

УДК 630\*81:632.4

## ДИАГНОСТИКА РАННИХ ИЗМЕНЕНИЙ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДРЕВЕСИНЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГРИБНЫХ ИНФЕКЦИЙ

© С.Р. Лоскутов\*, О.А. Шапченкова, Е.А. Петрунина, М.А. Пляшечник, Е.А. Тютюкова, Н.В. Пашенова, И.Д. Гродницкая, А.А. Анискина, В.А. Сенашова

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН – обособленное подразделение  
ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, 50/28, Красноярск, 660036 (Россия),  
e-mail: lsr@ksc.krasn.ru

Исследована здоровая и поврежденная древесина *Pinus sylvestris* L. на ранней стадии развития грибной инфекции с помощью методов сканирующей электронной микроскопии, термогравиметрии и пиролитической хромато-масс-спектрометрии. С помощью сканирующей электронной микроскопии в поврежденной древесине выявлено присутствие гиф грибов в полостях трахеид, проникающих через поры. Деградации клеточной стенки не отмечено. Из анализа термогравиметрических данных по четвертой производной скорости потери массы и энергии активации в рамках изоконверсионной модели Озавы-Флинна-Уолла здоровой и поврежденной древесины установлены количественные показатели воздействия грибной инфекции на древесину. Результаты пиролитической хромато-масс-спектрометрии показали, что отношение суммы продуктов пиролиза лигнина к сумме продуктов пиролиза углеводного комплекса в здоровой и поврежденной древесине близки. Это указывает на отсутствие выраженной деградации полисахаридов или лигнина на ранней стадии поражения древесины грибами *Leptographium* и *Trichoderma*. Однако уменьшение относительного содержания некоторых индивидуальных соединений в составе продуктов флэш-пиролиза, а также изменение профиля потери массы и снижение энергии активации термического разложения поврежденной древесины свидетельствуют о начавшейся трансформации углеводного комплекса, преимущественно гемицеллюлоз. Предложенный подход к диагностике повреждения древесины грибами является высокоэффективным, экспрессным и не требует сложной пробоподготовки.

*Ключевые слова:* древесина *Pinus sylvestris* L., поражение грибами, физико-химические свойства.

### Введение

Диагностика ранних стадий микробных повреждений древесины лесных насаждений с помощью современных (прецизионных и экспрессных) инструментов является актуальной как в экологическом аспекте – мониторинг состояния лесных экосистем, так и в аспекте направлений рационального лесопользования.

Общепризнанным фактом является ведущая роль грибов в разрушении древесины, и первые этапы колонизации этого субстрата осуществляются преимущественно базидиальными, сумчатыми и несовершенными грибами. Базидиальные грибы-кислототрофы, обладающие мощным комплексом экзоферментов, которые активно воздействуют на компоненты древесины (целлюлозу, гемицеллюлозы, пектин и лигнин), являются доминирующими агентами микогенного ксилотолиза в лесных экосистемах [1–3]. Сумчатые и несовершенные грибы также способны утилизировать полимерные углеводы древесины (целлюлозу, гемицеллюлозы) [4]. У некоторых грибов, вызывающих мягкую (умеренную или плесневую) гниль, обнаружены отдельные ферменты, вовлеченные в разложение лигнина [4–6].

Начальные стадии микогенного ксилотолиза протекают как в живых деревьях при их поражении фито-

*Лоскутов Сергей Реджинальдович* – доктор химических наук, академик ИАВС, e-mail: lsr@ksc.krasn.ru

*Шапченкова Ольга Александровна* – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: sholga@ksc.krasn.ru

*Петрунина Елена Александровна* – инженер, e-mail: petrunina@ksc.krasn.ru

патогенами, так и в поваленной древесине (свежий бурелом, порубочные остатки) при их колонизации сапротрофными организмами. В обоих случаях агентами-деструкторами, как правило, являются базидиомицеты. Но ксилофильные аско- и дейтеромицеты иногда могут выступать инициаторами

Окончание на С. 62.

\* Автор, с которым следует вести переписку.

грибных сукцессий на свежем буреломе и порубочных остатках, в местах, где нарушена целостность коры. Кроме того, сумчатые и несовершенные деревоокрашивающие грибы, связанные с физиологически опасными видами насекомых – ксилофагов, развиваются в тканях ствола и корней живых деревьев, которые заселяются их переносчиками. Таким образом, пионерные грибные сообщества на свежей древесине, наряду с базидиомицетами, представлены деревоокрашивающими (в том числе офиостомовыми) грибами, сапротрофами подстилки и почвы, эпифитами коры растения-хозяина. Считается, что в непродолжительный период ранней колонизации свежей древесины идет потребление запасных веществ и цитоплазматического содержимого клеток осевой паренхимы и паренхимы сердцевинных лучей, а деструкция собственно лигно-целлюлозного комплекса древесины почти не происходит [3, 4]. Из-за этого исследователи уделяют мало внимания участию ксилофильных грибов – небазидиомицетов в процессах микогенного ксилолиза в лесах. Хотя показано, что деятельность этих агентов в эксплуатируемых под открытым небом древесных конструкциях (мягкая плесневая гниль) может привести к заметной деградации древесины.

Разработка ранней диагностики древесных гнилей корней и стволов важна для эффективного фитопатологического мониторинга, изучения экологических процессов в лесных экосистемах (средообразование, иммобилизация углерода и минеральных элементов и т.п.) [1]. Кроме того, ранняя диагностика поражения древесины ксилотрофными небазидиальными грибами является актуальной для оценки ее дальнейшего использования, так как колонизация древесины представителями мягкой гнили (микробиоцетами и бактериями) ведет к снижению ее долговечности и срока службы в изделиях.

В исследованиях мягкой гнили уже используют разные методы, позволяющие качественно оценить изменения массы, плотности, прочности и химического состава разлагаемой древесины [7]. Однако среди задач текущего этапа обозначена важность разработки прецизионных, экспрессных и высокоинформативных методов выявления и количественной оценки степени повреждения. Анализ литературы показывает, что использование для этой цели одного или двух методов – термогравиметрии (ТГ/ДТГ) [8–10], сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) [11] и пиролизической хромато-масс-спектрометрии [12, 13] – дает ограниченные сведения, обусловленные спецификой каждого метода. В связи с этим возникает потребность в комплексной диагностике (оценке) изменений физико-химических свойств древесины на ранней стадии развития грибного (бактериального) поражения, поиске «физико-химических маркеров» его действия.

Цель исследования – поиск индикаторных показателей изменений в древесине на ранней стадии развития грибной инфекции на основе применения комплекса физико-химических методов анализа, а также определение перспектив их дальнейшего широкого использования в исследованиях воздействия возбудителей болезней древесных растений.

### Экспериментальная часть

Образцы древесины были заготовлены во время проведения санитарных рубок в насаждениях сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), приуроченных к Опытному хозяйству «Погорельский бор» ИЛ СО РАН (зона лесостепи Красноярского края, насаждения II–III классов возраста). Образцы были выпилены из нижней части ствола с толстой корой сразу после валки деревьев. Осмотр анализируемых спилов выявил многочисленные следы деятельности стволовых вредителей (предположительно, кормовые площадки потомства усача и гнезда шестизубчатого короеда), затрагивающие внутренние слои коры и прилегающий к ней

---

Пляшечник Мария Анатольевна – научный сотрудник,  
e-mail: lilwood@ksc.krasn.ru

Тотькова Екатерина Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник,  
e-mail: katewood@inbox.ru

Пашенова Наталья Вениаминовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,  
e-mail: pasnat@ksc.krasn.ru

Гродницкая Ирина Дмитриевна – доктор химических наук, главный научный сотрудник,  
e-mail: igrod@ksc.krasn.ru

Анискина Антонина Александровна – научный сотрудник, e-mail: aniskina\_a@ksc.krasn.ru

Сенашова Вера Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,  
e-mail: vera0612@mail.ru

тонкий (несколько мм) слой древесины. От поврежденных насекомыми тканей к центру ствола развивалась темно-серая окраска, которая продвинулась вглубь ствола на 4–6 см в радиальном направлении и характерная для порока синевы древесины. На начальном этапе исследований были сформированы две группы образцов – здоровой (ЗД) и поврежденной древесины (ПД) для выполнения всех анализов.

Для микробиологического анализа небольшие образцы (8–15 × 20–30 × 5–7 мм) выкалывали из участков неокрашенного спила (контроль) и

участков окрашенной заболони/древесины другого спиля. Всего было подготовлено по 15 образцов здоровой (контроль, ЗД) и окрашенной (опыт, ПД) древесины. После поверхностного обжига в пламени образцы были стерильно разложены на плотную питательную среду: агаризованное пивное сусло (содержание сахаров 2 °Б) с добавлением молочной кислоты (4 мл/л среды). Чашки Петри помещали в термостат при 24 °С на 21 сутки, в течение которых наблюдали развитие грибного мицелия вокруг древесины. Идентификацию грибов на уровне рода выполняли на основе культуральных и микроморфологических признаков [14].

Оценку влияния микроскопических грибов на физико-химические свойства древесины проводили с помощью методов сканирующей электронной микроскопии, термогравиметрии и пиролизической хромато-масс-спектрометрии. Для физико-химических анализов спиля толщиной 2–3 см подсушивали до влажности около 10–12%. С помощью мелкозубчатой пилки заготавливали образцы (фракция опилок 0.1–0.3 мм) окрашенной (ПД) и здоровой (ЗД) древесины, кондиционировали их в гигростатах с влажностью воздуха 55% до равновесного водосодержания в течение двух недель при температуре 20.0±1.5 °С.

Для исследования структуры и степени повреждения древесины использовали часть заболони (брусочки размером 2×2×1 см). Образцы выдерживали в течение часа в дистиллированной воде для получения необходимой твердости. Изготовление срезов толщиной 50–60 мкм проводили на санном электронном микротоме MSE. Полученные срезы помещали на двухсторонний проводящий углеродный скотч, высушивали в сушильном шкафу с вентиляцией при температуре 60 °С в течение 1.5 ч. Затем переносили образец на «столик» электронного сканирующего микроскопа ТМ-1000 («Hitachi», Япония). Используемое увеличение – от ×50 до ×4000.

Термогравиметрия образцов проведена с помощью прибора TG 209 F1 («NETZSCH», Германия). Образцы древесины проанализированы в атмосфере воздуха при следующих условиях: скорость нагрева 10, 20 и 40 °С·мин<sup>-1</sup> от 25 до 700 °С, скорость потоков защитного и продувочного газов 20 мл·мин<sup>-1</sup>; масса образца 5.59–5.72 мг, тигель корундовый цилиндрической формы. Обработка результатов измерений осуществлялась с помощью пакета программ «NETZSCH Proteus Thermal Analysis 4.8.4». Погрешность определения потери массы углеводного комплекса и лигнина составила 1.47 и 3.27% соответственно для доверительной вероятности 0.95 и трех повторностей измерения.

Анализ кинетики термического разложения древесины осуществлен с помощью уравнения Озавы-Флинна-Уолла [15–18]:

$$\ln(\beta) \cong \ln\left(\frac{AE_a}{RF(\alpha)}\right) - 5.3305 - 1.052 \frac{E_a}{RT}$$

Здесь степень превращения

$$\alpha = \frac{m_0 - m}{m_0 - m_f}$$

где  $m_0$  – начальная масса образца в термогравиметрическом опыте,  $m$  – текущее значение массы при температуре  $T$ ,  $m_f$  – масса образца после завершения процесса термодеструкции;  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $\beta$  – скорость нагрева,  $A$  – константа, функция  $F(\alpha)$  – математическое представление кинетической модели.

В основе использования метода ОФУ лежит предположение о том, что скорость реакции при постоянном значении  $\alpha$  зависит только от температуры. Энергия активации термического разложения исследуемого образца  $E_a$  определяется величиной угла наклона прямой, построенной в координатах  $\ln\beta - 1/T$ . При этом не требуется знание механизма (порядка) реакции.

Пиролитическую хромато-масс-спектрометрию (Пи-ГХ/МС) качественного определения компонентного состава продуктов пиролиза древесины проводили с помощью аналитической системы EGA/PY-3030D/GCMS-QP2020 («Shimadzu», Япония). Использовали капиллярную колонку «Ultra ALLOY-5» длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм, толщина слоя жидкой фазы (5% дифенил, 95% диметилполисилоксан) – 0.25 мкм. Температура пиролиза – 600 °С, масса образцов ~70–95 мкг. Условия хроматографирования: газ-носитель – гелий с постоянным потоком 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>; сплит-впрыск 1 : 50; температура инжектора – 250 °С. Температурная программа: начальный изотермический участок – 50 °С (5 мин), подъем температуры от 50

до 240 °С со скоростью 4 °С·мин<sup>-1</sup>, подъем температуры до 300 °С со скоростью 10 °С·мин<sup>-1</sup>, время выдержки при 300 °С – 5 мин. Температура ионного источника – 250 °С; температура интерфейса – 300 °С; диапазон сканирования – от 40 до 550 m/z. Идентификацию компонентов проводили методом сравнения, по наличию и соотношению характеристичных ионов-фрагментов с использованием базы данных стандартных образцов из масс-спектральной библиотеки «NIST» (2017 г.) и сравнением с литературными данными.

### Обсуждение результатов

**Микологический анализ и микроскопия.** Микологический анализ образцов ЗД показал, что на контрольных образцах и вокруг них грибной мицелий не развивался. На спилах ПД от поврежденной коры к центру ствола в древесине развилась окраска, характерная для присутствия синевы древесины. Окраска продвинулась вглубь ствола на 4–6 см в радиальном направлении.

Образцы участков ПД с явными локальными признаками грибной инфекции в течение первых 7–10 дней инкубирования покрылись мицелием, который продолжил развитие по поверхности питательной среды. Полученные колонии не демонстрировали большого разнообразия грибов и по культурально-морфологическим признакам соответствовали представителям родов *Leptographium* Lager. et Mellin и *Trichoderma* Pers. Только в двух образцах был отмечен светло-серый мицелий, у которого не обнаружили конидиогенных структур и иных микроморфологических особенностей. Частота встречаемости грибов в разных зонах окрашенной древесины показала, что жизнеспособный мицелий грибов рода *Leptographium* преимущественно изолировали из древесины, расположенной у границы продвижения окраски вглубь ствола. Мицелий грибов рода *Trichoderma* обнаруживали в основном в зоне, расположенной у края спила вблизи коры. Мицелиев с характерными признаками дереворазрушающих базидиальных грибов (пряжки и т.п.) микологический анализ не выявил во всех образцах.

Исследование окрашенной древесины с помощью сканирующей электронной микроскопии показало присутствие грибов в полостях трахеид ПД. На рисунке 1 видно, что, хотя гифы проникли в трахеиды через поры, деградации клеточной стенки еще не отмечено.

**Термогравиметрия.** Для выделения количества индивидуальных «фракций» продуктов термодеструкции древесины в условиях линейного нагрева в термогравиметрическом опыте проведено дифференцирование контура скорости потери массы по температуре:  $\partial^4(\text{ДТГ})/\partial t^4=f(t)$  (рис. 2) [19].

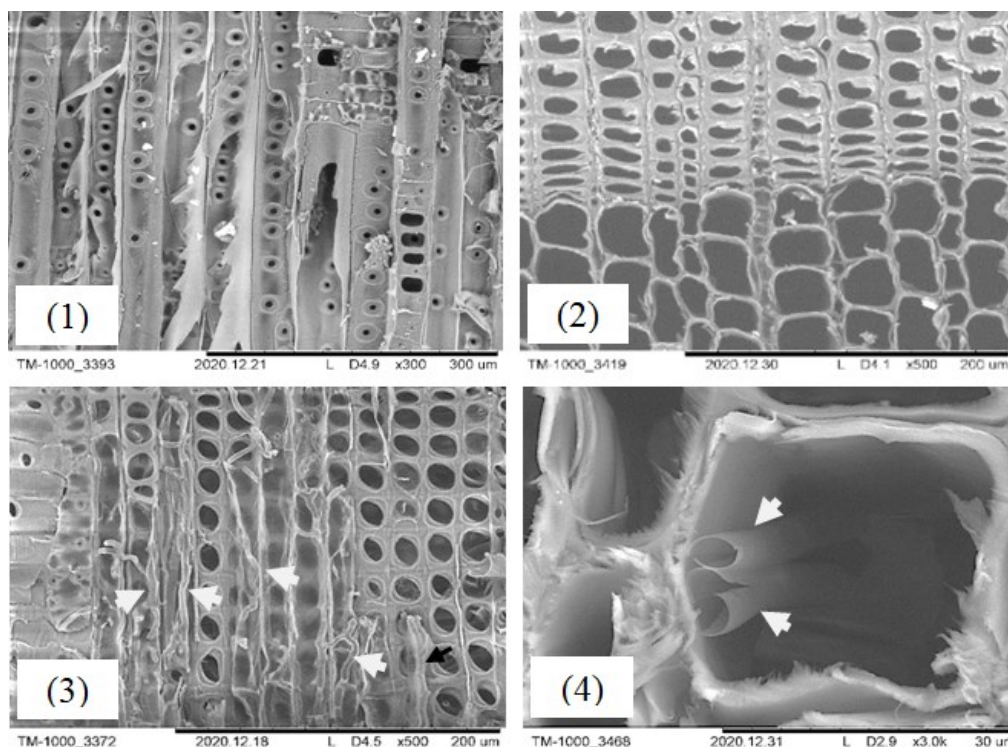


Рис. 1. СЭМ-изображения заболонной древесины сосны: 1, 2 – без признаков развития микроскопических грибов; 3, 4 – инфицированная грибами (стрелками указаны гифы грибов)

Это позволяет установить температурные интервалы и положение максимумов «полос», отвечающих индивидуальным «фракциям» продуктов термодеструкции. Используя зависимости  $f(t)_{ЗД,ПД} = \partial^4(\text{ДТГ})/\partial t^4$  и экспериментальные ТГ-кривые здоровой и поврежденной древесины, рассчитали соответствующие профили потери массы углеводного комплекса и лигнина (рис. 3).

На рисунке 2 видно, что «спектр» потери массы  $f(t)_{ЗД} = \partial^4(\text{ДТГ})/\partial t^4$  здоровой древесины существенно отличается от  $f(t)_{ПД}$  в температурных диапазонах испарения влаги (рис. 2(1)), преимущественного термического разложения гемицеллюлоз (рис. 2(2)) и термодеструкции лигнина (рис. 2(4)). Профили потери массы образцами ЗД и ПД неодинаковы по числу идентифицируемых температурных интервалов и величине потери массы в них (рис. 3). Так, отмечается большая «фракционность» термического разложения углеводного комплекса ПД, чем ЗД, по числу выделяемых температурных интервалов – 12 и 9 соответственно. Отношение потери массы гемицеллюлоз в температурном интервале 148–293 °С к потере массы лигнина (при 416–515 °С) для ПД уменьшилось на 13.3% по сравнению с этим показателем для ЗД (рис. 3). Наиболее вероятным объяснением установленного факта является биодеструкция полисахаридов (за исключением целлюлозы) ПД в результате гемицеллюлазной активности грибов.

Отметим также, что анализ термогравиметрических данных по предлагаемой схеме позволяет зафиксировать различие хода термического разложения лигнина, свидетельствуя о его неодинаковом физическом состоянии в здоровой и поврежденной древесине (рис. 3). Из приведенных выше данных по термодеструкции экспериментальных образцов четко видно, что целлюлоза не подвергалась заметному воздействию обнаруженной грибной инфекции (рис. 3): зависимости  $f(t)_{ЗД}$  и  $f(t)_{ПД}$ , совпадают на соответствующих температурных интервалах (рис. 2(3)).

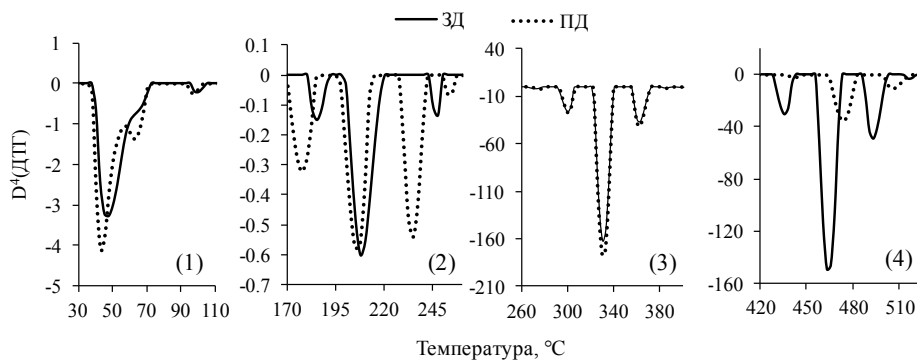


Рис. 2. Четвертая производная  $\partial^4(\text{ДТГ})/\partial t^4 = f(t)$ ,  $t$  – температура, °С: 1 – испарение влаги, 2 – преимущественное термическое разложение гемицеллюлоз, 3 – преимущественная термодеструкция целлюлозы, 4 – термическое разложение лигнина и окисление образовавшегося угля

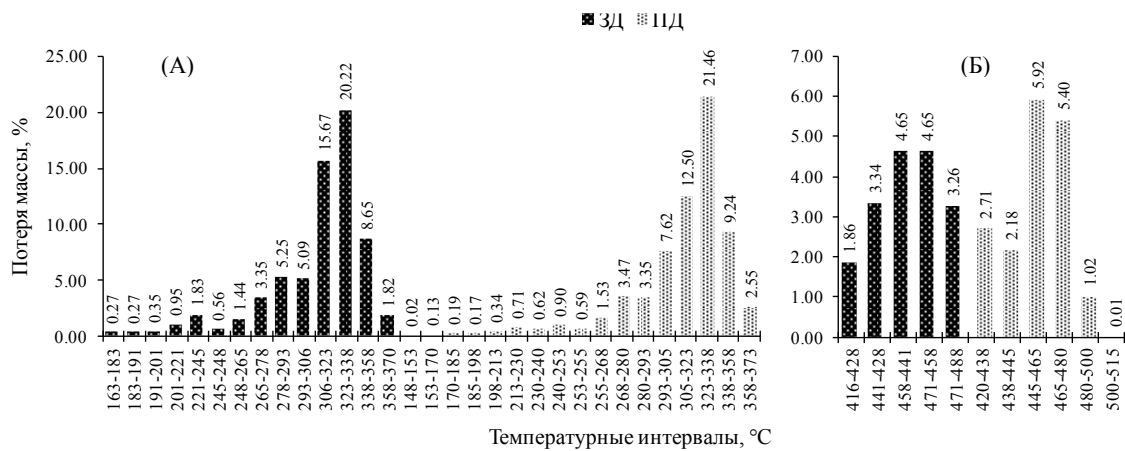


Рис. 3. Профили потери массы углеводного комплекса (А) и лигнина (Б) образцами древесины здоровой (ЗД) и поврежденной древесины (ПД) при нагреве со скоростью 10 °С·мин<sup>-1</sup> в атмосфере воздуха (обозначения те же, что на рисунке 1)

Результаты расчета функций  $E_a=v(\alpha)$  (рис. 4) согласуются с рассчитанными зависимостями  $\partial^4(\text{ДТГ})/\partial t^4=f(t)_{\text{зд.пд.}}$ . При преимущественном термическом разложении гемицеллюлоз ( $0.1 \leq \alpha \leq 0.3$ ) наблюдается существенное уменьшение  $E_a$  для поврежденной древесины, что может быть обусловлено фрагментацией полисахаридов грибными гемицеллюлазами, а при  $\alpha > 0.6$  уменьшение  $E_a$  связано, по-видимому, с изменением молекулярного окружения за счет биодеструкции гемицеллюлоз, либо с частичной фрагментацией полимерной сетки лигнина. В интервале степени конверсии целлюлозы ( $0.3 \leq \alpha \leq 0.6$ ) наблюдаются близкие средние величины энергии активации: ЗД –  $186.5 \pm 18.9$  кДж/моль, (10.1%); ПД –  $177.1 \pm 22.5$  кДж/моль, (12.7%), ( $p=0.95$ ) (рис. 4). Это указывает на отсутствие изменений в структуре целлюлозы на данной стадии развития грибной инфекции.

*Пиролитическая хромато-масс-спектрометрия* показала, что площадь пиков идентифицированных соединений составила 83% для здоровой древесины и 87% для поврежденной от суммарной площади всех зарегистрированных пиков. Большинство идентифицированных соединений являются продуктами пиролиза углеводного комплекса и лигнина. Перечень соединений и их относительное содержание приведены в таблице.

Продукты пиролиза здоровой и поврежденной древесины характеризуются схожим компонентным составом. Наибольшая доля приходится на соединения, образующиеся в результате термодеструкции углеводного комплекса, среди которых преобладают: уксусная кислота, ацетальдегид, метилглиоксаль, ацетол. Преобладающие продукты пиролиза лигнина – цис- и транс-конифероловый спирт, транс-изоэвгенол, 4-винилгваякол, 4-метилгваякол, гваякол являются характерными для древесины хвойных пород. В заметных количествах обнаружены: ванилин, эвгенол и дигидроконифероловый спирт.

Микологический анализ показал, что грибы родов *Leptographium* и *Trichoderma* являлись безусловными доминантами в зоне окрашенной древесины. Представители первого рода известны как возбудители синевы древесины, связанные со стволовыми вредителями [20], грибы рода *Trichoderma* широко распространены в природе и являются типичными представителями грибных сообществ почвы, в том числе в лесных экосистемах [21, 22].

Полученные данные указывают на то, что грибы *Trichoderma* spp. продвигались от коры к центру ствола вслед за грибами рода *Leptographium*, постепенно замещая последних. Это означает, что исследуемые нами образцы демонстрируют ранний этап колонизации древесины сосны, вызванный заселением еще живого дерева стволовыми вредителями. Смену группировок грибов, колонизирующих заболонь в этот период, показал *Solheim* Н. [23] на примере древесины ели европейской, повреждаемой короедом типографом. Согласно его наблюдениям, через 1–2 месяца после нападения короеда-переносчика на смену офиостомовым грибам, продвинувшимся в древесину из ходов переносчика, приходят сумчатые, несовершенные и даже базидиальные грибы. При этом автор упоминает вид *Trichoderma viride* Pers. ex S.F. Gray aggr. Ssensu Rifai в качестве одного из типичных видов – «заместителей» и приводит данные других исследователей, свидетельствующие о том, что появление *Trichoderma* spp. часто наблюдали после атаки деревьев короедами [23].

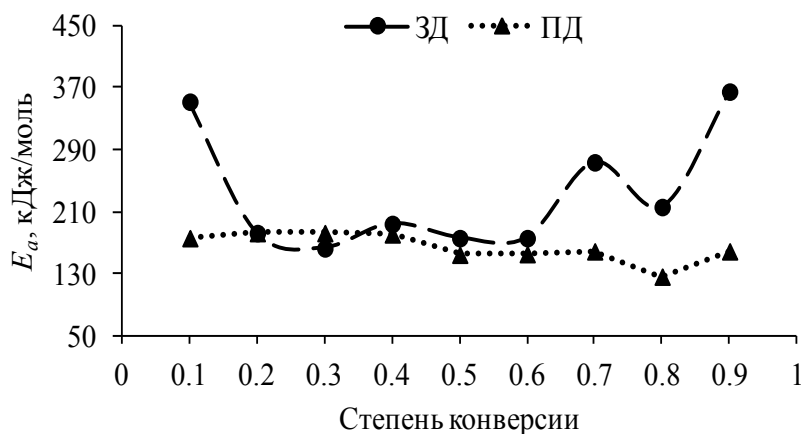


Рис. 4. Зависимость  $E_a$  от степени конверсии древесинного вещества: здоровой (ЗД) и поврежденной (ПД) древесины

Продукты пиролиза древесины *Pinus sylvestris* L.

Название	Время удерживания, мин		Происхождение	Относительное содержание, %	
	ЗД	ПД		ЗД	ПД
Диоксид углерода	1.52	1.52		9.92	4.38
Диоксид углерода	–	1.54		–	5.03
Ацетальдегид	1.60	1.60	УК	2.54	1.26
Ацетальдегид	–	1.61	УК	–	1.87
Метилглиоксаль	1.73	1.73	УК	5.61	5.66
Уксусная кислота	2.02	2.03	УК	3.52	4.40
2-Бутеналь	2.41	–		0.31	–
2,5-Дигидрофуран	2.43	2.44	УК	0.47	0.74
1-Гидрокси-2-пропанон (ацетол)	2.49	2.51	УК	3.32	3.46
1,4-диоксин, 2,3-дигидро	2.95	2.97		0.34	0.38
Ацетоксиуксусная кислота	3.96	3.98	УК	3.08	3.52
2(5Н)-Фуранон	4.10	4.12	УК	0.21	0.22
Сукциндиальдегид	4.21	4.20	УК	0.43	0.40
Пропановая кислота, 2-оксо-, метиловый эфир	4.40	4.43	УК	2.26	2.20
Гексаналь	4.71	4.74		0.47	0.49
Фурфурол	5.77	5.80	УК	0.94	0.94
3-Метилгексаналь	9.15	9.19		3.60	4.95
1,2-Циклопентандион	9.37	9.40	УК	1.60	1.42
2,2-Диэтил-3-метил-1,3-оксазолидин	12.48	12.51	УК	1.16	0.90
2-гидрокси-3-метил-2-циклопентен-1-он	13.83	13.85	УК	0.40	0.26
2-Метилфенол	15.07	15.11	Л	0.21	0.22
3-Метилфенол	15.98	16.01	Л	0.27	0.37
2-Метоксифенол (Гваякол)	16.38	16.41	Л	1.57	1.67
Пентаналь	16.49	16.52		0.33	0.15
Нонаналь	–	17.09		–	0.22
Терпинен-4-ол	–	20.02		–	0.40
4-Метил-2-оксопентаненитрил	20.17	20.20		2.14	2.14
Креозол	20.55	20.58	Л	2.12	1.94
1,4:3,6-Диангидро-альфа/D-глюкопираноза	21.10	–	УК	0.27	–
4-Этилгваякол	23.81	23.84	Л	0.51	0.54
Карвакрол	24.33	24.36		0.45	0.38
4-Винилгваякол	25.06	25.10	Л	3.04	3.27
Эвгенол	26.62	26.65	Л	0.78	0.76
Ванилин	28.01	28.05	Л	1.54	2.65
Цис-изоэвгенол	28.35	28.38	Л	0.37	0.27
Транс-изоэвгенол	29.73	29.76	Л	2.03	2.28
Левоглюкозан	30.92	30.95	УК	12.46	11.19
Дигидрокониферол	35.90	35.93	Л	0.92	1.05
Цис-кониферилловый спирт	36.57	36.60	Л	1.15	1.29
Кониферилловый альдегид	38.29	38.39	Л	0.70	0.85
Транс-кониферилловый спирт	38.48	38.43	Л	11.51	12.47
(Е)-3,3'-диметокси-4,4'-дигидроксистильбен	57.88	57.90		0.67	0.88
Сумма продуктов пиролиза УК				38.27	38.44
Сумма продуктов пиролиза Л				26.72	29.63
Л/УК				0.70	0.77

Примечание. Л – лигнин, УК – углеводный комплекс (холоцеллюлоза).

Несмотря на отмеченное при сканирующей микроскопии присутствие грибов в сосудах ксилемы, заметной деградацией клеточных стенок колонизируемой древесины не обнаружено. В этой связи следует учитывать, что грибы рода *Leptographium* являются типичными деревоокрашивающими офиостомовыми грибами, которые, как известно, продвигаясь вглубь ствола, используют для питания содержащее живых клеток и экстрактивные вещества. Показано, что они в состоянии изредка проделывать очень тонкие отверстия в клеточных стенках, но это практически не сказывается на механических и физико-химических характеристиках древесины [4]. Наблюдаемые нами грибы *Trichoderma* spp., напротив, относятся к роду, где представлены активные деструкторы целлюлозы и гемицеллюлоз [21, 22]. Поэтому их иногда относят к типич-

ным представителям мягкой плесневой гнили или, по мнению некоторых авторов, к группе плесневых грибов (mold fungi) [4]. Кроме того, для некоторых представителей рода *Trichoderma* обнаружена лакказная активность [24], что указывает на их способность воздействовать на лигнин. Однако в исследуемой древесине мицелии *Trichoderma* spp. только начали свое развитие и замещение деревоокрашивающих грибов, не успев вызвать визуальных признаков воздействия на древесину.

Некоторые деструктивные изменения древесинного вещества выявлены с помощью методов термогравиметрии и пиролизической хромато-масс-спектрометрии. Использование Пи-ГХ/МС было предложено в последние десятилетия для характеристики биодеградации древесинного вещества, подверженного действию грибных (бактериальных) инфекций [12, 13, 25, 26]. Отношение суммы продуктов пиролиза лигнина к сумме продуктов пиролиза углеводного комплекса (Л/УК) древесины часто используют для оценки деградации компонентов древесины в результате микробиологической деятельности. По результатам Пи-ГХ/МС, отношение Л/УК в образце ПД заметно не изменилось (табл.), что в целом указывает на отсутствие выраженной деградации полисахаридов или лигнина на данной стадии поражения древесины грибами *Leptographium* и *Trichoderma*. Однако между образцами ЗД и ПД выявлены значительные различия по относительному содержанию ряда индивидуальных соединений, что может свидетельствовать о начавшейся трансформации древесинного вещества на ранней стадии поражения грибами. Так, среди продуктов пиролиза углеводного комплекса образца ПД не обнаружена 1,4:3,6-диангидро-альфа/D-глюкопираноза и ниже относительное содержание 2,2-диэтил-3-метил-1,3-оксазолидина и левоглюкозана, а также характерных для пиролиза гемицеллюлоз соединений: 2-гидрокси-3-метил-2-циклопентен-1-она и 1,2-циклопентанедиона [27]. Это указывает на трансформацию углеводного комплекса, преимущественно гемицеллюлоз, под действием грибов. Отмечено также значительное увеличение доли ванилина в продуктах пиролиза лигнина, что указывает на его окисление [28].

Значительное увеличение доли уксусной кислоты и 2,5-дигидрофурана среди продуктов пиролиза ПД, вероятно, обусловлено термодеструкцией биомассы грибов. Согласно данным [29, 30], продуктами пиролиза биомассы грибов являются вещества, характерные для пиролиза полисахаридов и протеинов.

Продукты пиролиза ПД в отличие от ЗД характеризовались значительным увеличением доли 3-метилгексаналя, снижением доли пентаналя и присутствием альдегида (ноналя) и терпеноида (4-терпинеола). Терпены и альдегиды относятся к летучим органическим соединениям, образующимся в древесине растущего дерева, и могут обладать токсическими свойствами по отношению к грибным (бактериальным) инфекциям [31–33]. Вероятно, образование 4-терпинеола и ноналя является проявлением защитной реакции сосны при поражении офиостомовыми грибами.

Резюмируя, отметим, что снижение в пиролизате ПД относительного содержания соединений, характерных для пиролиза полисахаридов, образование ноналя и терпинен-4-ола, а также повышенное содержание 3-метилгексаналя и ванилина, можно считать свидетельством начальной стадии ферментации древесинного вещества грибами. Сведения о ферментативной активности позволяют предположить, что изменения гемицеллюлоз, отмеченные при термическом анализе и Пи-ГХ/МС, вызваны преимущественно обнаруженными в окрашенной древесине представителями рода *Trichoderma*, и эти же грибы, скорее всего, оказали «модифицирующее» действие на лигнин. Отсутствие значительных изменений целлюлозы, так же, как отсутствие заметных признаков деструкции на внутренней поверхности трахеид по результатам СЭМ, объясняется, по-видимому, кратким периодом воздействия грибов *Trichoderma* sp. на древесину, колонизируемую ими вслед за офиостомовыми грибами.

## **Выводы**

1. Выполненные исследования показали, что использование комплекса прецизионных физико-химических методов анализа позволяет выявлять минимальные изменения в строении древесины на самых ранних стадиях микогенного ксилолиза.

2. Одновременное использование методов сканирующей электронной микроскопии, термогравиметрии и пиролизической хромато-масс-спектрометрии в исследовании биодеструкции древесины на ранних стадиях ее поражения базидиальными грибами или возбудителями мягкой плесневой гнили является эффективным и экспрессным инструментом многосторонней оценки состояния древесинного вещества деревьев в лесных экосистемах.



3. Получаемая информация о локализации и степени освоения ксилемы грибами, об изменении соотношения масс углеводной и ароматической компонент древесины, об особенностях кинетики и термодинамики его термического разложения (ТГ/ДТГ), характеризующих степень повреждения полимерного комплекса древесины, является актуальной для принятия своевременных решений по фитосанитарным и лесохозяйственным мероприятиям для недопущения широкой деградации лесных экосистем, а также для определения наиболее приемлемого направления индустриального использования заготавливаемой древесины.

### Список литературы

1. Мухин В.А. Биота ксилотрофных базидиомицетов Западно-Сибирской равнины. Екатеринбург, 1993. 231 с.
2. Schwarze F.W.M.R., Engels J., Mattheck C. Fungal strategies of wood decay in trees. New York, 2000. 185 p. DOI: 10.1007/978-3-642-57302-6.
3. Shortle W.C., Dudzik K.R. Wood decay in living and dead trees: A pictorial overview. Newton Square PA, 2012. 28 p.
4. Daniel G. Fungal degradation of wood cell walls. Secondary xylem biology: Origins, Functions, and Applications. Elsevier Inc., 2016. Pp. 131–167.
5. Madadi M., Abbas A. Lignin degradation by fungal pretreatment: A review // J. Plant. Pathol. Microbiol. 2017. Vol. 8. N2. Pp. 1–6. DOI: 10.4172/2157-7471.1000398.
6. Kantharaj P., Boobalan B., Sooriamuthu S., Mani R. Lignocellulose degrading enzymes from fungi and their industrial applications // Int. J. Cur. Res. Rev. 2017. Vol. 9. Pp. 1–12. DOI: 10.7324/ijcrr.2017.9211.
7. Råberg U., Edlund M.-L., Terziev N., Land C.J. Testing and evaluation of natural durability of wood in above ground conditions in Europe – an overview // J. Wood Sci. 2005. Vol. 51. Pp. 429–440.
8. Reh U., Kraepelin G., Lamprecht I. Use of differential scanning calorimetry for structural analysis of fungally degraded wood // Appl. Environ. Microbiol. 1986. Vol. 52. N5. Pp. 1101–1106.
9. Genestar C., Pons C. Analytical characterization of biodegraded wood from a 15th century Spanish cloister // Microchimica Acta. 2008. Vol. 162. Pp. 333–339.
10. Popescu C.-M., Lisa G., Manoliu A., Petronela G., Vasile C. Thermogravimetric analysis of fungus-degraded lime wood // Carbohydr. Polym. 2010. Vol. 80. Pp. 78–83. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.10.058.
11. Popescu C.-M., Tibirna C.M., Manoliu A., Petronela G., Vasile C. Microscopic study of lime wood decayed by *Chaetomium globosum* // Cellulose Chem. Technol. 2011. Vol. 45. N9. Pp. 565–569.
12. Vane C.H. The molecular composition of lignin in spruce decayed by white-rot fungi (*Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*) using pyrolysis-GC-MS and thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2003. Vol. 51. Pp. 67–75. DOI: 10.1016/S0964-8305(02)00089-6.
13. Karami L., Schmidt O., Fromm J., Klinberg A., Schmitt U. Wood decay characterization of a naturally-infected oak wood bridge using Py-GC/MS // Wood research. 2013. Vol. 58. N4. Pp. 591–598.
14. Barnett H.L., Hunter B.B. Illustrated genera of imperfect fungi: 4<sup>th</sup> edition. St. Paul, 1999. 218 p.
15. Ozawa T. A new method of analyzing thermogravimetric data // Chem. Soc. Jpn. 1965. Vol. 38. N11. Pp. 1881–1886.
16. Mamleev V., Bourbigot S., Le Bras M., Lefebvre J. Three model-free methods for calculation of activation energy in TG // J. Therm. Anal. Calorim. 2004. Vol. 78. Pp. 1009–1027.
17. Baroni É.G., Tannous K., Rueda-Ordóñez Y.J., Tinoco K. The applicability of isoconversional models in estimating the kinetic parameters of biomass pyrolysis // J. Therm. Anal. Calorim. 2016. Vol. 123. N2. Pp. 909–917. DOI: 10.1007/s10973-015-4707-9.
18. Petrunina E.A., Shapchenkova O.A., Loskutov S.R. Physico-chemical parameters of Siberian larch (*larix sibirica* L.) bark extracted with water-amino-alcoholic extractants // Химия растительного сырья. 2021. №2. С. 103–107. DOI: 10.14258/jcprm.2021028340.
19. Петрунина Е.А., Лоскутов С.Р. Термический анализ модифицированной коры лиственницы после ее применения для извлечения катионов меди из водных растворов // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. Барнаул, 2020. С. 13–15.
20. Jacobs K., Wingfield M.J. Leptographium Species: tree pathogens, insect associates and agents of blue-stain. St. Paul, 2001. 207 p.
21. Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. Казань, 2006. 209 с.
22. Громовых Т.И., Садыкова В.С., Алимова Ф.К. Микромицеты рода *Trichoderma* Pers. М., 2014. 189 с.
23. Solheim H. Fungal succession in sapwood of Norway spruce infested by the bark beetle *Ips typographus* // Eur. J. For. Pathol. 1992. Vol. 22. Pp. 136–148.
24. Perinbam K., Bharath B., Seeni S., Ravikumar M. Lignocellulose degrading enzymes from fungi and their industrial applications // Int. J. Cur. Res. Rev. 2017. Vol. 9. N21. Pp. 1–12. DOI: 10.7324/ijcrr.2017.9211.
25. Río J.C., Gutiérrez A., Martínez M.J., Martínez A.T. Py-GC/MS study of *Eucalyptus globulus* wood treated with different fungi // J. Anal. Appl. Pyrolysis. 2001. Vol. 58–59. Pp. 441–452.
26. Vinciguerra V., Napoli A., Bistoni A., Petrucci G., Sgherzi R. Wood decay characterization of a naturally infected London plane-tree in urban environment using Py-GC/MS // J. Anal. Appl. Pyrolysis. 2007. Vol. 78. Pp. 228–231. DOI: 10.1016/J.JAAP.2006.06.003.
27. González Martínez M., Ohra-aho T., da Silva Perez D., Tamminen T., Dupont C. Influence of step duration in fractionated Py-GC/MS of lignocellulosic biomass // J. Anal. Appl. Pyrolysis. 2019. Vol. 137. Pp. 195–202.

28. Tamburini D., Łucejko J.J., Ribechini E., Colombini M.P. New markers of natural and anthropogenic chemical alteration of archaeological lignin revealed by in situ pyrolysis/silylation-gas chromatography-mass spectrometry // *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 2016. Vol. 118. Pp. 249–258. DOI: 10.1016/j.jaap.2016.02.008.
29. Gutiérrez A., Martínez M.J., Almendros G., González-Vila F.J., Martínez A.T. Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration // *Science of the Total Environment*. 1995. Vol. 167. Pp. 315–328. DOI: 10.1016/0048-9697(95)04592-0.
30. Rouches E., Dignac M.-F., Zhou S., Carrère H. Pyrolysis-GC-MS to assess the fungal pretreatment efficiency for wheat straw anaerobic digestion // *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 2017. Vol. 123. Pp. 409–418. DOI: 10.1016/j.jaap.2016.10.012.
31. Kačík F., Vělková V., Šmíra P., Nasswetrová A., Kačíková D., Reinprecht L. Release of terpenes from fir wood during its long-term use and in thermal treatment // *Molecules*. 2012. Vol. 17. Pp. 9990–9999. DOI: 10.3390/molecules17089990.
32. Zhang J., Sun H., Chen S., Zeng L., Wang T. Anti-fungal activity, mechanism studies on  $\alpha$ -Phellandrene and Nonanal against *Penicillium cyclopium* // *Bot. Stud.* 2017. Vol. 58. Pp. 1–9. DOI: 10.1186/s40529-017-0168-8.
33. Pohleven J., Burnard M.D., Kutnar A. Volatile organic compounds emitted from untreated and thermally modified wood – a review // *Wood and Fiber Science*. 2019. Vol. 51. N3. Pp. 231–254. DOI: 10.22382/wfs-2019-023.

*Поступила в редакцию 2 июля 2021 г.*

*После переработки 9 сентября 2021 г.*

*Принята к публикации 1 февраля 2022 г.*

**Для цитирования:** Лоскутов С.Р., Шапченкова О.А., Петрунина Е.А., Пляшечник М.А., Тютюкова Е.А., Пашенова Н.В., Гродницкая И.Д., Анискина А.А., Сенашова В.А. Диагностика ранних изменений физико-химических свойств древесины под действием грибных инфекций // *Химия растительного сырья*. 2022. №2. С. 61–72. DOI: 10.14258/jcrpm.2022029801.

Loskutov S.R.\*, Shapchenkova O.A., Petrunina E.A., Plyashechnik M.A., Tyutkova E.A., Pashenova N.V., Grodnitskaya B.D., Aniskina A.A., Senashova V.A. DIAGNOSTICS OF EARLY CHANGES IN THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF WOOD UNDER THE INFLUENCE OF FUNGAL INFECTIONS

V.N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 (Russia), e-mail: lsr@ksc.krasn.ru

The sound wood and damaged wood of *Pinus sylvestris* L. at an early stage of the development of a fungal infection were studied using scanning electron microscopy, thermogravimetry and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. Scanning electron microscopy showed the presence of fungal hyphae in tracheids of damaged wood. The hyphae penetrated into the tracheids through the pores. The cell wall degradation was not found. Quantitative indicators of the impact of fungal infection on wood were established from the analysis of thermogravimetric data on the fourth derivative of the rate of mass loss and activation energy in the framework of the Ozawa-Flynn-Wall isoconversion model of sound and damaged wood. The results of pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry revealed that lignin/carbohydrate ratio in damaged wood did not change markedly. It indicates the absence of pronounced degradation of polysaccharides or lignin at this stage of wood damage by *Leptographium* and *Trichoderma* fungi. However, a decrease in relative contents of some individual compounds in composition of flash pyrolysis products as well as the mass loss profile and the reduced activation energy of the thermal decomposition of damaged wood point to the beginning of carbohydrate complex transformation, mainly hemicelluloses. The proposed approach to the diagnosis of wood damage by fungi is highly effective, rapid and does not require complex sample preparation.

**Keywords:** wood, *Pinus sylvestris* L., fungal infection, physico-chemical properties.

**Referenses**

1. Mukhin V.A. *Biota ksilotrofnyykh bazidiomitsetov Zapadno-Sibirskoy ravniny*. [Biota of xylotrophic basidiomycetes of the West Siberian Plain]. Yekaterinburg, 1993, 231 p. (in Russ.).
2. Schwarze F.W.M.R., Engels J., Mattheck C. *Fungal strategies of wood decay in trees*. New York, 2000, 185 p. DOI: 10.1007/978-3-642-57302-6.
3. Shortle W.C., Dudzik K.R. *Wood decay in living and dead trees: A pictorial overview*. Newton Square PA, 2012, 28 p.
4. Daniel G. *Fungal degradation of wood cell walls. Secondary xylem biology: Origins, Functions, and Applications*. Elsevier Inc., 2016, pp. 131–167.
5. Madadi M., Abbas A. *J. Plant. Pathol. Microbiol.*, 2017, vol. 8, no. 2, pp. 1–6. DOI: 10.4172/2157-7471.1000398.
6. Kantharaj P., Boobalan B., Sooriamuthu S., Mani R. *Int. J. Cur. Res. Rev.*, 2017, vol. 9, pp. 1–12. DOI: 10.7324/ijcrr.2017.9211.
7. Råberg U., Edlund M.-L., Terziev N., Land C.J. *J. Wood Sci.*, 2005, vol. 51, pp. 429–440.
8. Reh U., Kraepelin G., Lamprecht I. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, vol. 52, no. 5, pp. 1101–1106.
9. Genestar C., Pons C. *Microchimica Acta*, 2008, vol. 162, pp. 333–339.
10. Popescu C.-M., Lisa G., Manoliu A., Petronela G., Vasile C. *Carbohydr. Polym.*, 2010, vol. 80, pp. 78–83. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.10.058.
11. Popescu C.-M., Tibirna C.M., Manoliu A., Petronela G., Vasile C. *Cellulose Chem. Technol.*, 2011, vol. 45, no. 9, pp. 565–569.
12. Vane C.H. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2003, vol. 51, pp. 67–75. DOI: 10.1016/S0964-8305(02)00089-6.
13. Karami L., Schmidt O., Fromm J., Klinberg A., Schmitt U. *Wood research*, 2013, vol. 58, no. 4, pp. 591–598.
14. Barnett H.L., Hunter B.B. *Illustrated genera of imperfect fungi: 4<sup>th</sup> edition*. St. Paul, 1999, 218 p.
15. Ozawa T. *Chem. Soc. Jpn.*, 1965, vol. 38, no. 11, pp. 1881–1886.
16. Mamleev V., Bourbigot S., Le Bras M., Lefebvre J. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2004, vol. 78, pp. 1009–1027.
17. Baroni É.G., Tannous K., Rueda-Ordóñez Y.J., Tinoco K. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2016, vol. 123, no. 2, pp. 909–917. DOI: 10.1007/s10973-015-4707-9.
18. Petrunina E.A., Shapchenkova O.A., Loskutov S.R. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2021, no. 2, pp. 103–107. DOI: 10.14258/jcprm.2021028340.
19. Petrunina Ye.A., Loskutov S.R. *Novyye dostizheniya v khimii i khimicheskoy tekhnologii rastitel'nogo syr'ya*. [New achievements in chemistry and chemical technology of plant raw materials]. Barnaul, 2020, pp. 13–15. (in Russ.).
20. Jacobs K., Wingfield M.J. *Leptographium Species: tree pathogens, insect associates and agents of blue-stain*. St. Paul, 2001, 207 p.
21. Alimova F.K. *Promyshlennoye primeneniye gribov roda Trichoderma*. [Industrial use of fungi of the genus Trichoderma]. Kazan', 2006, 209 p. (in Russ.).
22. Gromovykh T.I., Sadykova V.S., Alimova F.K. *Mikromitsety roda Trichoderma Pers.* [Micromycetes of the genus Trichoderma Pers]. Moscow, 2014, 189 p. (in Russ.).
23. Solheim H. *Eur. J. For. Pathol.*, 1992, vol. 22, pp. 136–148.
24. Perinbam K., Bharath B., Seeni S., Ravikumar M. *Int. J. Cur. Res. Rev.*, 2017, vol. 9, no. 21, pp. 1–12. DOI: 10.7324/ijcrr.2017.9211.
25. Río J.C., Gutiérrez A., Martínez M.J., Martínez A.T. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 2001, vol. 58–59, pp. 441–452.
26. Vinciguerra V., Napoli A., Bistoni A., Petrucci G., Sgherzi R. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 2007, vol. 78, pp. 228–231. DOI: 10.1016/J.JAAP.2006.06.003.

\* Corresponding author.

27. González Martínez M., Ohra-aho T., da Silva Perez D., Tamminen T., Dupont C. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 2019, vol. 137, pp. 195–202.
28. Tamburini D., Lucejko J.J., Ribechini E., Colombini M.P. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 2016, vol. 118, pp. 249–258. DOI: 10.1016/j.jaap.2016.02.008.
29. Gutiérrez A., Martínez M.J., Almendros G., González-Vila F.J., Martínez A.T. *Science of the Total Environment*, 1995, vol. 167, pp. 315–328. DOI: 10.1016/0048-9697(95)04592-O.
30. Rouches E., Dignac M.-F., Zhou S., Carrère H. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 2017, vol. 123, pp. 409–418. DOI: 10.1016/j.jaap.2016.10.012.
31. Kačík F., Veřková V., Šmíra P., Nasswetrová A., Kačíková D., Reinprecht L. *Molecules*, 2012, vol. 17, pp. 9990–9999. DOI: 10.3390/molecules17089990.
32. Zhang J., Sun H., Chen S., Zeng L., Wang T. *Bot. Stud.*, 2017, vol. 58, pp. 1–9. DOI: 10.1186/s40529-017-0168-8.
33. Pohleven J., Burnard M.D., Kutnar A. *Wood and Fiber Science*, 2019, vol. 51, no. 3, pp. 231–254. DOI: 10.22382/wfs-2019-023.

*Received July 2, 2021*

*Revised September 9, 2021*

*Accepted February 1, 2022*

**For citing:** Loskutov S.R., Shapchenkova O.A., Petrunina E.A., Plyashechnik M.A., Tyutkova E.A., Pashenova N.V., Grodnitskaya B.D., Aniskina A.A., Senashova V.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2022, no. 2, pp. 61–72. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2022029801.