

А.В. Дегтярёва, 3 курс

Научный руководитель – Е.И. Дегтярёва, к.б.н., доцент

Гомельский государственный медицинский университет

Гриб-баран является деликатесным съедобным грибом, имеет приятный запах, ломкую, нежную и вкусную мякоть. *G. frondosa* обладает широким спектром фармакологических эффектов. Установлено, что основными биологически активными компонентами являются β -глюканы. Помимо D-фракции (комплекс β -глюкана с содержанием белка около 30 %) из *G. frondosa* получают множество других биоактивных полисахаридных фракций, таких как MD-фракция, X-фракция, грифолан, MZ-фракция и MT- α -глюкан [1]. Полисахариды *G. frondosa* способны изменять микробиоту кишечника, оказывают влияние на поддержание иммунного гомеостаза, что может быть связано с противоопухолевым действием полисахаридов [2]. В современной медицине антибиотики играют решающую роль в лечении, как легких, так и тяжелых форм бактериальных инфекций. Злоупотребление и неправильное назначение антибиотиков способствовали резкому росту антибиотикорезистентных бактериальных штаммов. Устойчивость к антибиотикам была названа одной из самых насущных проблем общественного здоровья в мире (Get smart: know when antibiotics work, 2014). Бактерии с множественной лекарственной устойчивостью стали глобальной угрозой и высшие базидиомицеты могут стать источниками для получения лекарственных препаратов, обладающих новыми механизмами противомикробного действия в отношении бактерий с множественной антибиотикорезистентностью.

Цель настоящей работы – изучить антимикробные свойства спиртовых экстрактов, полученных из плодовых тел *G. frondosa* (Dicks.) Gray (штаммы 202, 207, 265, 301).

Объектами лабораторных исследований стали штаммы редкого вида ксилотрофных базидиомицетов из коллекции штаммов грибов ГНУ «Институт леса НАН Беларуси» (FIB): *G. frondosa* (Dicks.) Gray (202, 207, 265, 301). Все коллекционные штаммы прошли видовую идентификацию с использованием молекулярно-генетических методов: секвенирования рибосомального оперона ядерной ДНК базидиальных грибов (типировка вида основывается на анализе нуклеотидной структуры ампликонов 18SRNA-ITS1-5,8SRNA-ITS2-28S региона рДНК) в лаборатории геномных исследований и биоинформатики Института леса. Штаммы 202 и 207 получены в 1999 году из

США, штамм 265 – в 2009 году из России, штамм 301 – в 2011 году из грибоводческого хозяйства «Виола» Брестской области. Штамм 202 передан в 2000 году на хранение в Коллекцию шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины (ІВК).

Антибактериальные свойства спиртовых экстрактов из базидиом *G. frondosa* (Dicks.) Gray (штаммов 202, 207, 265, 301) изучены в лабораторных условиях кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии.

Для получения вторичных метаболитов из сухих плодовых тел базидиальных ксилотрофных грибов проводили экстракцию 70% этиловым спиртом. Применяли метод мацерации с продолжительным периодом нагрева экстракционной смеси до температуры +35°C, предотвращающей разрушение энзимов. С целью снижения физико-химического воздействия спирта на тестируемые микроорганизмы в дальнейшем, отфильтрованные экстракты вносили во взвешенные пробирки и помещали в термостат с температурой +35°C до полного выпаривания растворителя. Сухие спиртовые экстракты растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), доводя раствор до 20000 мкг/мл, используя метод пропорции при расчетах. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) экстрактов определяли методом последовательных двукратных микроразведений в стерильных полистироловых круглодонных 96-луночных планшетах с V-образным дном (Starsedt, Германия) в трехкратной повторности.

В исследование включены суточные культуры 6 клинических изолятов, взятых из рабочей коллекции кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет»: *Staphylococcus aureus* (БС-1, БС-9, БС-12, БС-19), *Enterococcus faecalis* 35758 и *Enterococcus faecium* 33 VAN-R, которые были выделены от пациентов с различными гнойно-воспалительными заболеваниями (остеомиелит, пневмония, инфекции мочевыделительной системы, эндокардит, раневые инфекции, сепсис) в лечебных учреждениях Республики Беларусь. Для контроля качества исследований в панель микроорганизмов для тестирования включены эталонные штаммы из Американской коллекции типовых культур (ATCC): *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 51299. Заполненные планшеты закрывали крышкой, и поместив в герметичные пакеты из полиэтилена, с целью предупреждения высыхания, помещали в термостат при температуре +35 °C на 24 часа. По истечении времени инкубации нами были изучены антибактериальные свойства спиртовых экстрактов из плодовых тел *G. frondosa*, используя турбидиметрический метод, учитывая задержку (угнетение) роста популяции тест-культур (по величине мутности среды) с помощью камеры визуального считывания (зеркало + увеличитель) Thermo V4007. Учет проводили только при наличии роста исследуемых микроорганизмов в 12 ряду лунок (при отсутствии в лунках спиртовых экстрактов из плодовых тел *G. frondosa*).

Для изучения бактерицидных свойств спиртовых экстрактов из плодовых тел *G. frondosa* использовали метод тестирования бактерицидности экстрактов МСВТ [3, 4].

В таблице отражены минимальные концентрации грибных спиртовых экстрактов, подавляющие рост тест-микроорганизмов.

Таблица – Минимальные концентрации спиртовых экстрактов из базидиом *G. frondosa*, подавляющие рост тест-микроорганизмов (мкг/мл)

Тест-микро-организмы	Штаммы <i>G. frondosa</i>						
	202 ольха	202 осина	265 ольха	265 осина	301 ольха	301 осина	207 осина
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1250	1250	2500	5000	2500	1250	2500*
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	625*	625	1250	625*	625	625	625
<i>E. faecium</i> 33 VAN-R	1250	2500	2500	1250*	2500	1250	2500*
<i>E. faecalis</i> 35758	312*	625	625	625	625	1250*	625*
<i>S. aureus</i> БС-1	625*	1250	1250	625	1250	1250	2500
<i>S. aureus</i> БС-9	156*	2500	625	156*	625	312*	2500*
<i>S. aureus</i> БС-12	156*	2500	625	312*	625	312*	1250
<i>S. aureus</i> БС-19	2500	2500	625	312*	625	312*	2500*

Примечание: * – данная концентрация грибного экстракта оказывает на тест-микроорганизмы бактериостатическое действие

Результаты, представленные в таблице 1 свидетельствуют о том, что тест-микроорганизмы чувствительны к экстрактам из плодовых тел изучаемых штаммов *G. frondosa* (Dicks.) Gray (202, 207, 265, 301). МПК для ATCC-штаммов стафилококка и энтерококка в зависимости от штамма *G. frondosa* варьируют от 625 до 5000, а для *E. faecium* 33 VAN-R значение МПК варьируют от 1250 до 2500. Надо отметить, что спиртовые экстракты из плодовых тел различных штаммов имеют различную эффективность в отношении клинических изолятов *S. aureus* БС-1, 9, 12, 19. Лучше всего себя показали штаммы 265 и 301. Более эффективными оказались экстракты из базидиом культивированных на осиновых субстратах. Если сравнить бактерицидные свойства спиртовых экстрактов штаммов *G. frondosa*, то штамм 202 лучше всего себя показал в отношении *E. faecalis* 35758, *E. faecalis* ATCC 51299 (МПК-625), при этом необходимо заметить, что экстракты из плодовых тел полученных на субстратных блоках с добавлением ольховых опилок обладали большими антимикробными свойствами. Штамм 265 лучше себя показал в отношении – *E. faecalis* 35758 и клинических изолятов *S. aureus* (МПК-625, МПК-156*), штамм 301 – *E. faecalis* ATCC 51299, *S. aureus* БС-9,12,19 (МПК-625, МПК-312*), штамм 207 – *E. faecalis* ATCC 51299 (МПК-625). Нами выявлена эффективность спиртовых экстрактов штаммов *G. frondosa* в отношении *E. faecium* 33 VAN-R.

Ввиду большой распространенности гнойно-септических инфекций, можно рассматривать базидиальные грибы *G. frondosa* в качестве альтернативного противомикробного препарата для местной терапии стафилококковых и энтерококковых инфекций.

Исследования выявили значительный полиморфизм коллекционных штаммов *G. frondosa* в отношении 6 клинических изолятов *S. aureus* (БС-1, БС-9, БС-12, БС-19), *E. faecalis* 35758, *E. faecium* 33 VAN-R; *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 51299. В отношении грамположительных микроорганизмов были отобраны наиболее перспективные штаммы *G. frondosa* – FIB-265; FIB-301.

Бактерицидность спиртовых экстрактов из базидиом *G. frondosa* по отношению к тест-микроорганизмам штаммоспецифична. Штамм 202 лучше всего себя показал в отношении *E. faecalis* 35758, *E. faecalis* ATCC 51299, штамм 265 – *E. faecalis* 35758 и клинических изолятов *S. aureus*, штамм 301 – *E. faecalis* ATCC 51299, *S. aureus* БС-9,12,19, штамм 207 – *E. faecalis* ATCC 51299.

Установлено, что при определении МПК грибных экстрактов необходимо инкубировать планшеты 48 часов, с последующим проведением МСВТ.

Таким образом, только с учетом предварительного поэтапного определения чувствительности возбудителя к экстрактам из различных штаммов *G. frondosa* можно рассматривать их как вполне возможную альтернативу антибиотикам для терапии гнойно-воспалительных заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными микроорганизмами.

Список использованных источников

1. Huang, S.-J. Nonvolatile taste components of culinary-medicinal maitake mushroom, *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray / S.-J. Huang, S.-Y. Tsai, S.-Y. Lin, C.-H. Liang, J.-L. Mau // Int. J. Med. Mushrooms. – 2011. – Vol. 13 (№ 3). – P. 265-272.
2. Tabata, T. Comparison of chemical compositions of Maitake (*Grifola frondosa* (Fr.) S.F. Gray) cultivated on logs and sawdust substrate / T. Tabata, Y. Yamasaki, T. Ogura // Food Sci. Technol. Res. – 2004. – Vol. 10 (№ 1). – P. 21-24.
3. Дегтярёва, Е.И. Антимикробные и фунгицидные свойства ксилотрофных базидиомицетов, культивированных на растительных субстратах с добавлением микроудобрений / Е.И. Дегтярёва, С.А. Коваленко // Экологический Вестник Северного Кавказа. – 2021. – Т. 17, № 2. – С. 28–37.
4. Дегтярёва, Е.И. Бактерицидные свойства *Ganoderma lucidum* в отношении стафилококковой инфекции» / Е.И. Дегтярёва, С.А. Коваленко, Ю.В. Вольштейн, А.В. Дегтярёва, А.Д. Аноничева // Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. Ин-та леса НАН Беларуси. – Вып. 83. – Гомель: Ин-т леса НАН Беларуси, 2023. – С. 316–328.