

ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ ЧЕРНОЙ НОЖКИ КАРТОФЕЛЯ

А.А. ДАЦЮК, Р.И. ТАРАКАНОВ

(Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева)

Оценена антибактериальная активность 25 образцов эфирных масел и 7 образцов водных и этанольных растительных экстрактов против комплекса возбудителей черной ножки картофеля *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*, *Dickeya dadantii* и *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. По отношению к описанным видам патогенов проведены исследования *in vitro* с применением метода диффузии в агаре, определены минимальные ингибирующие (МИК) и минимальные бактерицидные концентрации (МБК) эфирных масел и экстрактов растений. По итогам скрининга для дальнейших исследований в условиях *in vivo* были выбраны эфирные масла душицы обыкновенной, коричника китайского, гвоздичного дерева, а также этанольные экстракты бадана толстолистного и дуба обыкновенного. В тестах на инфекционном фоне оценивали способность выбранных эфирных масел и экстрактов предотвращать мацерацию клубней картофеля при их применении в профилактических и лечебных целях. При лечебном применении данных эфирных масел в концентрации 40 мг/мл и более и растительных экстрактов в концентрации 150 мг/мл и более биологическая эффективность составляла 12,4–48,7%, а при профилактическом применении – 35,3–100%. Анализы ГХ–МС и ГХ–ПИД показали, что основным веществом в составе эфирного масла душицы обыкновенной выступал карвакрол (62,32%), в составе коричника китайского – коричный альдегид (84,25%), в составе гвоздичного дерева – эвгенол (76,98%). В составах экстрактов бадана толстолистного и дуба обыкновенного преобладали уксусная (27,85%) и капроновая (28,52%) кислоты соответственно.

Ключевые слова: черная ножка картофеля, бактериальные возбудители мягкой гнили, защита растений, антимикробная активность, эфирные масла, растительные экстракты, *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*, *Dickeya dadantii*.

Введение

Развитие бактериальных заболеваний на картофеле является одним из важнейших лимитирующих факторов при производстве картофеля во всем мире, вызывая серьезные экономические потери как во время возделывания, так и в период послеуборочного хранения. При этом одними из наиболее опасных патогенов являются пектолитические бактерии в составе родов *Pectobacterium* и *Dickeya*, возбудители мягкой гнили и черной ножки картофеля. Данные патогены являются близкородственными граммотрицательными бактериями, способными вызывать мягкую гниль и загнивание растительных тканей у широкого круга однодольных и двудольных растений-хозяев по всему миру [23].

Несмотря на то, что основным источником заражения картофеля возбудителями черной ножки являются латентно инфицированные семенные клубни [6], пектобактерии также способны к длительному выживанию на растительных остатках [38], способствуя перезаражению растущих в поле растений-хозяев, а также заражению нового урожая во время уборки и транспортировки [21], проникая в ткани растений через естественные или механические повреждения, преимущественно при повышенной влажности.

К сожалению, агротехнические меры по защите картофеля не обеспечивают приемлемый уровень защиты от возбудителей черной ножки картофеля [16], а сертифицированные семена не всегда являются решением проблемы ввиду возможности распространения патогенов аэрогенно. Несмотря на отсутствие эффективных мер борьбы с черной ножкой картофеля, химический метод остается наиболее распространенным. Однако применение пестицидов влечет за собой опасность как для окружающей среды, так и для самого человека ввиду накопления их в продукции растениеводства.

В связи с вышеупомянутыми рисками перспективным является использование альтернативных нетоксичных антимикробных агентов – так называемых ботанических пестицидов, к которым относятся эфирные масла и экстракты растений.

В последнее десятилетие активно разрабатываются научные основы применения ботанических пестицидов в защите растений от вредных организмов (табл. 1). Результаты показывают большие перспективы их применения в защите растений от пектолитических бактерий эфирных масел [15, 20] и экстрактов растений [9].

Целью работы явилась оценка антибактериальных свойств эфирных масел и растительных экстрактов по отношению к возбудителям черной ножки картофеля в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Материал и методика исследований

Для оценки антибактериальных свойств эфирных масел и экстрактов растений были использованы референтные штаммы пектолитических бактерий из коллекции DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Германия) *Dickeya chrysanthemi* (DSM 4610), *Dickeya dadantii* (DSM 18020), *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* (DSM 30168), *Pectobacterium carotovorum subsp. odoriferum* (DSM 22556).

Для первичного скрининга антибактериальной активности эфирных масел и экстрактов растений были использованы эфирные масла 25 растений и 7 растительных экстрактов (4 водных и 3 спиртовых) из 6 растений. Перечень растений представлен в таблице 1.

Растительные образцы для последующего выделения эфирных масел и экстрактов растений были собраны в Ботаническом саду Первого МГМУ имени И.М. Сеченова в июле 2021 г. После сбора образцы растений высушивали в темном вентилируемом помещении в течение 20 дней. Затем образцы измельчали и подвергали гидродистилляции с использованием аппарата Клевенджера. Маслянистый слой, находящийся поверх водного дистиллята, отделяли и сушили над безводным сульфатом натрия для удаления остаточной воды из эфирного масла. Экстрагированные эфирные масла хранили в герметичных пробирках при 4°C до дальнейшего анализа [13].

Экстракты растений получали с помощью прибора Сокслета, используя в качестве растворителей 96%-ный этанольный спирт и дистиллированную воду. Предварительно измельченный растительный материал помещали внутрь экстрактора поверх бумажного обеззоленного фильтра, затем заливали растворитель в соотношении 1:4. Установку помещали на нагреватель и проводили экстрагирование. Полученные экстракты концентрировали досуха на роторном испарителе RE100-Pro (DLab, Beijing, Китай) при 50°C, после чего растворяли в ДМСО до 50%-ной концентрации. Полученные растворы растительных экстрактов хранили в герметичных пробирках при 4°C до дальнейшего анализа [18].

Анализ эфирных масел и экстрактов растений проводили при помощи газового хроматографа Agilent 8890 GC System с двумя независимыми каналами, капиллярными кварцевыми колонками DB-1MS (длина – 60 м, диаметр – 0,25 мм, толщина пленки неподвижной фазы – 0,25 мкм) с применением масс-спектрометрического (МСД) и пламенно-ионизационного детекторов (ПИД) [7].

**Список растительных образцов,
используемых для выделения эфирных масел и экстрактов растений**

Источник выделения			Орган выделения	Упоминание в научной литературе
Название (рус.)	Название (лат.)	Семейство		
Эфирные масла				
Анис обыкновенный	<i>Pimpinella anisum</i> L.	Зонтичные (<i>Apiaceae</i>)	Семена	[36]
Гвоздичное дерево	<i>Syzygium aromaticum</i> L.	Миртовые (<i>Myrtaceae</i>)	Стебли, листья, соцветия	[3]
Душица обыкновенная	<i>Origanum vulgare</i> L.	Яснотковые (<i>Lamiaceae</i>)	Листья, стебли	[1]
Кардамон настоящий	<i>Elettaria cardamomum</i> L.	Имбирные (<i>Zingiberaceae</i>)	Семена	[2]
Кориандр посевной	<i>Coriandrum sativum</i> L.	Зонтичные (<i>Apiaceae</i>)	Семена	[42]
Коричник китайский	<i>Cinnamomum cassia</i> L.	Лавровые (<i>Lauraceae</i>)	Листья	[19]
Лаванда узколистная	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Яснотковые (<i>Lamiaceae</i>)	Листья, соцветия	[23]
Лайм настоящий	<i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	Рутовые (<i>Rutaceae</i>)	Кожура плодов	[30]
Мандарин Клементин	<i>Citrus unshiu</i>	Рутовые (<i>Rutaceae</i>)	Кожура плодов	[47]
Мята длиннолистная	<i>Mentha longifolia</i> L.	Яснотковые (<i>Lamiaceae</i>)	Стебли, листья, соцветия	[22]
Мята перечная	<i>Mentha piperita</i> L.	Яснотковые (<i>Lamiaceae</i>)	Стебли, листья, соцветия	[12]
Пижма обыкновенная	<i>Tanacetum vulgare</i> L.	Астровые (<i>Asteraceae</i>)	Листья, соцветия	[38]
Пихта сибирская	<i>Abies sibirica</i> Ledeb.	Сосновые (<i>Pinaceae</i>)	Ветви, хвоя	[40]
Розмарин обыкновенный	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Яснотковые (<i>Lamiaceae</i>)	Листья, соцветия	[48]
Ротанговая пальма	<i>Calamus rotang</i> L.	Пальмовые (<i>Arecaceae</i>)	Корневище	[35]
Рута душистая	<i>Ruta graveolens</i> L.	Рутовые (<i>Rutaceae</i>)	Листья, стебли	[31]

Источник выделения			Орган выделения	Упоминание в научной литературе
Название (рус.)	Название (лат.)	Семейство		
Тимьян обыкновенный	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Яснотковые (<i>Lamiaceae</i>)	Листья, соцветия	[34]
Тмин обыкновенный	<i>Carum carvi</i> L.	Зонтичные (<i>Apiaceae</i>)	Семена	[26]
Тысячелистник обыкновенный	<i>Achillea millefolium</i> L.	Астровые (<i>Asteraceae</i>)	Соцветия	[27]
Фенхель обыкновенный	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Зонтичные (<i>Apiaceae</i>)	Семена	[25]
Цитрус бергамот	<i>Citrus aurantium</i> subsp. <i>bergamia</i>	Рутовые (<i>Rutaceae</i>)	Кожура плодов	[14]
Чабер садовый	<i>Satureja hortensis</i> L.	Яснотковые (<i>Lamiaceae</i>)	Стебли, листья, соцветия	[36]
Черный тмин	<i>Nigella sativa</i> L.	Лютиковые (<i>Ranunculaceae</i>)	Семена	[8]
Чеснок посевной	<i>Allium sativum</i> L.	Амариллисовые (<i>Amaryllidaceae</i>)	Дольки луковицы	[10]
Шалфей лекарственный	<i>Salvia officinalis</i> L.	Яснотковые (<i>Lamiaceae</i>)	Листья, соцветия	[44]
Растительные экстракты				
Бадан толстолистный	<i>Bergenia crassifolia</i> L.	Камнеломковые (<i>Saxifragaceae</i>)	Корневище	[28]
Дуб обыкновенный	<i>Quercus robur</i> L.	Буковые (<i>Fagaceae</i>)	Кора	[45]
Кедр сибирский	<i>Pinus sibirica</i> Du Tour	Сосновые (<i>Pinaceae</i>)	Хвоя	[5]
Лук репчатый	<i>Allium cepa</i> L.	Луковые (<i>Allioideae</i>)	Луковица	[43]
Орех манчжурский	<i>Juglans mandshurica</i> Maxim.	Ореховые (<i>Juglandaceae</i>)	Листья	[46]
Ротанговая пальма	<i>Calamus rotang</i> L.	Пальмовые (<i>Arecaceae</i>)	Корневище	[35]

Относительное количество отдельных компонентов было рассчитано по хроматограммам и выражено в процентах площади пика по отношению к площади пика от общего объема пробы. Идентификацию компонентов проводили путем сравнения их относительного времени удержания и масс-спектров со значениями для эталонных

соединений при помощи библиотеки спектров Nist (National Institute of Standards and Technology, США) [7].

Для получения стабильной масляной эмульсии эфирные масла растворяли до 5%-ной концентрации в 2,5%-ном Tween 20 (Duchefa Farma B.V., Haarlem, Нидерланды). В качестве положительного контроля использовали 4%-ный раствор антибиотика гентамицина (ДальХимФарм. Хабаровск, Россия).

Первичный скрининг антибактериальной активности эфирных масел и экстрактов растений по отношению к пектолитическим бактериям проводили методом диффузии в агаре. Для этого 200 мкл суспензии бактерий в концентрации 10^8 КОЕ/мл высевали в чашку Петри с питательной средой YD (YDC без CaCO_3). Через 30 мин на поверхность засеянной среды раскладывали стерильные диски фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, пропитанные 5 мкл тестируемого эфирного масла или экстракта. В качестве отрицательного контроля использовали диски с 5 мкл 2,5%-ного водного раствора Tween 20.

Положительным контролем служили диски, пропитанные 5 мкл 4%-ного раствора гентамицина. Диски с нанесенными на них растворами помещали в центр инокулированной суспензией бактерии чашки Петри с агаром и инкубировали при 28°C в течение 24 ч. Диаметр стерильных зон, образовавшихся на бактериальном газоне, измеряли штангенциркулем без учета значения диаметра диска. Эфирные масла и экстракты растений, показавшие наибольшие зоны ингибирования роста бактерий, использовали в последующих опытах по определению МИК и МБК. Эксперимент был проведен в трехкратной повторности, результат представлен как среднее арифметическое по варианту \pm стандартное отклонение [11].

Тест на определение значений МИК проводили в стерильном 96-луночном планшете (Corning, США) с использованием метода разведения питательного бульона. В первую ячейку планшеты вносили 40 мкл 5%-ного эфирного масла, после чего со 2 по 9 ячейку включительно вносили по 20 мкл жидкой среды YD и проводили в обозначенных ячейках серийные двухкратные разведения масла в бульоне. Из последней, 9 ячейки, удаляли по 20 мкл питательной среды. Далее добавляли в каждую из 9 ячеек по 10 мкл суспензии бактерии в жидкой среде YD в концентрации 10^6 КОЕ/мл по 10 мкл 0,1%-ного резазурина и по 160 мкл жидкой среды. 10 лунка служила контролем без масла, 11 лунка – контролем без резазурина, 12 лунка – контролем без бактериальной суспензии. Обозначенные лунки доводили до 200 мкл с помощью жидкой среды.

Таким образом, исследуемые концентрации эфирных масел варьировали в диапазоне от 1 до 0,004% [33].

Планшет инкубировали при 28°C в течение 24 ч. После истечения установленного времени оценивали окраску лунок планшета. Синий или фиолетовый цвет свидетельствовал об отсутствии роста бактериальной культуры в лунке, розовый цвет, наоборот, указывал на рост бактерий. Значение МИК было взято при наименьшей концентрации антибактериальных агентов, ингибирующих рост бактерий (цвет оставался синим) [11].

МБК для эфирных масел был определен как самая низкая концентрация антибактериальных агентов, способная полностью исключить рост бактерий. Тест МБК проводили путем переноса 20 мкл бульона из лунок, окрашенных в результате вышеописанного теста в синий/фиолетовый цвет на агаризованную среду YD. Затем чашки инкубировали при 28°C в течение 24 ч, по прошествии этого времени отмечали самую низкую концентрацию масла, при которой не наблюдался видимый рост колоний после культивирования на питательной среде. Это значение принимали за МБК.

Для получения стабильных растворов водные и спиртовые экстракты растений растворяли до 50%-ной концентрации в ДМСО. В качестве положительного контроля брали 4%-ный раствор антибиотика гентамицина.

Исследования антибактериальной активности растительных экстрактов были проведены по той же методике, по которой определяли МИК, но без внесения в лунки планшеты раствора резазурина. Сами разведения проводили в лунках с 1 по 5 таким образом, чтобы исследуемые концентрации растительных экстрактов варьировали в диапазоне от 10 до 0,625%. 6 лунка служила контролем без экстракта, 7 лунка – контролем без бактериальной суспензии.

Планшет инкубировали при 28°C в течение 24 ч, после чего отбирали по 10 мкл культуры бактерий из каждой лунки планшеты, проводили десятикратные разведения и высевали на агаризованную среду YD. Через 24 ч инкубации при 28°C сравнивали количество колоний в исследуемых образцах с количеством колоний в контроле. Для каждого экстракта самая низкая концентрация, которая препятствовала росту микроорганизмов, была обозначена как МИК. Концентрация экстракта, при которой после посева смеси не было роста бактериальных колоний, была обозначена как МБК [4].

Дополнительно оценивали жизнеспособность бактерий в питательном бульоне с экстрактами растений по способности к мацерации ломтиков клубней картофеля. Для этой цели ломтики картофеля инокулировали 10 мкл культуры бактерий в жидкой питательной среде из каждой лунки планшеты и помещали в чашки Петри в условия влажной камеры. Герметично упакованные чашки Петри инкубировали в термостате в течение 24 ч при 28°C. По прошествии этого времени оценивали диаметр мацерации ломтика картофеля при помощи штангенциркуля.

Для оценки лечебной и профилактической активности эфирных масел и экстрактов растений против возбудителей черной ножки картофеля *in vivo* были отобраны клубни картофеля средней семенной фракции сорта Ресурс. В каждом варианте использовали по 5 клубней. Клубни поверхностно стерилизовали 96%-ным раствором этанола, промывали под проточной водой и сушили в течение 12 ч при комнатной температуре.

При постановке опыта по оценке лечебной активности антибактериальных агентов клубни травмировали ножом, нанося рану глубиной 6 мм и диаметром 2 мм вдоль продольной оси клубня. Инокуляцию клубней проводили путем внесения 20 мкл бактериальной суспензии с концентрацией 10^6 КОЕ/мл в рану. Обработку эфирными маслами и экстрактами проводили спустя 4 ч, равномерно распределяя раствор по поверхности клубня из расчета 10 мл раствора/100 г клубня, и оставляли для просушивания при комнатной температуре на 5 ч.

Для оценки профилактического действия эфирных масел и экстрактов растений клубни картофеля вначале травмировали, как описано выше, после чего обрабатывали растворами антибактериальных агентов и оставляли для просушивания. Затем приступали к инокуляции клубней в места ранений суспензией патогенных штаммов и оставляли еще на 4 ч при комнатной температуре до впитывания суспензии.

Помимо обработанных антибактериальными агентами клубней, в эксперимент включали образцы положительного контроля (клубни, инокулированные бактериальной суспензией и обработанные раствором 2,5%-ного Tween 20 в случае с эфирными маслами, дистиллированной водой – в случае с экстрактами растений) и отрицательного контроля (клубни, обработанные дистиллированной водой, без инокуляции бактериями).

После просушивания все клубни помещали в условия влажной камеры в стерильные пластиковые боксы и инкубировали при 25°C в течении 5 дней [17].

Через установленное время обработанные эфирными маслами/экстрактами растений и контрольные клубни разрезали вдоль продольной оси и поперек места инокуляции для измерения диаметра (D, мм) и глубины мацерации (d, мм). Влияние эфирных масел и экстрактов оценивали по 2 показателям: глубине мацерации клубня (Р) и биологической эффективности от применения масел и экстрактов (БЭ).

Глубину мацерации рассчитывали по формуле [29]:

$$P, \text{мм} = \frac{[(D/2) + (d - 6)]}{2} \quad (1)$$

Биологическую эффективность рассчитывали по формуле [41]:

$$\text{БЭ, \%} = \left[\frac{(D_{\text{положительный контр.}} - D_{\text{добработка маслом / экстрактом}})}{D_{\text{положительный контр.}}} \right] \times 100. \quad (2)$$

Результаты и их обсуждение

Первичный скрининг антибактериальной активности 25 эфирных масел и 7 экстрактов растений методом диффузии в агаре показал различную степень антибактериальной активности в отношении 4 исследуемых штаммов пектолитических бактерий (рис. 1): высокую (зона ингибирования 15,0 мм и более), умеренную (зона ингибирования от 10,0 до 14,9 мм) и низкую (зона ингибирования менее 10,0 мм). При этом диаметр зоны варьировал как в зависимости от тестируемого эфирного масла или экстракта, так и от штамма (табл. 2).

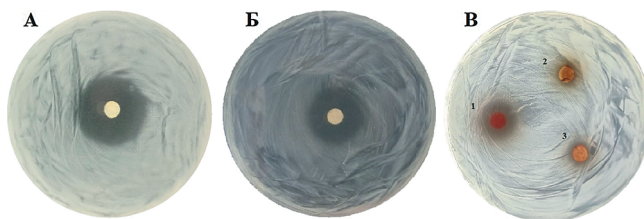


Рис. 1. Зоны ингибирования бактерии вокруг дисков с эфирными маслами и экстрактами растений на газонах возбудителей черной ножки картофеля:

- А – диск с эфирным маслом коричника китайского на газоне *D. chrysanthemi*;
Б – диск с эфирным маслом гвоздичного дерева на газоне *P. carotovorum subs. odoriferum*;
В – диски с растительными экстрактами ореха манчжурского (1), кедра сибирского (2) и бадана толстолистного (спиртового) (3) на газоне *D. dadantii*

Ввиду большого количества образцов и штаммов задачами первичного скрининга явились селекция наиболее активных веществ и их дальнейшее подробное исследование. В связи с этим для последующих исследований были выбраны эфирные масла душицы обыкновенной, коричника китайского, тмина обыкновенного, пихты сибирской, кориандра посевного, тимьяна обыкновенного, чабера садового и гвоздичного дерева.

Среди растительных экстрактов величина зон ингибирования варьировала в основном в умеренном диапазоне. При этом ни один экстракт, кроме экстракта дуба обыкновенного, не проявлял антибактериальных свойств одновременно ко всем исследуемым патогенам. Однако каждый растительный экстракт проявлял умеренную антибактериальную активность по крайней мере к одному из исследуемых видов пектобактерий, в связи с чем было решено использовать все экстракты на следующем этапе скрининга.

Стоит также отметить, что отобранные эфирные масла и экстракты растений проявили высокую антибактериальную активность по сравнению с антибиотиком гентамицином, зоны ингибирования которого соответствовали низкой степени антибактериальной активности (от 7,6 до 9,2 мм). В положительном контроле с применением эмульгатора Tween 20 зон ингибирования роста бактерий не наблюдалось.

Значения диаметров зон ингибирования при оценке антибактериальной активности эфирных масел и экстрактов растений против возбудителей черной ножки картофеля методом диффузии на диске, мм (ВЭ – водный экстракт, СЭ – спиртовой экстракт)

Источник выделения	Диаметр стерильной зоны, мм (среднее значение ± стандартное отклонение)			
	<i>D. chrysanthemi</i>	<i>P. carotovorum</i> <i>subs. odoriferum</i>	<i>D. dadantii</i>	<i>P. carotovorum</i> <i>subsp. carotovorum</i>
Эфирные масла				
Анис обыкновенный	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0
Гвоздичное дерево	20,6 ± 1,5	18,0 ± 1,0	15,3 ± 0,6	15,6 ± 0,6
Душица обыкновенная	26,0 ± 1,7	34,6 ± 1,1	30,3 ± 0,6	32,6 ± 1,1
Кардамон настоящий	9,0 ± 0,0	9,6 ± 0,6	8,6 ± 0,6	8,0 ± 0,0
Кориандр посевной	11,0 ± 0,0	14,3 ± 1,1	16,3 ± 0,6	15,0 ± 0,0
Коричник китайский	27,0 ± 1,7	19,6 ± 0,6	21,6 ± 1,5	29,0 ± 1,0
Лаванда узколистная	10,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	9,0 ± 1,4	8,0 ± 0,0
Лайм настоящий	12,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	7,6 ± 0,6
Мандарин Клементин	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Мята длиннолистная	9,0 ± 1,4	9,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0
Мята перечная	7,5 ± 0,7	9,0 ± 1,4	10,0 ± 0,0	10,0 ± 1,4
Пижма обыкновенная	10,6 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,6 ± 0,6	9,3 ± 0,6
Пихта сибирская	11,6 ± 0,6	17,3 ± 1,1	20,3 ± 0,6	18,0 ± 0,0
Розмарин обыкновенный	12,3 ± 0,6	10,0 ± 0,0	13,0 ± 1,1	14,3 ± 0,6
Ротанговая пальма	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	14,6 ± 0,6
Рута душистая	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	10,6 ± 0,6	0,0 ± 0,0
Тимьян обыкновенный	22,0 ± 1,4	15,0 ± 0,0	21,0 ± 2,1	23,0 ± 0,0
Тмин обыкновенный	18,3 ± 0,6	10,6 ± 0,6	11,3 ± 1,1	12,3 ± 0,6
Тысячелистник обыкновенный	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Фенхель обыкновенный	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,6 ± 0,6	8,6 ± 0,6
Цитрус бергамот	11,0 ± 0,0	13,6 ± 1,1	13,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Чабер садовый	27,3 ± 2,1	14,6 ± 0,5	27,6 ± 0,6	27,6 ± 1,1

Источник выделения	Диаметр стерильной зоны, мм (среднее значение ± стандартное отклонение)			
	<i>D. chrysanthemi</i>	<i>P. carotovorum</i> <i>subs. odoriferum</i>	<i>D. dadantii</i>	<i>P. carotovorum</i> <i>subsp. carotovorum</i>
Чёрный тмин	8,5 ± 0,6	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
Чеснок посевной	8,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Шалфей лекарственный	12,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Растительные экстракты				
Бадан толстолистный (ВЭ)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,6	14,6 ± 0,6
Бадан толстолистный (СЭ)	11,6 ± 0,6	14,7 ± 1,1	9,0 ± 1,0	18,3 ± 1,5
Дуб обыкновенный (СЭ)	10,3 ± 0,6	12,0 ± 0,0	11,6 ± 0,6	15,6 ± 1,1
Кедр сибирский (ВЭ)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6
Лук репчатый (ВЭ)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	10,0 ± 1,0	15,3 ± 0,6
Орех манчжурский (ВЭ)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	14,6 ± 0,6	13,6 ± 1,1
Ротанговая пальма (СЭ)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12,6 ± 0,6
Стандарт				
Гентамицин	7,6 ± 1,1	8,5 ± 0,0	9,2 ± 0,6	8,0 ± 0,0

Для подтверждения данных об антибактериальных свойствах 8 эфирных масел и 7 экстрактов растений определяли наименьшую их концентрацию, ингибирующую рост бактерий (МИК), и минимальную бактерицидную концентрацию, приводящую к гибели бактерий (МБК), методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде (табл. 3).

Значения МИК тестируемых эфирных масел варьировали в диапазоне от 1,25 до 10,0 мг/мл. При этом только значения эфирных масел душицы обыкновенной, коричника китайского и гвоздичного дерева находились в минимальном диапазоне: от 1,25 до 2,5 мг/мл. Наименьшие показатели МБК по отношению ко всем используемым бактериальным штаммам также были отмечены у трех вышеперечисленных масел, в связи с чем только эти масла были использованы для последующих исследований.

Антибактериальную активность экстрактов растений оценивали путем культивирования на агаризированной среде аликвот смеси питательного бульона с растительными экстрактами и бактериальным инокулятом, отмечая минимальную концентрацию экстракта, при которой не наблюдался рост бактериальных колоний (рис. 2). Проводили также оценку степени мацерации ломтиков картофеля, инокулированных аликвотами той же смеси (рис. 3).

Значения МИК растительных экстрактов оказались значительно выше, чем МИК эфирных масел, и колебались в основном в диапазоне от 12,5 до 100,0 мг/мл (табл. 3). Экстракты, значения МИК которых по отношению хотя бы к одному из используемых патогенов превышали 100,0 мг/мл, были определены как низкоэффективные и в дальнейших исследованиях не использовались.

**Значения МИК и МБК эфирных масел и экстрактов растений
при оценке антибактериальной активности против возбудителей
черной ножки картофеля методом разведения в жидкой питательной среде, %
(ВЭ – водный экстракт, СЭ – спиртовой экстракт)**

Источник выделения	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК), %				Минимальная бактерицидная концентрация (МБК), %			
	<i>D. chrysanthemi</i>	<i>P. carotovorum</i> subs. <i>odori-ferum</i>	<i>D. dantii</i>	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>D. chrysanthemi</i>	<i>P. carotovorum</i> subs. <i>odori-ferum</i>	<i>D. dantii</i>	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
Эфирные масла								
Гвоздичное дерево	0,25	0,25	0,25	0,125	0,5	0,5	0,5	0,25
Душица обыкновенная	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5	0,25	0,5	0,5
Кориандр посевной	1,0	1,0	0,5	1,0	>1,0	>1,0	1,0	>1,0
Коричник китайский	0,125	0,25	0,125	0,125	0,25	0,5	0,5	0,25
Пихта сибирская	1,0	0,5	0,5	0,5	>1,0	>1,0	1,0	>1,0
Тимьян обыкновенный	1,0	1,0	0,5	0,5	>1,0	>1,0	>1,0	1,0
Тмин обыкновенный	0,5	1,0	1,0	1,0	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0
Чабер садовый	0,5	1,0	0,5	0,5	>1,0	>1,0	1,0	1,0
Растительные экстракты								
Бадан толстолистный (ВЭ)	>10,0	10,0	>10,0	>10,0	не определена	>10,0	не определена	не определена
Бадан толстолистный (СЭ)	5,0	1,25	5,0	2,5	10,0	2,5	10,0	5,0
Дуб обыкновенный (СЭ)	5,0	1,25	2,5	2,5	10,0	2,5	5,0	5,0
Кедр сибирский (ВЭ)	>10,0	>10,0	>10,0	10,0	не определена	не определена	не определена	>10,0
Лук репчатый (ВЭ)	>10,0	>10,0	10,0	10,0	не определена	не определена	>10,0	>10,0
Орех манчжурский (ВЭ)	>10,0	>10,0	10,0	10,0	не определена	не определена	>10,0	>10,0
Ротанговая пальма (СЭ)	>10,0	>10,0	>10,0	10,0	не определена	не определена	не определена	>10,0

Таким образом, в качестве наиболее эффективных растительных экстрактов были отобраны этанольные экстракты бадана толстолистного и дуба обыкновенного, значения МИК которых варьировали в диапазоне от 12,5 до 50,0 мг/мл по отношению ко всем исследуемым пектобактериям.

Значения МБК растительных экстрактов подтверждали данные, полученные в результате оценки мацерации ломтиков картофеля и представленные на рисунке 3. Так, для тех экстрактов, чьи значения МБК были определены, мацерация на ломтиках отсутствовала вплоть до достижения значений МИК. Например, для штамма *P. carotovorum subs. odoriferum* значения МБК экстракта бадана толстолистного и МБК экстракта дуба обыкновенного составляли 25 мг/мл, а при инокулировании ломтиков картофеля аликвотами смеси культуры бактерий с экстрактами, в соответствующих концентрациях, зоны мацерации отсутствовали (рис. 4).

Таким образом, мацерация на ломтиках начинает проявляться лишь с концентраций экстрактов, соответствующих значениям МИК, что подтверждает объективность значений МБК экстрактов.

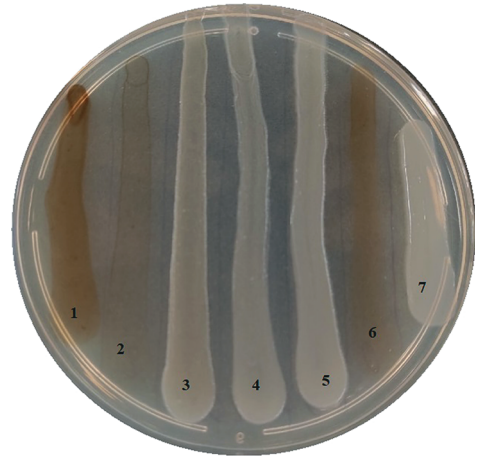


Рис. 2. Оценка антибактериальной активности экстрактов растений по отношению к возбудителю черной ножки картофеля путем культивирования на агаризированной среде разведений смеси питательного бульона с растительными экстрактами: 1–5 – концентрации растительных экстрактов от 10,0 до 0,625%; 6 – контроль без добавления суспензии бактерий; 7 – контроль без растительного экстракта

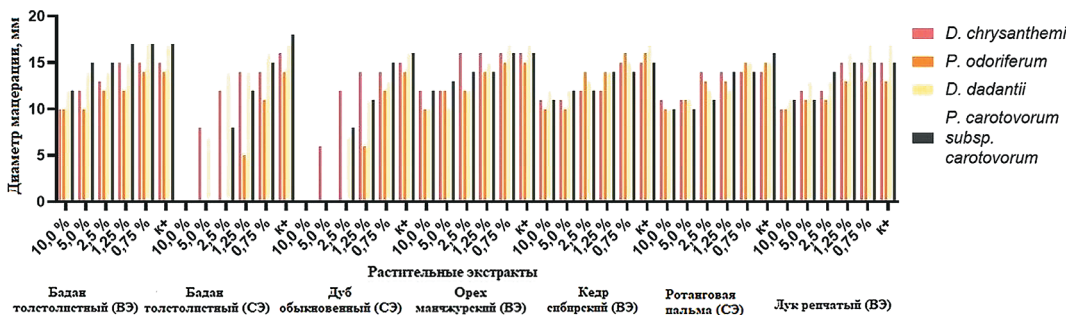


Рис. 3. Значения диаметров зон мацерации ломтиков картофеля при оценке антибактериальной активности растительных экстрактов против возбудителей черной ножки методом инокуляции ломтиков аликвотами разведений культуры бактерий в смеси жидкой питательной среды с растительными экстрактами, мм

Были проведены эксперименты по оценке профилактического и лечебного действия эфирных масел и растительных экстрактов против развития черной ножки на клубнях картофеля.

При профилактическом применении эфирных масел против используемых патогенных штаммов была достигнута 100%-ная биологическая эффективность при использовании эфирного масла душицы обыкновенной в диапазоне концентраций 60–100 мг/мл, эфирного масла коричника китайского в концентрации 40 мг/мл и эфирного масла гвоздичного дерева в концентрации 100 мг/мл (против *P. carotovorum subs. odoriferum* и *D. dadantii*) (рис. 5). При концентрации масла в 10 мг/мл БЭ варьировала

в основном в диапазоне от 17,6 до 36,5% (для масел душицы обыкновенной и коричника китайского). Минимальные значения БЭ были отмечены при применении эфирного масла гвоздичного дерева против штаммов *D. chrysanthemi* и *P. carotovorum subsp. odoriferum* и составили 3,1 и 1,6% соответственно.

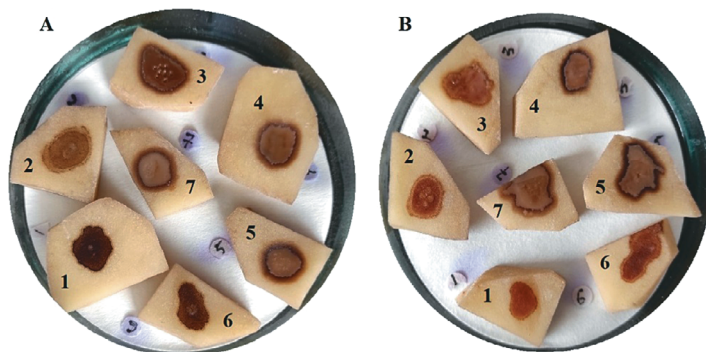


Рис. 4. Оценка антибактериальной активности экстрактов растений по отношению к возбудителям черной ножки картофеля путем оценки мацерации на ломтиках картофеля, инокулированных аликвотами разведений культуры бактерий в жидкой питательной среде с добавлением растительных экстрактов:
 А – экстракт дуба обыкновенного + суспензия *P. carotovorum subsp. carotovorum*;
 Б – экстракт бадана толстолистного + суспензия *P. carotovorum subsp. carotovorum*;
 1–5 – концентрации растительных экстрактов от 10,0 до 0,625%;
 6 – контроль без добавления суспензии бактерий; 7 – контроль без растительного экстракта

При профилактическом использовании растительных экстрактов на клубнях, обработанных экстрактом бадана толстолистного в диапазоне концентрации 150–200 мг/мл и экстрактом дуба обыкновенного в концентрации 100–150 мг/мл, также была достигнута 100%-ная БЭ. При снижении концентраций экстрактов до минимальной используемой концентрации в 50 мг/мл БЭ при профилактическом применении варьировала от 14,3 до 35,8%.

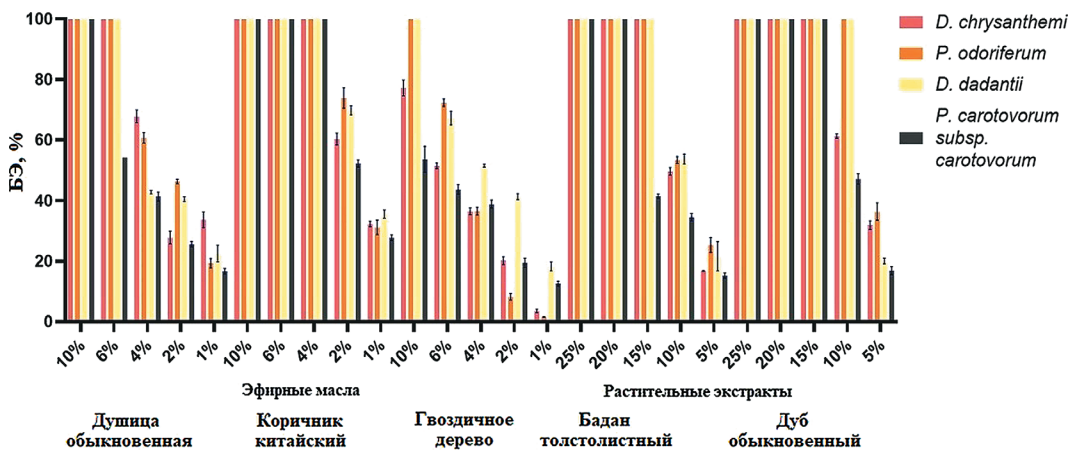


Рис. 5. Биологическая эффективность в защите клубней от черной ножки при профилактической обработке эфирными маслами и экстрактами, %

Биологическая эффективность при лечебном применении эфирных масел оказалась значительно ниже, чем при профилактической обработке. При максимальных из исследуемых концентраций масел БЭ варьировала в диапазоне от 35,6 до 69,9%,

когда первое значение отмечено по отношению к *P. carotovorum subsp. carotovorum* с обработкой эфирным маслом гвоздичного дерева, а второе значение – к *D. dadantii* в сочетании с обработкой эфирным маслом коричника китайского (рис. 6). При снижении концентрации эфирных масел до 10 мг/мл БЭ варьировала от 0,8% для *D. chrysanthemi* и обработки эфирным маслом гвоздичного дерева – до 26,9% для *P. carotovorum subsp. odoriferum* с применением эфирного масла коричника китайского.

100%-ная биологическая эффективность не была достигнута при лечебном применении растительных экстрактов. Значения БЭ варьировали в диапазоне от 40,2 до 71,3% при концентрации экстрактов 200 мг/мл, когда первое значение отмечено по отношению к *P. carotovorum subsp. carotovorum* с обработкой экстрактом бадана толстолистного, а второе значение – к *D. chrysanthemi* при обработке экстрактом дуба обыкновенного. При использовании растительных экстрактов в концентрации 50 мг/мл БЭ варьировала от 1,1% для экстракта бадана толстолистного против *P. carotovorum subsp. carotovorum* и до 22,4% – экстракта дуба обыкновенного против *P. carotovorum subsp. odoriferum*.

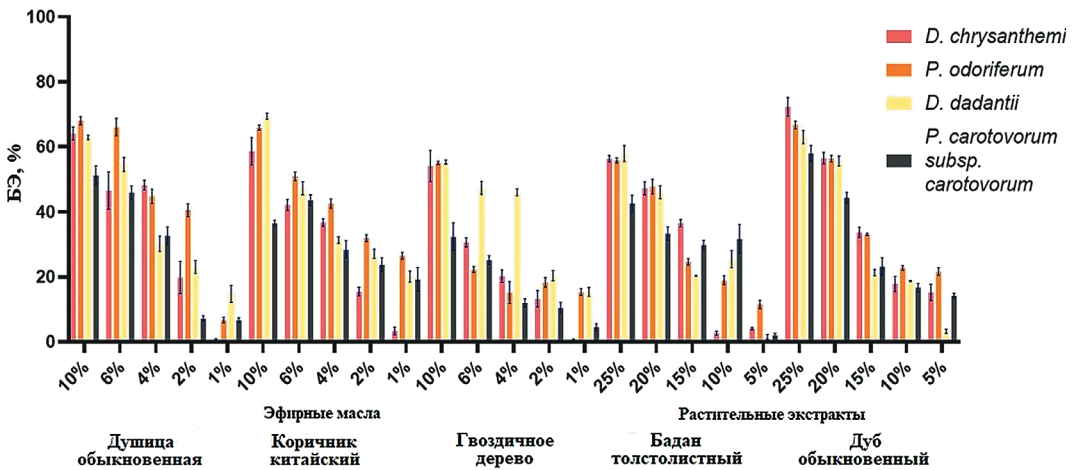


Рис. 6. Биологическая эффективность от применения обработки эфирными маслами и экстрактами клубней картофеля, предварительно инокулированных возбудителями черной ножки, %

На обработанных эфирными маслами и растительными экстрактами клубнях наблюдали значительное снижение глубины мацерации по сравнению с необработанными образцами (рис. 7).

В вариантах, показавших 100%-ную БЭ при профилактической обработке, соответственно не отмечалась мацерация. Дальнейшее же снижение концентрации эфирных масел и экстрактов приводило к увеличению глубины проникновения патогена в клубни. Однако даже при концентрации масла 10 мг/мл глубина проникновения мацерации на обработанных клубнях была ниже, чем в контрольном варианте. Например, минимальное значение глубины мацерации при использовании эфирных масел в концентрации 10 мг/мл было зафиксировано против *P. carotovorum subsp. odoriferum* при предварительной обработке маслом коричника китайского и составило лишь 7,2 мм против 14,5 мм в контроле. При снижении концентрации растительных экстрактов до 50 мг/мл значение Р варьировало от 7,5 мм для *P. carotovorum subsp. odoriferum* с применением экстракта дуба обыкновенного против 14,5 мм в контроле до 16,0 мм для *D. chrysanthemi* с обработкой экстрактом бадана толстолистного против 19,2 мм в контроле.

В тесте по оценке лечебного действия глубина мацерации клубня при применении эфирных масел и экстрактов при их максимальных из тестируемых концентрациях

варьировала от 1,6 до 6,2 мм по сравнению с 17,1–20,4 мм в контрольном варианте, что несколько хуже результатов, полученных при профилактическом действии эфирных масел (рис. 8). Минимальное значение Р при обработке эфирными маслами в концентрации 10 мг/мл было зафиксировано на варианте с обработкой маслом коричника китайского против *P. carotovorum subsp. odoriferum* и составило 11,4 мм. Среди экстрактов в концентрации 50 мг/мл диапазон значений Р варьировал от 11,3 мм для *P. carotovorum subsp. odoriferum* в варианте с обработкой экстрактом дуба обыкновенного до 18,9 мм для *D. chrysanthemi* с обработкой экстрактом бадана толстолистного, что также оказалось ниже соответствующих значений в контроле.

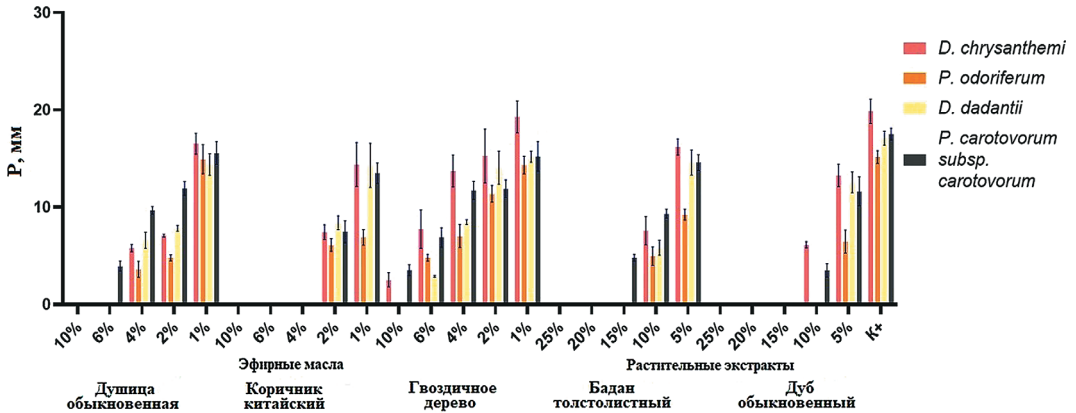


Рис. 7. Влияние предварительной обработки эфирными маслами и экстрактами на глубину мацерации клубней картофеля, инокулированных возбудителями черной ножки, мм

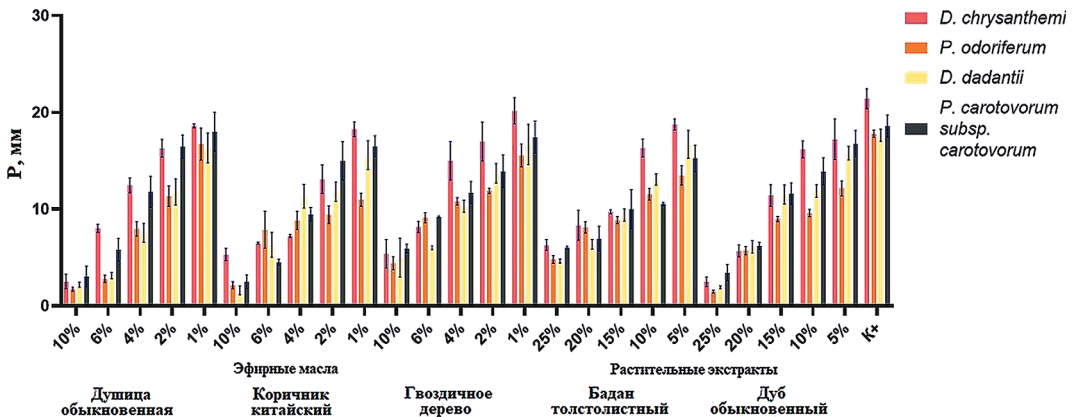


Рис. 8. Влияние предварительной обработки эфирными маслами и экстрактами на глубину мацерации клубней картофеля, предварительно инокулированных возбудителями черной ножки, мм

Образцы эфирных масел и экстрактов растений оценивали качественно и количественно с помощью ГХ–МС и ГХ–ПИД соответственно. Компоненты, преобладающие в составе эфирных масел и экстрактов растений, представлены на рисунке 9.

Всего при анализе трех эфирных масел и 2 растительных экстрактов было идентифицировано: 24 соединения в составе эфирного масла душицы обыкновенной (карвакрол (62,32%), цимен (19,85%), гамма-терпинен (4,85%), тимол (3,52%), линалоол (2,53%) и т.д.); 18 соединений – в составе эфирного масла коричника китайского (коричный альдегид (84,25%), о-метоксикоричный альдегид (6,91%), диметил

ацеталь коричного альдегида (3,36%) и т.д.); 16 соединений – в составе эфирного масла гвоздичного дерева (эвгенол (76,98%), кариофиллен (14,91%), ацетат эвгенола (2,97%) и т.д.); 22 соединения – в составе экстракта бадана толстолистного (уксусная кислота (27,85%), 5-метил-3-метилендигидро 2(3Н)-фуранон (20,32%), эвгенол (10,94%), капроновая кислота (6,91%), метил салицилат (5,22%), пулегон (4,46%), тимол (3,32%) и т.д.); 28 соединений – в составе экстракта дуба обыкновенного (капроновая (28,52%), изовалериановая (28,31%), уксусная (21,88%), 3-метилвалериановая (2,19%), пропионовая (2,18%), 2-метилмасляная (1,89%), валериановая (1,77%) кислоты и т.д.).

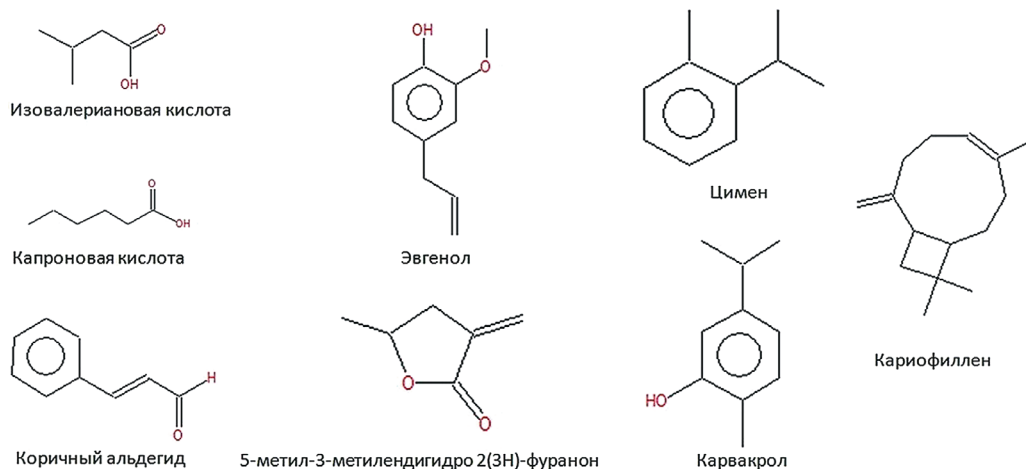


Рис. 9. Структурные формулы основных соединений, содержащихся в исследуемых эфирных маслах и растительных экстрактах

В результате анализа источников литературы было установлено обладание антибактериальными свойствами всеми основными компонентами исследуемых нами биологически активных веществ, что подтверждают многочисленные исследования. Так, при исследовании эфирного масла коричника китайского преобладающим веществом в его составе выступал коричный альдегид [19], были отмечены его антибактериальные свойства по отношению к некоторым грамотрицательным бактериям. Также сообщалось об антибактериальных свойствах карвакрола и эвгенола по отношению к пектолитическим бактериям [3]. Кислоты же, преобладающие в составе экстрактов бадана толстолистного и дуба обыкновенного, встречаются при анализе многих других растительных экстрактов и аналогично вышеописанным веществам обладают антибактериальными свойствами по отношению к широкому кругу патогенов [9, 20, 28, 45, 46].

Выводы

При тестировании *in vitro* эфирных масел и экстрактов растений была отмечена высокая антибактериальная активность эфирных масел душицы обыкновенной, коричника китайского и гвоздичного дерева, а также этанольных экстрактов бадана толстолистного и дуба обыкновенного против четырех штаммов возбудителей черной ножки картофеля из родов *Pectobacterium* и *Dickeya*. В тестах *in vivo* данные эфирные масла и экстракты также проявляли свои антибактериальные свойства, предотвращая развитие мацерации на клубнях картофеля как при профилактическом, так и при лечебном применении.

Установлено, что при лечебном применении вышеописанных эфирных масел в концентрации 40 мг/мл и выше их биологическая эффективность варьировала от 20,3 до 48,7%,

а при профилактическом применении – от 35,3 до 100%. Биологическая эффективность от профилактического использования растительных экстрактов в концентрации 150 мг/мл и более составляла 41,4–100,0%, а при лечебном использовании – 20,3–36,5%.

Полученные данные указывают на потенциал применения эфирных масел и растительных экстрактов в защите картофеля от бактериозов.

Работа выполнена за счет средств Программы развития университета в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

Авторы выражают благодарность агроному Ботанического сада Первого Московского государственного медицинского университета Ю.Б. Рогачеву за помощь в сборе и видовой идентификации лекарственных растений.

Библиографический список

1. Ха В.Т.Н., Джалилов Ф.С.У. Антибактериальная активность эфирных масел и их использование для обеззараживания семян капусты от сосудистого бактериоза // Известия ТСХА. – 2014. – № 6. – С. 59–68.
2. Alam A., Rehman N.U., Ansari M.N., Palla A.H. Effects of essential oils of *Elettaria cardamomum* grown in India and Guatemala on gram-negative bacteria and gastrointestinal disorders // *Molecules*. – 2021. – Т. 26, № 9. – С. 2546.
3. Alkan D., Yemencioğlu A. Potential application of natural phenolic antimicrobials and edible film technology against bacterial plant pathogens // *Food Hydrocolloids*. – 2016. – Т. 55. – С. 1–10.
4. Ambrico A., Trupo M., Magarelli R., Balducchi R., Ferraro A., Hristoforou E. Effectiveness of *Dunaliella salina* extracts against *Bacillus subtilis* and bacterial plant pathogens // *Pathogens*. – 2020. – Т. 9, № 8. – С. 613.
5. Amri I., Gargouri S., Hamrouni L., Hanana M., Fezzani T., Jamoussi B. Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil // *Journal of pest science*. – 2012. – Т. 85, № 2. – С. 199–207.
6. Baghaee-Ravari S.B., Moslemkhani K., Khodaygan P. Assessment of genetic variability of prevalent pectinolytic bacteria causing potato tuber soft rot in eastern Iran // *Journal of Plant Pathology*. – 2013. – С. 107–113.
7. Baharum S.N., Bunawan H., Ghani M.A.A., Mustapha W.A.W., Noor N.M. Analysis of the chemical composition of the essential oil of *Polygonum minus* Huds. using two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF MS) // *Molecules*. – 2010. – Т. 15, № 10. – С. 7006–7015.
8. Behidj-Benyounes N., Letifi S., Slamani L., Itouchene D., Dahmane T. STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF A RANGE OF PLANT EXTRACTS AGAINST THE CAUSATIVE AGENT OF POTATO BLACKLEG DISEASE (PECTOBACTERIUM) // *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*. – 2017. – Т. 17. – С. 999–1006.
9. Bhardwaj S.K., Laura J.S. Potential use of some plant-extracts against *Fusarium moniliforme* // *ORYZA-An International Journal on Rice*. – 2008. – Т. 45, № 1. – С. 48–52.
10. Bhat K.A., Viswanath H.S., Bhat N.A., Wani T.A. Bioactivity of various ethanolic plant extracts against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot of potato tubers // *Indian Phytopathology*. – 2017. – Т. 70, № 4. – С. 463–470.
11. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, 10th ed.; CLSI document M07-A10; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2015.

12. Dhaliwal H.J.S., *Thind T.S., Chander M.* Relative activity of essential oils from plants against *Penicillium digitatum* causing post-harvest fruit rot of Kinnow mandarin // *Plant Dis. Res.* – 2004. – T. 19. – C. 140–143.
13. El Gendy A.N., *Leonardi M., Mugnaini L., Bertelloni F., Ebani V.V., Nardoni S., Manciantic F., Hendawya S., Omer E., Pistelli L.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Origanum syriacum* plants grown in Sinai, Egypt // *Industrial Crops and Products.* – 2015. – T. 67. – C. 201–207.
14. *Fisher K., Phillips C.A.* The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems // *Journal of applied microbiology.* – 2006. – T. 101, № 6. – C. 1232–1240.
15. *Gebarowska E., Politowicz J., Szumny A.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Geranium robertianum* L. essential oil // *Acta poloniae pharmaceutica.* – 2017. – T. 74, № 2. – C. 699–705.
16. *Gerayeli N., Baghaee-Ravari S., Tarighi S.* Evaluation of the antagonistic potential of *Bacillus* strains against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and their role in the induction of resistance to potato soft rot infection // *European Journal of Plant Pathology.* – 2018. – T. 150, № 4. – C. 1049–1063.
17. *Hajian-Maleki H., Baghaee-Ravari S., Moghaddam M.* Herbal essential oils exert a preservative effect against the potato soft rot disease // *Scientia Horticulturae.* – 2021. – T. 285. – C. 110192.
18. *Harborne J.B.* Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman & Hall Pub. – London: UK, 1998.
19. *Huang D.F., Xu J.G., Liu J.X., Zhang H., Hu Q.P.* Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria // *Microbiology.* – 2014. – T. 83, № 4. – C. 357–365.
20. *Ikeura H., Kobayashi F.* Antimicrobial and antifungal activity of volatile extracts of 10 herb species against *Glomerella cingulata* // *International Journal of Biology.* – 2015. – T. 7, № 9. – C. 77.
21. *Inglis D., Schroeder B.K., Johnson D.A.* Bacterial Soft Rot and Lenticel Spot on Potato Tubers. – Washington State University Extension, 2011.
22. *Javed B., Nadhman A.* Optimization, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles against plant bacterial pathogens phyto-synthesized by *Mentha longifolia* // *Materials Research Express.* – 2020. – T. 7, № 8. – C. 085406.
23. *Jianu C., Pop G., Gruia A., Horhat F.G.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula x intermedia*) grown in Western Romania // *International journal of agriculture and biology.* – 2013. – T. 15. – № 4.
24. *Joshi J.R., Burdman S., Lipsky A., Yedidia I.* Effects of plant antimicrobial phenolic compounds on virulence of the genus *Pectobacterium* // *Research in microbiology.* – 2015. – T. 166, № 6. – C. 535–545.
25. *Kalleli F., Ghassen A.B.I.D., Salem I.B., BOUGHALLEB-M'HAMDI N., M'HAMDI M.* Essential oil from fennel seeds (*Foeniculum vulgare*) reduces *Fusarium wilt* of tomato (*Solanum lycopersicon*) // *Phytopathologia Mediterranea.* – 2020. – T. 59, № 1. – C. 63–76.
26. *Khosravipour S., Rezaeian-Doloei R.* Antibacterial activity of *Carum copticum* essential oil against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. – 2015.
27. *Kotan R., Cakir A., Ozer H., Kordali S., Cakmakci R., Dadasoglu F., Kazaz C., Dikbas N., Aydin T.* Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic

- bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria // *Scientia Horticulturae*. – 2014. – T. 172. – C. 210–220.
28. *Kraśniewska K., Gniewosz M., Synowiec A., Przybył J.L., Bączek K., Węglarz Z.* The application of pullulan coating enriched with extracts from *Bergenia crassifolia* to control the growth of food microorganisms and improve the quality of peppers and apples // *Food and bioproducts processing*. – 2015. – T. 94. – C. 422–433.
29. *Lapwood D.H., Read P.J., Spokes J.* Methods for assessing the susceptibility of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* and *carotovora* // *Plant Pathology*. – 1984. – T. 33, № 1. – C. 13–20.
30. *Lemes R.S., Alves C.C., Estevam E.B., Santiago M.B., Martins C.H., Santos T.C.D., Crotti A.E.M., Miranda M.L.* Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria // *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. – 2018. – T. 90. – C. 1285–1292.
31. *Nahar L., El-Seedi H.R., Khalifa S.A., Mohammadhosseini M., Sarker S.D.* Ruta essential oils: Composition and bioactivities // *Molecules*. – 2021. – T. 26, № 16. – C. 4766.
32. *Nissen L., Zatta A., Stefanini I., Grandi S., Sgorbati B., Biavati B., Monti A.* Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.) // *Fitoterapia*. – 2010. – T. 81, № 5. – C. 413–419.
33. *Nouri M., Baghaee-Ravari S., Emadzadeh B.* Nano-emulsified savory and thyme formulation show limited efficacy to suppress *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* compared with pure oil // *Industrial Crops and Products*. – 2021. – T. 161. – C. 113216.
34. *Oliva M.D.L.M., Carezzano M.E., Giuliano M., Daghero J., Zygodlo J., Bogino P., Giordano W., Demo M.* Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean // *Plant Biology*. – 2015. – T. 17, № 3. – C. 758–765.
35. *Radušienė J., Judžentienė A., Pečiulytė D., Janulis V.* Essential oil composition and antimicrobial assay of *Acorus calamus* leaves from different wild populations // *Plant Genetic Resources*. – 2007. – T. 5, № 1. – C. 37–44.
36. *Redfern J., Kinninmonth M., Burdass D., Verran J.* Using Soxhlet ethanol extraction to produce and test plant material (essential oils) for their antimicrobial properties // *Journal of microbiology & biology education*. – 2014. – T. 15, № 1. – C. 45–46.
37. *Rastgou M., Rezaee Danesh Y., Ercisli S., Sayyed R.Z., El Enshasy H.A., Dailin D.J., Alfarraj S., Ansari M.J.* The Effect of Some Wild Grown Plant Extracts and Essential Oils on *Pectobacterium betavascularum*: The Causative Agent of Bacterial Soft Rot and Vascular Wilt of Sugar Beet // *Plants*. – 2022. – T. 11, № 9. – C. 1155.
38. *Ravari S.B., Moslemkhani K., Khodaygan P.* Assessment of genetic variability of prevalent pectinolytic bacteria causing potato tuber soft rot in eastern Iran // *Journal of Plant Pathology*. – 2013. – C. 107–113.
39. *Salamci E., Kordali S., Kotan R., Cakir A., Kaya Y.* Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum* // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2007. – T. 35, № 9. – C. 569–581.
40. *Salamon I., Kryvtsova M., Bucko D., Tarawneh A.H.* Chemical characterization and antimicrobial activity of some essential oils after their industrial large-scale distillation // *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. – 2021. – T. 2021. – C. 984–988.
41. *Sameza M.L., Nguemnang Mabou L.C., Tchameni S.N., Boat Bedine M.A., Tchoumboungang F., Jazet Dongmo P.M., Boyom Fekam F.* Evaluation of clove essential oil as a mycobiocide against *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium solani*, tuber rot causing fungi in yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) // *Journal of Phytopathology*. – 2016. – T. 164, № 7–8. – C. 433–440.

42. Silva F., Ferreira S., Queiroz J.A., Domingues F.C. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry // Journal of medical microbiology. – 2011. – T. 60. – № 10. – C. 1479–1486.
43. Soltan H.R., Ahmed S.M., Emam D.A. Comparative antibacterial activity of garlic essential oil extracted by hydro-distillation and diethyl ether extraction methods on four pathogenic bacteria // Adv Plants Agric Res. – 2016. – T. 4, № 2. – C. 261–264.
44. Sookto T., Srithavaj T., Thaweboon S., Thaweboon B., Shrestha B. In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans* / Asian Pacific journal of tropical biomedicine. – 2013. – T. 3, № 5. – C. 376–380.
45. Vasilchenko A.S., Poshvina D.V., Sidorov R.Y., Iashnikov A.V., Rogozhin E.A. & Vasilchenko A.V. Oak bark (*Quercus* sp. cortex) protects plants through the inhibition of quorum sensing mediated virulence of *Pectobacterium carotovorum* // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2022. – T. 38, № 11. – C. 1–12.
46. Vieira V., Pereira C., Abreu R.M., Calhella R.C., Alves M.J., Coutinho J.A., Ferreira O., Barros L., Ferreira I.C. Hydroethanolic extract of *Juglans regia* L. green husks: A source of bioactive phytochemicals // Food and Chemical Toxicology. – 2020. – T. 137. – C. 111189.
47. Xiao Nan Y., Sun Chul K. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oil from Korean Citrus unshiu peel // Journal of Agricultural chemistry and Environment. – 2013. – T. 2013.
48. Zaouali Y., Bouzaine T., Boussaid M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities // Food and Chemical Toxicology. – 2010. – T. 48, № 11. – C. 3144–3152.

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF ESSENTIAL OILS AND PLANT EXTRACTS AGAINST POTATO BLACKLEG PATHOGENS

A.A. DATSYUK, R.I. TARAKANOV

(Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy)

*The antibacterial activity of 25 samples of essential oils and seven aqueous samples and ethanolic plant extracts was evaluated against the complex of potato blackleg pathogens *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium odoriferum*, *Dickeya didantii* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. To identify the described species, studies of pathogens were carried out in vitro with a skin diffusion test on agar, requiring minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal concentrations (MBC) of essential oils and plant extracts. Based on the results of screening for studies in the field of health, in vivo conditions, the essential oils of the common oregano, Chinese cinnamon, clove, as well as ethanol extracts of thick-leaved badan and common oak bark were selected. In the course of further testing, the ability of essential oils and extracts to prevent potato tuber maceration when used for prophylactic and therapeutic purposes was evaluated. With therapeutic use of the above essential oils at a concentration of 40 mg/ml or more and plant extracts at a concentration of 150 mg/ml or more, the biological effectiveness was 12.4–48.7%, and with prophylactic use – 35.3–100%. GC–MS and GC–FID analyzes showed that the main component of oregano essential oil was carvacrol (62.32%), Chinese cinnamon – cinnamaldehyde (84.25%), clove – eugenol (76.98%). Acetic (27.85%) and caproic (28.52%) acids predominated in the compositions of the extracts of thick-leaved badan and common oak, respectively.*

Key words: blackleg of potato, soft-rot bacterial pathogens, plant protection, antimicrobial activity, essential oils, plant extracts, *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium odoriferum*, *Dickeya dadantii*

References

1. Kha V.T.N., Dzhililov F.S.U. Antibakterial'naya aktivnost' efirnykh masel i ikh ispol'zovanie dlya obezzarazhivaniya semyan kapusty ot sosudistogo bakterioza [Antibacterial activity of essential oils and their use for disinfection of cabbage seeds from vascular bacteriosis]. *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii*. 2014; 6: 59–68. (In Rus.)
2. Alam A., Rehman N.U., Ansari M.N., Palla A.H. Effects of essential oils of *Elettaria cardamomum* grown in India and Guatemala on gram-negative bacteria and gastrointestinal disorders. *Molecules*. 2021; 26 (9): 2546.
3. Alkan D., Yemenicioğlu A. Potential application of natural phenolic antimicrobials and edible film technology against bacterial plant pathogens. *Food Hydrocolloids*. 2016; 55: 1–10.
4. Ambrico A., Trupo M., Magarelli R., Balducchi R., Ferraro A., Hristoforou E. Effectiveness of *Dunaliella salina* extracts against *Bacillus subtilis* and bacterial plant pathogens. *Pathogens*. 2020; 9 (8): 613.
5. Amri I., Gargouri S., Hamrouni L., Hanana M., Fezzani T., Jamoussi B. Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *Journal of pest science*. 2012; 85 (2): 199–207.
6. Baghaee-Ravari S.B., Moslemkhani K., Khodaygan P. Assessment of genetic variability of prevalent pectinolytic bacteria causing potato tuber soft rot in eastern Iran. *Journal of Plant Pathology*. 2013: 107–113.
7. Baharum S.N., Bunawan H., Ghani M.A.A., Mustapha W.A.W., Noor N.M. Analysis of the chemical composition of the essential oil of *Polygonum minus* Huds. using two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF MS). *Molecules*. 2010; 15 (10): 7006–7015.
8. Behidj-Benyounes N., Letifi S., Slamani L., Itouchene D., Dahmane T. Study of antibacterial activity of a range of plant extracts against the causative agent of potato blackleg disease (pectobacterium). *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*. 2017; 17: 999–1006.
9. Bhardwaj S.K., Laura J.S. Potential use of some plant-extracts against *Fusarium moniliforme*. *ORYZA-An International Journal on Rice*. 2008; 45 (1): 48–52.
10. Bhat K.A., Viswanath H.S., Bhat N.A., Wani T.A. Bioactivity of various ethanolic plant extracts against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot of potato tubers. *Indian Phytopathology*. 2017; 70 (4): 463–470.
11. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard, 10th ed.; CLSI document M07-A10; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2015.
12. Dhaliwal H.J.S., Thind T.S., Chander M. Relative activity of essential oils from plants against *Penicillium digitatum* causing post-harvest fruit rot of Kinnow mandarin. *Plant Dis. Res.* 2004; 19: 140–143.
13. El Gendy A.N., Leonardi M., Mugnaini L., Bertelloni F., Ebani V.V., Nardoni S., Manciantic F., Hendawya S. Omer E., Pistelli L. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Origanum syriacum* plants grown in Sinai, Egypt. *Industrial Crops and Products*. 2015; 67: 201–207.
14. Fisher K., Phillips C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of applied microbiology*. 2006; 101 (6): 1232–1240.

15. *Gebarowska E., Politowicz J., Szumny A.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Geranium robertianum* L. essential oil. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2017; 74 (2): 699–705.
16. *Gerayeli N., Baghaee-Ravari S., Tarighi S.* Evaluation of the antagonistic potential of *Bacillus* strains against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and their role in the induction of resistance to potato soft rot infection. *European Journal of Plant Pathology*. 2018; 150 (4): 1049–1063.
17. *Hajian-Maleki H., Baghaee-Ravari S., Moghaddam M.* Herbal essential oils exert a preservative effect against the potato soft rot disease. *Scientia Horticulturae*. 2021; 285: 110192.
18. *Harborne J.B.* Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman & Hall Pub. London, UK., 1998.
19. *Huang D.F., Xu J.G., Liu J.X., Zhang H., Hu Q.P.* Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria. *Microbiology*. 2014; 83 (4): 357–365.
20. *Ikeura H., Kobayashi F.* Antimicrobial and antifungal activity of volatile extracts of 10 herb species against *Glomerella cingulata*. *International Journal of Biology*. 2015; 7 (9): 77.
21. *Inglis D., Schroeder B.K., Johnson D.A.* Bacterial Soft Rot and Lenticel Spot on Potato Tubers. Washington State University Extension, 2011.
22. *Javed B., Nadhman A.* Optimization, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles against plant bacterial pathogens phyto-synthesized by *Mentha longifolia*. *Materials Research Express*. 2020; 7 (8): 085406.
23. *Jianu C., Pop G., Gruia A., Horhat F.G.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula x intermedia*) grown in Western Romania. *International journal of agriculture and biology*. 2013; 15 (4).
24. *Joshi J.R., Burdman S., Lipsky A., Yedidia I.* Effects of plant antimicrobial phenolic compounds on virulence of the genus *Pectobacterium*. *Research in microbiology*. 2015; 166 (6): 535–545.
25. *Kalleli F., Ghassen A.B.I.D., Salem I.B., Boughalleb-M'Hamdi N., M'Hamdi M.* Essential oil from fennel seeds (*Foeniculum vulgare*) reduces *Fusarium* wilt of tomato (*Solanum lycopersicon*). *Phytopathologia Mediterranea*. 2020; 59 (1): 63–76.
26. *Khosravipour S., Rezaeian-Doloei R.* Antibacterial activity of *Carum copticum* essential oil against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. 2015.
27. *Kotan R., Cakir A., Ozer H., Kordali S., Cakmakci R., Dadasoglu F., Kazaz C., Dikbas N., Aydin T.* Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria. *Scientia Horticulturae*. 2014; 172: 210–220.
28. *Kraśniewska K., Gniewosz M., Synowiec A., Przybył J.L., Bączek K., Węglarz Z.* The application of pullulan coating enriched with extracts from *Bergenia crassifolia* to control the growth of food microorganisms and improve the quality of peppers and apples. *Food and bioproducts processing*. 2015; 94: 422–433.
29. *Lapwood D.H., Read P.J., Spokes J.* Methods for assessing the susceptibility of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* and *carotovora*. *Plant Pathology*. 1984; 33 (1): 13–20.
30. *Lemes R., Alves C.C., Estevam E.B., Santiago M.B., Martins C.H., Santos T.C.D., Crotti A.E.M., Miranda M.L.* Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2018; 90: 1285–1292.

31. Nahar L., El-Seedi H.R., Khalifa S.A., Mohammadhosseini M., Sarker S.D. Ruta essential oils: Composition and bioactivities. *Molecules*. 2021; 26 (16): 4766.
32. Nissen L., Zatta A., Stefanini I., Grandi S., Sgorbati B., Biavati B., Monti A. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*. 2010; 81 (5): 413–419.
33. Nouri M., Baghaee-Ravari S., Emadzadeh B. Nano-emulsified savory and thyme formulation show limited efficacy to suppress *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* compared with pure oil. *Industrial Crops and Products*. 2021; 161: 113216.
34. Oliva M.D.L.M., Carezzano M.E., Giuliano M., Daghero J., Zygadlo J., Bogino P., Giordano W., Demo M. Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. *Plant Biology*. 2015; 17 (3): 758–765.
35. Radušienė J., Judžentienė A., Pečiulytė D., Janulis V. Essential oil composition and antimicrobial assay of *Acorus calamus* leaves from different wild populations. *Plant Genetic Resources*. 2007; 5 (1): 37–44.
36. Redfern J., Kinninmonth M., Burdass D., Verran J. Using soxhlet ethanol extraction to produce and test plant material (essential oils) for their antimicrobial properties. *Journal of microbiology & biology education*. 2014; 15 (1): 45–46.
37. Rastgou M., Rezaee Danesh Y., Ercisli S., Sayyed R.Z., El Enshasy H.A., Dailin D.J., Alfarraj S., Ansari M.J. The Effect of Some Wild Grown Plant Extracts and Essential Oils on *Pectobacterium betavascularum*: The Causative Agent of Bacterial Soft Rot and Vascular Wilt of Sugar Beet. *Plants*. 2022; 11 (9): 1155.
38. Ravari S.B., Moslemkhani K., Khodaygan P. Assessment of genetic variability of prevalent pectinolytic bacteria causing potato tuber soft rot in eastern Iran. *Journal of Plant Pathology*. 2013: 107–113.
39. Salamci E., Kordali S., Kotan R., Cakir A., Kaya Y. Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2007; 35 (9): 569–581.
40. Salamon I., Kryvtsova M., Bucko D., Tarawneh A.H. Chemical characterization and antimicrobial activity of some essential oils after their industrial large-scale distillation. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 2021; 2021: 984–988.
41. Sameza M.L., Nguemnang Mabou L.C., Tchameni S.N., Boat Bedine M.A., Tchoumboungang F., Jazet Dongmo P.M., Boyom Fekam F. Evaluation of clove essential oil as a mycobiocide against *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium solani*, tuber rot causing fungi in yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Journal of Phytopathology*. 2016; 164 (7–8): 433–440.
42. Soltan H.R., Ahmed S.M., Emam D.A. Comparative antibacterial activity of garlic essential oil extracted by hydro-distillation and diethyl ether extraction methods on four pathogenic bacteria. *Adv Plants Agric Res*. 2016; 4 (2): 261–264.
43. Sookto T., Srithavaj T., Thaweboon S., Thaweboon B., Shrestha B. In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2013; 3 (5): 376–380.
44. Vasilchenko A.S., Poshvina D.V., Sidorov R.Y., Iashnikov A.V., Rogozhin E.A., Vasilchenko A.V. Oak bark (*Quercus* sp. cortex) protects plants through the inhibition of quorum sensing mediated virulence of *Pectobacterium carotovorum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022; 38 (11): 1–12.
45. Vieira V., Pereira C., Abreu R.M., Calhelha R.C., Alves M.J., Coutinho J.A., Ferreira O., Barros L., Ferreira I.C. Hydroethanolic extract of *Juglans regia* L. green husks: A source of bioactive phytochemicals. *Food and Chemical Toxicology*. 2020; 137: 111189.

46. *Xiao Nan Y., Sun Chul K.* Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oil from Korean Citrus unshiu peel. *Journal of Agricultural chemistry and Environment.* 2013; 2013.

47. *Zaouali Y., Bouzaine T., Boussaid M.* Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology.* 2010; 48 (11): 3144–3152.

Дацик Анна Андреевна, аспирант кафедры защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (916) 509–37–73; e-mail: annadacyk@rgau-msha.ru

Тараканов Рашит Ислямович, аспирант, ассистент кафедры защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (977) 403–54–40; e-mail: tarakanov.rashit@mail.ru

Anna A. Datsyuk, post-graduate student of the Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (916) 509–37–73; E-mail: annadacyk@rgau-msha.ru)

Rashit I. Tarakanov, post-graduate student, Assistant Professor of the Plant Protection Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (977) 403–54–40; E-mail: tarakanov.rashit@mail.ru)