изменения в жировом теле. У других терпеновых соединений отмечен метатоксический эффект, проявившийся в явлении последействия: выжившие гусеницы уступают в весе контрольным, а личиночно-куколичный и куколично-имагинальный метаморфозы нарушены. При этом выделенные терпеновые соединения не оказывали отрицательного влияния на колорадского жука, что свидетельствует об избирательном характере их действия. Однако липидно-пигментный комплекс ("альгопаста"), экстрагированный из этого же альгологического материала и содержащий ряд терпеновых соединений (линалоол, β -фенилэтанол, терпинеол, гераниол и линалилацетат), в лабораторных и полевых условиях вызывал в течение 72 часов гибель 58,4–75,6% личинок колорадского жука и 57,7–75,5% гусениц американской белой бабочки второго возраста (на пятые сутки – 84,4–100,0%) [17, 18]. Первичные экспериментальные препараты в применяемых концентрациях и дозах безвредны для растений, энтомофагов (жужелиц и кокцинелл) и теплокровных животных. Их биологическая активность сопоставима с действием известных микробных инсектицидов, а в некоторых случаях использование этих средств предпочтительнее. Кроме того, необходимо обратить внимание на поиск и выделение активных веществ с биоцидными свойствами, продуцируемых другими видами цианобактерий и микроводорослей.

Некоторые аспекты биологической активности терпенов представляют особый интерес с точки зрения защиты растений и нуждаются в обсуждении. Эти соединения выполняют разнообразные функции и вызывают ряд реакций со стороны насекомых, которые носят видоспецифичный характер. Речь идет о таких веществах как цитраль, цитронеллол, эвгенол, α -терпинеол, β -фенилэтанол, лимонен, α -пинен и т. д.

В составе защитных секретов и феромонов тревоги Hymenoptera и некоторых Coleoptera, включая мирмекофилов, присутствуют цитраль, цитронеллаль, различные спирты, в т.ч. линалоол и др. [4]. Биоцидные свойства линалоола подтверждены в экспериментах на непарном шелкопряде [20]. Эфирное масло цитронеллы, содержащее гераниол, цитронеллол, цитроналлаль, борнеол и другие терпены, отпугивает *Tribolium castaneum* Hbst., *Callosobruchus chinensis* L. and *Periplaneta americana* (L.) [21]. Цитронеллол известен как основная часть (85,0%) защитного секрета муравья *Lasius umbratus* Nyl. [22] и как репеллент для некоторых видов комаров. При этом некоторые терпеновые соединения (линалоол, линалилацетат, гераниол, эвгенол и др.) ведут себя как аттрактанты по отношению к ряду членистоногих [9, 12], в т.ч. и полезных насекомых. Например, α -терпинеол и β -фенилэтанол [11, 23] известны в этом качестве для тутового шелкопряда *Bombyx mori* L., а гераниол – для медоносной пчелы *Apis mellifera* L. [24]. Линалоол, нераль и гераниаль были выделены из мандибулярных желез коллетовых пчел [25]. Результаты экспериментальных работ с терпеновыми соединениями свидетельствуют об избирательном характере их действия. Так, терпеновая фракция, выделенная из хвои сосны, проявила антифидантные и энтомоцидные свойства по отношению к американской белой бабочке, но повела себя как

комплекс токсичных веществ для колорадского жука [6]. С другой стороны, эти компоненты могут быть безвредными для тутового шелкопряда и медоносной пчелы [11], что свидетельствует о возможности успешного использования терпенов в биологической защите растений. Прежде всего, такая возможность привлекательна для районов интенсивного шелководства, где применение химических и бактериальных инсектицидов затруднено и нежелательно.

Перспективность направления подтверждается созданием в последние годы новых препаратов для защиты растений. Например, биостат 60% к.э., изготовленный на основе терпеновых соединений растительного происхождения из кубовых остатков и фракций кориандрового масла, по данным Всероссийского НИИ биологической защиты растений, обладает бактерицидной и фунгицидной активностью по отношению к корневым гнилям озимой пшеницы, серой гнили и милдью винограда. Также он характеризуется инсектоакарицидным действием по отношению к широкому кругу фитофагов – чешуекрылым, колорадскому жуку и т. д. (при этом препарат является аттрактантом для энтомофагов колорадского жука из сем. Coccinellidae, Pentatomidae, Chrysopidae). Биостат также характеризуется нематоцидным эффектом. Препарат быстро разлагается в окружающей среде, не накапливаясь в почве, воде, растениях и не оказывая отрицательного влияния на позвоночных и полезных насекомых. В Институте биологии Карельского исследовательского центра РАН экспериментально доказана нематоцидная активность терпеновых соединений коры хвойных деревьев при их внесении в почву для борьбы с *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975, причем параллельно происходит стимулирование развития картофеля.

В других опытах применение эмульсии α -терпинеола на томатах и огурцах подавляло развитие бахчевой и персиковой тлей на 90–95,0%, а паутинного клеща – на 60–70,0%. Водная эмульсия кориандрового масла на 97,0% угнетала большую картофельную тлю, а некоторые его фракции проявляли фунгицидную активность (курчавость персика, парша семечковых) [26]. Также хорошо зарекомендовали себя системы, основанные на комплексном действии бактериальных инсектицидов и терпеновых соединений [27].

ВЫВОДЫ

1. Терпеновые соединения характеризуются сложным и многосторонним влиянием на основные жизненные функции живых организмов различного эволюционного уровня.

2. Терпеновые соединения обладают высоким уровнем биоцидной активности по отношению к ряду видов условно патогенных бактерий и растительноядных организмов, проявляя при этом избирательное действие.

3. Наиболее перспективным направлением в области получения терпеновых соединений для практического использования в современных условиях следует признать микробный синтез или использование биомассы цианобактерий.

4. Полученный фактический материал может быть основой для планирования дальнейших комплексных работ, включая экспериментальное обоснование

биохимических и токсико-биологических аспектов механизма действия терпеновых метаболитов на различные живые системы.

Список литературы

1. Biochemical aspects of plant and animal coevolution / [Ed. by J.D. Harborne]. – New York: Academic Press, 1978. – 435 p.
2. Algal chemical ecology / [Ed. by C. Amsler]. – Berlin-London: Springer, 2008. – 314 p.
3. Prestwich G.D. Interspecific variations of diterpene composition of *Cubitermes* soldier defence secretions / G.D. Prestwich // *Journal of Chemical Ecology*. – 1984. – Vol. 10, N 8. – P. 1219–1231.
4. Листов М.В. Химическая защита у членистоногих и изменчивость организмов / М.В. Листов. – Л.: Наука, 1989. – 157 с.
5. Сакевич А.И. Экзометаболиты пресноводных водорослей / А.И. Сакевич. – К.: Наукова думка, 1985. – 197 с.
6. Гольдин Е.Б., Гольдина В.Г. Эфирные масла сосны обыкновенной и защита растений от вредных насекомых / Е.Б. Гольдин, В.Г. Гольдина // *С. –х. науки: Науч. тр. Крым. гос. аграрного ун-та.* – Вып. 75. – Симферополь, 2002. – С. 50–53.
7. Labdane diterpenes from the marine pulmonate gastropod *Trimusculus peruvianus* / [A. San-Martin, E. Quezada, P. Soto et al.] // *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* – 1996. – Vol. 74, N 12. – P. 2471–2475
8. A new meroditerpenoid dimer from an undescribed Philippine marine sponge of the genus *Strongylophora* / [M. Balbin-Oliveros, R.A. Edrada, P. Proksch et al.] // *Journal of Natural Products*. – 1998. – Vol. 61, N 7. – P. 948–952
9. Plant terpenes affect intensity and temporal parameters of pheromone detection in a moth / [V. Party, C. Hanot, I. Said, Renou M.] // *Chemical Senses*. – 2009. – Vol. 34, N 9. – P. 763–774.
10. Panasiuk O. Response of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), to volatile components of tansy, *Tanacetum vulgare* / O. Panasiuk // *Journal of Chemical Ecology*. – 1984. – Vol. 10, N 9. – P. 1325–1333.
11. Hamamura Y. The substances that control the feeding behaviour and the growth of the silkworm *Bombyx mori* L. / Y. Hamamura // *Control of insect behaviour by natural products*. – New York – London: Academic Press, 1970. – P. 55–80
12. Behavioural responses of *Bemisia tabaci* B-biotype to three host plants and their volatiles / [F-Q. Cao, W-X. Liu, Z-N. Fan et al.] // *Acta Entomologica Sinica*. – 2008. – Vol. 51, N. 8. – P. 830–838.
13. Fan J.T. Influences of host volatiles on feeding behaviour of the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*. / J.T. Fan, J.H. Sun // *Journal of Applied Entomology*. – 2006. – Vol. 130, N 4. – P. 238–244.
14. Real-time monitoring of herbivore induced volatile emissions in the field / [A. Schaub, J.D. Blande, M. Graus et al.] // *Physiologia Plantarum*. – 2010. – Vol. 138, N 2. – P. 123–133.
15. Ali J.G. Subterranean herbivore-induced volatiles released by citrus roots upon feeding by *Diaprepes abbreviatus* recruit entomopathogenic nematodes / [J.G. Ali, H.T. Alborn, L.L. Stelinski] // *Journal of Chemical Ecology*. – 2010. – Vol. 36, N 4. – P. 361–368.
16. Mumm R. Variation in natural plant products and the attraction of bodyguards involved in indirect plant defense / R. Mumm, M. Dicke // *Can. J. Zool.* – 2010. – Vol. 88, N 7. – P. 628–667.
17. Gol'din E.B. Insecticidal activity of harmful cyanobacteria: the role of terpene substances / E.B. Gol'din, V.G. Gol'dina // *Harmful Algal Blooms 2000* (Eds. G.M. Hallegraeff et al.). – Paris: IOC of UNESCO, 2000. – P. 403–406.
18. Гольдин Е.Б. Терпены природного происхождения и проблемы защиты растений / Е.Б. Гольдин, В.Г. Гольдина // *С. –х. науки: Науч. тр. Крым. гос. аграрного ун-та.* – Вып. 76. – Симферополь, 2004. – С. 174–178.
19. Гольдин Е.Б. Антибактериальная активность альгологически чистых культур цианобактерий и микроводорослей / Е.Б. Гольдин // *Мікробіол. журн.* – 2003. – 65, № 4. – С. 68–76.
20. Biological activity of linalool / [T. Stević, O. Tomaši, M. Kostić et al.] // *3rd Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*. – Nitra, 2004. – P. 72–73.
21. Saraswathi L. Repellent effect of cytronella oil on certain insects / L. Saraswathi, R.A. Purushotham // *Pesticides*. – 1987. – Vol. 21, N 7. – P. 23–24.

22. Blum M.S. Chemical releasers of social behaviour. II. Terpenes in the mandibular glands of *Lasius umbratus* / M.S. Blum et al. // Annals of the Entomological Society of America. – 1968. – Vol. 61, N 6. – P. 1354–1359.
23. Molecular basis of female-specific odorant responses in *Bombyx mori* [A.R. Anderson, K.W. Wanner, S.C. Trowell et al.] // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2009. – Vol. 39, N 3. – P. 189–197.
24. Koltermann R. Periodicity in the activity and learning performance of the honeybee / R. Koltermann // Experimental analysis of insect behaviour. – Berlin – Heidelberg – New York, 1974. – P. 218–227
25. Hefetz A. Linalool, neral and geranial in the mandibular glands of *Colletes* bees – an aggregation pheromone / A. Hefetz, S.W. Batra, M.S. Blum // Experientia. – 1979. – Vol. 35, N 3. – P. 319–320.
26. Надыкта В.Д. Биозащита растений / В.Д. Надыкта, В.Я. Исмаилов, В.Г. Коваленков // Защита и карантин растений. – 1999. – № 12. – С. 21–22.
27. Гримальский Г.М. Комбинированное действие бактериальных препаратов и терпеноидов / Г.М. Гримальский, Г.М. Емельянич // Защита растений. – 1984. – № 5. – С. 29.

Гольдін Є. Б., Гольдіна В. Г. Еколого-біологічне значення терпенів та їх практичне використання: методологічні аспекти // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Сімферополь: ТНУ, 2011. Вип. 4. С. 104–111.

На підставі результатів багаторічних досліджень запроваджено аналізу біоцидної активності терпенових сполук та створено методологічної бази роботи з цими речовинами, що вмістить спеціальні підходи до їх виділення, ідентифікації та тестування

Ключові слова: терпенові сполуки, біоцид на активність, ціанобактерії, мікрководорості, рослинні організми, умовно патогенні бактерії.

Gol'din E. B., Gol'dina V. G. Ecological and biological importance of terpenes and their practical using: methodological aspects // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2011. Iss. 4. P. 104–111.

Biocidal activity of terpene compounds was analysed on the basis of results of long-term investigations. The methodological foundation of terpene research was designed, including their isolation, identification and testing.

Key words: terpene compounds, biocidal activity, cyanobacteria, microalgae, herbivorous organisms, conditionally pathogenic bacteria.

Поступила в редакцію 05.08.2011 г.