УДК 582.284.3

Л.П. Дзигун[1], А.В. Кудрінецька[2], О.М. Дуган[1]
[1]Національний технічний університет України "КПІ"
[2] Національний університет "Львівська політехніка",
кафедра технології біологічно-активних сполук, фармації та біотехнології

АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ КСИЛОТРОФНОГО БАЗИДІОМІЦЕТУ *LAETIPORUS SULPHUREUS* (BULL.: FR.) MURRILL

© Дзигун Л.П., Кудрінецька А.В., Дуган О.М., 2011

Проведено дослідження антимікробної активності дев'яти штамів виду *Laetiporus sulphureus* по відношенню до дев'яти тест-культур. Дослідження антимікробної активності показало повне пригнічення росту *P. aeruginosa* для усіх досліджуваних штамів *L. sulphureus*. А також наявність зон затримки росту *E. coli* для чотирьох штамів та *S. aureus* для чотирьох штамів *L. sulphureus*. Антагоністична активність для досліджуваних штамів *L. sulphureus* по відношенню до мікроміцетів виявлена не була.

Ключові слова: базидіоміцет, *Laetiporus sulphureus*, тест-культури, культивування, антимікробні властивості

Antimicrobial activity of 9 strains of the species *Laetiporus sulphureus* against 9 test cultures was studied. Investigation of antimicrobial activity demonstrated the whole depressing of the growth of *P. aeruginosa* by all strains *L. sulphureus*. It was found out too the antagonistic activity of the 4 strains *L. sulphureus* against *E. coli*, and 4 strains *L. sulphureus* against *S. aureus*. Antagonistic activity for investigated strains of *L. sulphureus* against to micromycetes was not detected.

Key words: basidiomycete, *Laetiporus sulphureus*, test-cultures, cultivation, antimicrobial properties

Вступ. Базидіальні гриби є джерелом повноцінного білка та біологічно активних речовин. Тому протягом багатьох століть людство вживало в їжу та застосовувало у народній медицині їх плодові тіла [10, 24]. У багатьох країнах світу, таких, як Японія, Німеччина, Франція, США, вищі базидіальні гриби використовують як продуценти комерційно важливих речовин з фармакологічними властивостями, що становлять основу лікувально-профілактичних препаратів широко спектра дії [1, 14, 19, 26, 28, 29]. Одним з перспективних для розроблення технології отримання білка з високою біологічною цінністю та сполук різних класів з вираженою біологічною активністю є ксилотрофний базидіоміцет *Laetiporus sulphureus*. За останнє десятиріччя він набув статусу лікарського, що пов'язано з наявністю у складі його плодових тіл та міцелію біологічно активних речовин з антиоксидантною, радіопротекторною, антивірусною, імуномодулюючою, гіпоглікемічною, цитотоксичною та тромболітичною властивостями [7, 15, 18, 20, 21, 23]. В літературі наводиться достатньо багато відомостей про антимікробні властивості *L. sulphureus* [5, 6, 10–12, 16, 17, 22, 24, 25, 27, 28], однак докладно це питання для місцевих штамів не вивчалося. Саме це і привернуло нашу увагу до вивчення антифунгальних та протимікробних властивостей трутовика сірчано-жовтого.

Метою роботи було встановити антимікробний спектр місцевих штамів ксилотрофного базидіального макроміцету *Laetiporus sulphureus* та терміни культивування для отримання максимального накопичення антибіотичних речовин в культурі.

Матеріали та методи. Досліджували 9 штамів базидіального макроміцету *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill з колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАНУ (306, 307, 308, 1518, 1772, 1773, 1774, 1775, 1776) [3].

В якості тест-культур використовували 9 культур мікроорганізмів:

Lviv Polytechnic National University Institutional Repository http://ena.lp.edu.ua

- грампозитивні бактерії: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (= FDA 209P), *Bacillus subtilis* ATCC 6633;
- грамнегативні бактерії: *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027;
- гриби *Candida albicans* 259 ATCC 885-653, *Fusarium oxysporum, Penicillum chrysogenum, Mucor circinelloides, Cochiobolus* sp.

Для поверхневого культивування грибів використовували агаризоване пивне сусло 8° за Баллингом, pH середовища 5,8 [2]. Для поверхневого культивування бактерій використовували м'ясо-пептонний агар.

Для глибинного культивування використовували середовища такого складу (г/л):

1. Гліцерин – 30; соєве борошно – 15; NaCl –3; крейда – 3 та вода водопровідна до 1 л; pH 7,0 [4].
2. Глюкоза – 10; пептон – 5; KH_2PO_4 – 0,6; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5; K_2HPO_4 – 0,4; вода водопровідна до 1 л; pH 7,0 [11].

Всі середовища стерилізували протягом 20 хв. при температурі 120 °С (тиск 1 атм.).

Культивування грибних культур здійснювали за температури 28 °С, бактерії культивували за температури 37 °С.

Глибинне культивування на рідких поживних середовищах проводили на кругових качалках при 100–150 об/хв. Співвідношення рідкої й повітряної фаз у колбах Ерлеймейєра становило 1:10.

Вихідний посівний матеріал готували пересіванням культури в пробірку з СА. Отриманий у пробірці міцелій переносили в колби на проавтоклавоване рідке середовище і культивували при 28°С 6 діб поверхневим способом та 7 діб на качалці з перемішуванням 120–150 об/хв. Після чого здійснювали пересів на досліджувані рідкі поживні середовища в кількості 10 об. %.

Дослідження проводили протягом 14 діб три рази. Динаміку зміни основних ростових показників фіксували кожні 2 доби. Для визначення концентрації біомаси міцелій гриба відокремлювали від культуральної рідини, промивали дистильованою водою та висушували у сушильній шафі при температурі 105 °С до постійної маси. Концентрацію біомаси розраховували у г сухої речовини на 1 л середовища. Активну кислотність (pH) визначали за допомогою pH-метра кожні 2 доби.

Антимікробні властивості гриба досліджували методами агарових дисків, методом лунок в агарі. Екстракти з міцедію наносили на диски з фільтрувального паперу діаметром 6 мм, які розміщували на поверхні агарового середовища. Після інкубування в термостаті антимікробну активність визначали вимірюванням діаметра зон затримки росту тест-організму [8, 12, 13].

Результати та їх обговорення. Дослідження антимікробного спектра штамів *L. sulphureus* було проведено по відношенню до грампозитивних і грамнегативних бактерій та дріжджів, що представляють групи основних збудників інфекційних захворювань людини, а також до фітопатогенних грибів.

Антимікробна активність по відношенню до *P. aeruginosa* була виявлена для всіх досліджуваних штамів *L. sulphureus*, по відношенню до *E. coli* – для штамів 308, 1518, 1772 і 1774, по відношенню до *S. aureus* – для штамів 307, 1773, 1774 та 1775, по відношенню до грибів активність не виявлена (табл. 1). Антибіотична активність по відношенню до *E. coli* та *S. aureus* збігається з відомостями наведеними в літературі [5, 11, 12], а пригнічення росту *P. aeruginosa* встановлено для *L. sulphureus* вперше.

При дослідженні антимікробних властивостей методом агарових блоків для *B. subtilis* у штамів 307, 308 та 1518 та для *F. oxysporum* у всіх штамів спостерігався активний ріст навколо блока, що може бути свідченням ростостимулювальної активності метаболітів *L. sulphureus* для цих тест-культур.

Подальші дослідження для визначення термінів культивування проводилися на рідких середовищах для штамів *L. sulphureus* 307 та 1518 по відношенню до бактеріальних культур. Зважаючи на те, що під час розроблення технологій культивування з метою отримання біологічно активних речовин важливим є не лише визначення термінів найбільшого накопичення цих сполук, але і зміна основних ростових показників, таких як накопичення біомаси та зміна pH середовища, то

Lviv Polytechnic National University Institutional Repository http://ena.lp.edu.ua

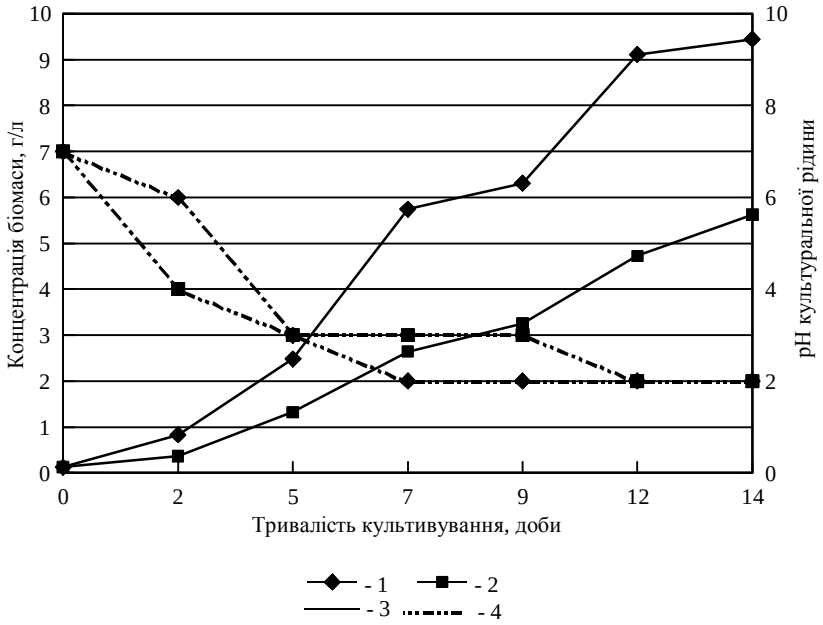
паралельно з антимікробною активністю для штаму 1518 було проведено дослідження динаміки зміни цих показників (рисунок).

Таблиця 1

Антимікробна активність гриба *L. sulphureus

Тест-культура	№ штаму																	
	306		307		308		1518		1772		1773		1774		1775		1776	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2
Escherichia coli	–	–	–	–	–	15	–	12	17	17	–	–	15	–	–	–	–	–
Pseudomonas aeruginosa	+	+	30	+	34	+	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Staphylococcus aureus	–	–	–	14	–	–	–	–	–	–	25	–	16	–	14	–	–	–
Bacillus subtilis	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Candida albicans	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Fusarium oxysporum	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Penicillum chrysogenum	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Mucor circinelloides	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Cochiobolus sp.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

*1 – методом агарових блоків, 2 – методом дифузії в агар (метод лунок); + – повне пригнічення росту тест-культури, – – зона затримки росту відсутня; зона затримки росту вказана в міліметрах.



Динаміка накопичення біомаси та зміни pH середовища в процесі глибинного культивування гриба Laetiporus sulphureus (штам 1518): 1 -середовище 1, 2 – середовище 2, 3 – динаміка накопичення біомаси, 4 – зміна pH культуральної рідини

Як видно з графіків, наведених на рисунку, під час росту *L. sulphureus* різко знижує pH середовища до 2, що є типовим для дереворуйнівних грибів представників бурої гнилі, до яких він належить [9, 11, 12]. Проте такі значення pH можуть бути одним з чинників антагоністичної активності по відношенню до бактерій, для яких найбільш сприятливим є нейтральне та слабко лужне середовище. Враховуючи це, під час подальшого дослідження паралельно перевіряли антимікробні властивості як нативної культуральної рідини, так і нейтралізованої до значень pH 6,5-7.

Як видно з даних, наведених у табл. 2, на 7 добу культивування не було виявлено антимікробної активності до жодної тест-культури. На 9 добу культивування у штаму *L. sulphureus* 307 спостерігалася антимікробна активність по відношенню до *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa.* У

Lviv Polytechnic National University Institutional Repository http://ena.lp.edu.ua

штаму *L. sulphureus* 1518 антимікробна активність спостерігалась на 9 добу культивування до *S. aureus* і *P. aeruginosa* та 14 добу до *E. coli* і *S. aureus* культивування (табл. 2). Пригнічення росту кишкової палички для обох досліджуваних штамів пов'язано зі значною кислотністю середовища, тоді як для *S. aureus* і *P. aeruginosa* зона затримки росту спостерігалась і для нейтралізованої культуральної рідини. Таким чином період культивування для накопичення антибіотичних речовин, що пригнічують ріст *S. aureus* і *P. aeruginosa,* може становити 10–14 діб, а незначний діаметр затримки росту потребує підбору сприятливого для *L. sulphureus* середовища.

Таблиця 2

Визначення терміну культивування гриба *Laetiporus sulphureus* для максимального проявлення антимікробної активності*

№ штаму	Термін культивування	*Escherichia coli*		*Staphylococcus aureus*		*Pseudomonas aeruginosa*	
		1	2	1	2	1	2
1518	*21 доба*	12	–	–	–	–	–
	14 діб	12	–	11	–	–	–
	9 діб	–	–	11	10	10	10
	7 діб	–	–	–	–	–	–
307	*14 діб*	–	–	–	–	–	–
	9 діб	12	–		10	–	12
	7 діб	–	–	–	–	–	–

*1 – нативна культуральна рідина, 2 – нейтралізована культуральна рідина; – – відсутність зони затримки росту; зона затримки росту вказана в міліметрах.

Під час дослідження антимікробної активності екстрактів з міцелію *L. sulphureus* зон затримки росту виявлено не було, що свідчить про відсутність антибіотичних речовин у міцелії досліджуваних штамів за даних умов.

Висновки. Макроміцет *Laetiporus sulphureus* має виражені антибіотичні властивості по відношенню до неспороутворюючих бактерій. Встановлена антимікробна активність по відношенню до *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (= FDA 209P), *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Антифунгальна активність для досліджуваних штамів встановлена не була.

Антимікробна активність у відношенні до *S. aureus* та *P. aeruginosa* не пов'язана із зниження pH середовища до 2.

Для отримання та виділення антимікробних речовин є доцільним культивування протягом 10-14 діб штамів *L. sulphureus*, що забезпечує найбільш широкий спектр антагонізму по відношенню до тест-культур.

Перспективним штамом для отримання антибіотичних речовин є *L. sulphureus* 1518.

При подальших дослідженнях планується підібрати середовище для культивування *L. sulphureus*, що сприятиме максимальному накопиченню антибіотичних речовин.

Автор висловлює щиру подяку керівнику Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України д-ру біол. наук О. А. Кіпріановій за надання тест-культур для проведення дослідження.

1. Белова Н.В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в России // Микол. и фитопатол. – 2004. – Т. 38, № 2. – С. 1–7. 2. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / Отв. ред. И.А. Дудка. – К.: Наук. думка, 1988. – 144 с. 3. Бухало А.С., Митропольська Н.Ю., Михайлова О.Б. Каталог культур шапинкових грибів (ІВК) – К.: Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної Академії наук України, НВФ «Славутич-дельфін», 2006. – 36 с. 4. Ершова Е.Ю., Ефременкова О.В., Зенкова В.А. и др. Выявление

Lviv Polytechnic National University Institutional Repository http://ena.lp.edu.ua

антимикробной активности у представителей рода Coprinus *// Микология и фитопатология. – 2001. – Т. 35, № 6. – С. 32–37. 5. Ершова Е.Ю., Тихонова О.В., Лурье Л.М. и др. Антимикробная активность штаммов* Laetiporus sulphureus *в условиях глубинного культивирования // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48, № 1. – С. 18–22. 6. Иванова И.Е. Изучение продуктивности и биологической активности нового штамма гриба* LS 1-06 Laetiporus sulphureus (Bull. Fr) Bond. et Sing *// Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. – 2010. – № 1. – С. 20. 7. Капич А.Н., Гвоздкова Т.С., Квачева З.Б. и др. Антиоксидантные, радиозащитные и противовирусные свойства экстрактов мицелия гриба* Laetiporus sulphureus *// Успехи медицинской микологии. Материалы второго Всероссийского конгресса по медицинской микологии.– М.: Национальная Академия Микологии, 2004. – Т. 3. – С. 146–148. 8. Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.И. Билай. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с. 9. Рипачек В. Биология дереворазрушающих грибов [пер. с чешского М.Гашковой]. – М.: Изд-во «Лесная промышленность, 1967. – 276 с. 10. Соломко Э.Ф., Бухало А.С., Митропольская Н.Ю. Лекарственные свойства базидиальных макромицетов // Пробл. эксперим. ботаніки та екології рослин. – 1997. – № 1. – С. 156-167. 11. Тихонова О.В., Ершова Е.Ю., Лурье Л.М. и др. Антимикробные свойства представителей вида* Laetiporus suphureus (Fr.) Bond et Sing. *// Успехи медицинской микологии. Материалы первого Всероссийского конгресса по медицинской микологии – 2001. – Т. 1. – С. 313–315. 12. Тихонова О.В., Лурье Л.М., Ершова Е.Ю. и др. Изучение глубинной культуры* Laetiporus sulphureus *// Современная микология в России. Первый съезд микологов: Тез. докладов. – М., 2002. – С. 257. 13. Чхенкели В.А., Никифорова Т.И., Скворцова Р.Г. Антимикробное действие дереворазрушающего гриба* Coriolus pubescens (Shum.: Fr.) Quel. *// Микология и фитопатология. – 1998. – Т. 32, № 1. – С. 69–72. 14. Hyde K.D., Bahkali A.H. and Moslem M.A. Fungi – an unusual source for cosmetics // Fungal Diversity. – 2010. – Vol. 43. – P. 1–9. 15. Hwang H.S., Lee S.H., Baek Y.M., Kim S.W. et al. Production of extracellular polysaccharides by submerged mycelial culture of Laetiporus sulphureus var. miniatus and their insulinotropic properties // Appl Microbiol Biotechnol. – 2008. – Vol. 78. – P. 419–429. 16. Karaman A.M., Mimica-Dukic N. M., Petar K. N. and Matavulj M. N. Antioxidative and antibacterial activity of some lignicolous basidiomycetous fungi from Serbia // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2007 – Vol. 9, Issues 3&4. – P. 330–331. 17. Karaman M., Jovin E., Malbaša R. et al. Medicinal end edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agenys // Phytotherapy research. – 2010. – Vol. 24. – P. 1473–1481. 18. León F., Quintana J., Rivera A. et al. Lanostanoid triterpenes from Laetiporus sulphureus and apoptosis induction on HL-60 human myeloid leukemia cells // J. Nat. Prod. – 2004. – Vol. 67. – P. 2008–2011. 19. Lindequist U., Niedermeyer T. H. J. and Jülich W. The Pharmacological Potential of Mushrooms (Review) // CAM. – 2005. – Vol. 2, No. 3. – P. 285–299. 20. Mlinarič A., Kac J., Pohleven F. Screening of selected wood-damaging fungi for the HIV-1 reverse transcriptase ingibitors // Acta Pharm. – 2005. – Vol. 55. – P. 69–79. 21. Okamura T., Takeno T., Fukuda S. et al. Cultural characteristics of Laetiporus sulphureus, producing an anti-thrombin substance // Bull. Mukogawa Women's Univ. Nat. Sci. – 2000. – Vol. 48. – P. 65–68. 22. Pârvu M., Andrei A., Roşca-Casian O. Antifungal activity of Laetiporus sulphureus mushroom extract / Contribuţii Botanice. – 2010. – XLV. – P. 65–70. 23. Radic N., Injac R. & Strukelj B. Sulphur Tuft Culinary-Medicinal Mushroom, Laetuporus sulphureus (Bull.: Fr.) Murrill (Aphyllophoromycetideae): Bioactive Compounds and Pharmaceutical Effects (Review) // International Journal of Mushrooms. – 2009. – Vol. 11, No 2. – P. 103–116. 24. Stamets P. Novel Antimicrobials from mushrooms / Paul Stamets // Herbal Gram. – 2002 – Vol. 54. – P. 29–33. 25. Suay I., Arenal F., Asensio F.J. et al. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities // Antonie van Leeuwenhoek. – 2000. – Vol. 78. – P. 129–139. 26. Tidke G. and Rai M. Biotechnological Potential of Mushrooms: Drugs and Dye Production // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2006. – Vol. 8. – P. 351–360. 27. Turkoglu A., Duru M. E., Mercan N. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill // Food Chemistry. – 2007. – Vol. 101, Issue 1. – P. 267–273. 28. Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occuring in higher Basidiomycetes mushrooms: Current perspectives [Review] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 1999. – Vol. 1. – P. 31–62. 29. Zjawiony J. K. Biologically Active Compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi // J. Nat. Prod. – 2004. – Vol. 67. – P. 300–310.*

Lviv Polytechnic National University Institutional Repository http://ena.lp.edu.ua