

ОСОБЕННОСТИ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ТЕЛ, ЭКСТРАКТА И КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЫ ГРИБА *ST. HIRSUTUM*

О.Н. Жук, Д.А. Грушевская

Полесский государственный университет, Пинск

Поиск новых источников биологически активных соединений является важной задачей современной биотехнологии. Одним из перспективных направлений в решении данной задачи рассматриваются грибы базидиомицеты (отдел *Basidiomycota*) [1], использование определенных видов которых в качестве лекарственных, тонизирующих или наркотических средств известно с античных времен. Для массового получения препаратов или очищенных биологически активных веществ из грибов может применяться как сбор плодовых тел в природе, так и биотехнологические приемы культивирования. Сбор плодовых тел в природе лимитируется несколькими факторами: непродолжительный период развития, редкая встречаемость или малочисленность гриба в природе и возможный урон, который может быть нанесен экосистеме процедурой изъятия плодовых тел [2]. С этой точки зрения биотехнологическое производство удобно благодаря круглогодичности и берегающим отношением к окружающей среде. Базидиальные грибы-ксилотрофы легко культивируются глубинным способом. Информация о том, насколько химический состав плодовых тел из природы совпадает с таковым мицелия, полученного в биореакторе слишком раздроблена и требует дополнительного исследования по каждому конкретному виду грибов [3].

Перспективным объектом биотехнологии рассматривается гриб *Stereum hirsutum*. Это обычный обитатель древесины ослабленных деревьев и разрушитель свежего валежа лиственных пород. В плодовых телах *St. hirsutum* найдены антиоксидантные, антимикробные и антираковые соединения. Несмотря на то, что в благоприятных условиях плодовые тела *St. hirsutum* могут развиваться сотнями на одной единице субстрата, например, стволе дерева, его урожайность в природе невысока из-за чрезвычайно малых размеров плодовых тел. Культивирование этого гриба в глубинной культуре позволит получать его биомассу круглогодично в объемах, обуславливаемых объемом реактора. В случае обнаружения способности данного гриба в условиях глубинной культуры синтезировать вещества, обладающие биологической активностью сопоставимой с таковой у природного гриба, появится блестящая перспектива получать синтезируемые им субстанции в промышленных объемах [4].

Цель работы – раскрыть особенности антимикробной активности природных тел, экстракта и культуральной жидкости, полученных в глубинной культуре гриба *St. hirsutum* и провести их сравнительную характеристику.

Материалы и методы. Плодовые тела и заселенная мицелием *St. hirsutum* древесина были собраны в широколиственно-сосновом лесу в Пинском районе в сентябре 2018 г.

Для получения поверхностной чистой культуры гриба *St. hirsutum*, плодовые тела природного происхождения были очищены от древесины и других посторонних объектов, измельчены и под высоким напором проточной воды промыты. Измельченные фрагменты плодовых тел помещали в центр чашки Петри на агаризованную картофельно-сахарозную среду, культивировали при температуре 24-25 °С в течение 5 суток. За это время развивался мицелий, в виде ковра покрывавший поверхность среды.

Глубинная культура гриба была получена путем засева ковра маточного мицелия площадью 1,0 см² из поверхностной культуры в колбы объемом 500 мл, содержащие 250 мл жидкой картофельно-сахарозной среды. Культивировали 21 день при температуре 24-25°С и постоянном перемешивании на качалке (режим работы 70 об./мин). Исследуемые образцы отбирали на 7, 14 и 21 сутки и готовили к анализу на антимикробную активность. Тело природного гриба и мицелий, полученный при глубинном культивировании, гомогенизировали в 0,85% NaCl в соотношении масса: изотонический раствор хлористого натрия – 1:10, оставляли на 12-14 часов при температуре 3-4 °С, центрифугировали (3,5 тыс. об./мин), супернатант использовали для исследований. Культуральную жидкость использовали без разведения.

Чувствительность микроорганизмов к метаболитам *St. hirsutum*, экстрагированным из тел, мицелия, а также секреторируемых в культуральную жидкость данного гриба определяли диско-диффузионным методом (ДДМ). Для этого стерильную фильтровальную бумагу (диски диаметром 6 мм) пропитали исследуемыми образцами. В качестве тест-систем использовали чистые культуры *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* и *Enterococcus faecalis*, предоставленные ГУ «Пинский зональный центр гигиены и эпидемиологии». Контролем определения чувствительности микроорганизмов к метаболитам *St. hirsutum* служили индикаторные стандартизированные качественные коммерческие диски (НИЦФ, Санкт-Петербург), пропитанные антибиотиками – левомицетин 30 мкг, рифампицин 5 мкг, бензилпенициллин 10 ЕД, офлоксацин 5 мкг.

При определении чувствительности ДДМ использовали инокулюмы исследуемых микроорганизмов в концентрации примерно $5,5 \times 10^9$ КОЕ/мл, что соответствует стандартному образцу мутности бактериальных взвесей БАК-5 (Россия). Инокулюм использовали в течение 15 мин после приготовления. В чашки Петри со средой внесли пипет-дозатором по 1 мл тестируемой культуры, распределили по всей поверхности агара стерильным шпателем и поместили диски с антибиотиками или с метаболитами *St. hirsutum*. На одну чашку диаметром 100 мм помещали по 4 диска. Чашки Петри помещали в термостат кверху дном и инкубировали при температуре 35 °С в течение 18-24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). После окончания инкубации их помещали на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45° (учет в отраженном свете). Диаметр зон задержки роста измеряли с точностью до 1 мм, ориентируясь на зону полного подавления видимого роста. Зону роста определяли по методологии EUCAST, версия 5, 2017 года [5].

Полученные данные анализировали с использованием общепринятых методов вариационной статистики и компьютерных программ Statistica 6.0. Статистическая значимость полученных результатов была оценена при помощи критерия Манна–Уитни для непараметрических выборок. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение. Выращивание *St. hirsutum in vitro* позволило в короткие сроки значительно нарастить биомассу мицелия. Из эксплантатов ковра поверхностной культуры *St. hirsutum* размером 1 см² в течение недели сырая масса мицелия достигала $4,7 \pm 0,2$ грамм. На 21 сут сырая масса составила $13,4 \pm 0,15$ грамм, выход сухой биомассы – $0,7 \pm 0,1$ грамм.

Антимикробная активность плодовых тел гриба *St. hirsutum* была изучена на природном штамме (рис. 1).



Рисунок 1. – Внешний вид плодоношений *Stereum hirsutum* из природы

При определении чувствительности диско-диффузионным методом, нами было установлено, что в чашке Петри, в которой не вносились ни антибиотики, ни метаболиты *St. hirsutum*, культуры микроорганизмов развивались равномерно и заселяли всю поверхность агаризованной питательной среды. Экстракт плодового тела *St. hirsutum* показал антимикробную активность ко всем используемым тест-системам (*Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *St. saprophyticus*, *Ent. faecalis*). На рисунке 2 четко прослеживаются зоны задержки роста *E. coli* у дисков, пропитанных экстрактом тел гриба.



Рисунок 2. – Зоны подавления роста *E. coli* метаболитами природного гриба *St. hirsutum*

Была установлена антимикробная активность и для культуральной жидкости и экстракта мицелия, которая была зависимой от времени культивирования (таблица).

Таблица – Сравнительная характеристика зон подавления роста микроорганизмов метаболитами *St. hirsutum*

	Зона подавления роста микроорганизмов (среднее значение), мм			
	Штаммы микроорганизмов			
	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>St. saprophyticus</i>	<i>E. coli</i>
Антибиотики				
А) Офлоксацин	26±0,15	36±0,2	18±0,15	18±0,2
В) Бензилпенициллин	6±0,1	6±0,1	12±0,2	10±0,1
С) Левомецетин	16±0,2	30±0,1	14±0,1	36±0,15
Д) Рифампицин	7±0,15	14±0,15	30±0,25	10±0,1
Экстракт плодовых тел гриба	27±0,15	14,5±0,2	12±0,25	12,5±0,15
Культуральная жидкость гриба:				
А) 7 сутки	7±0,1	7±0,1	14±0,2	9±0,1
В) 14 сутки	8,5±0,2	10,5±0,15	14±0,15	10±0,1
С) 21 сутки	9,2±0,1	11±0,1	15±0,15	12±0,15
Экстракт мицелия гриба:				
А) 7 сутки	7±0,1	9±0,2	13,5±0,2	10,5±0,1
В) 14 сутки	9±0,1	10±0,1	14±0,15	10,5±0,1
С) 21 сутки	9,6±0,2	10,5±0,15	21±0,1	12±0,15

Зона подавления роста при применении экстракта плодовых тел гриба составила 27±0,15 мм в диаметре для *Ps. aeruginosa*. Для *St. saprophyticus*, *E. coli*, *Ent. faecalis* диаметры зон лизиса были в пределах от 12±0,25 до 14,5±0,2 мм, что сравнимо с влиянием стандартных антибиотиков.

Антимикробная активность культуральной жидкости нарастала по мере увеличения сроков культивирования. Так при культивировании в течение 7 дней зона подавления роста составила 7±0,1 мм для *Ps. aeruginosa* и *Ent. faecalis*, для *E. coli* – 9±0,1 мм, что практически равно зоне, формируемой стандартным антибиотиком бензилпенициллином (средняя зона подавления роста 8±0,1 мм). Для *St. saprophyticus* этот показатель составил 14±0,2 мм, что сопоставимо со стандартным антибиотиком левомецетином (зона подавления 14±0,1 мм). На 14 сутки культивирования гриба антимикробная активность культуральной жидкости против *Ps. aeruginosa* сопоставима с таковой стандартного антибиотика рифампицина (7±0,15 мм), против *St. saprophyticus* – 14±0,15 мм, что сравнимо с действием левомецетина (14±0,1 мм), против *E. coli* 10±0,1 мм, что сравнимо с рифампицином (10±0,1 мм), против *Ent. faecalis* – 10,5±0,15 мм, что сравнимо бензилпенициллином – 6±0,1 мм). На 21 день антимикробная активность культуральной жидкости усиливалась. Диаметр зоны подавления роста для *Ps. aeruginosa* составил 9,2±0,1 мм, *Ent. faecalis* – 11±0,1 мм, *E. coli* – 12±0,15 мм, *St. saprophyticus* – 15±0,15 мм.

Экстракты полученного в культуре мицелия гриба *St. hirsutum* так же обладали антимикробной активностью, степень ее выраженности находилась в прямой зависимости от сроков культивирования. Наибольший антимикробный эффект был выявлен против *St. saprophyticus* (21±0,1 мм) на 21 сутки культивирования. Для остальных микроорганизмов диаметр зон подавления составил от 9,6±0,2 до 12±0,15 мм.

Таким образом, наши исследования подтвердили наличие антимикробных свойств, взятых из природы тел гриба *St. hirsutum*, эти свойства сохраняются в культуральной жидкости и мицелии, их антимикробная активность нарастает с увеличением времени культивирования. Применение биотехнологических приемов позволяет нарастить в короткие сроки массу мицелия данного гриба. Требуются дальнейшие исследования в этой области,

в том числе и в направлении возможного выделения из мицелия и культуральной жидкости антибиотических субстанций.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант БРФФИ Б18-111.

Список использованных источников

1. Todd, N.K. Fungal individualism / N.K. Todd, A.D.M. Rayner // ScienceProgress. – 1980. – Vol. 66, No. 263. – P. 331-354.
2. Вассер, С.П. Наука о лекарственных шляпочных грибах: современные перспективы, достижения, доказательства и вызовы / С.П. Вассер // Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера». – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 238-248.
3. Беккер, З.Э. Физиология и биохимия грибов / З.Э. Беккер. – 1988.– Москва: Изд-во Моск. Ун-та. – 230 с.
4. Yurchenko, E.O. An assessment to genetic variation in *Stereum hirsutum* (Basidiomycota) based on RAPD markers / E.O. Yurchenko, M.G. Sinyavskaya // Baltic Forestry. – 2010. – Vol. 16, No. 2.–P. 172-179.
5. Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам [Электронный ресурс] / Руководство по учету результатов. Определение чувствительности к антимикробным препаратам. Диффузионный метод EUCAST. – Москва, 2017. – Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/iacmac/ru/docs/eucast/eucast-disk-diffusion-reading-guide-5.0-rus.pdf>. – Дата доступа: 15.09.2019.