

АНОТАЦІЯ
магістерської дисертації студентки 6 курсу, групи БТ-61м
спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія
спеціалізації Промислова біотехнологія
Кізіцької Тетяни Олександрівни
на тему «Антибактеріальні властивості макроміцетів *Fomitopsis betulina* та
***Lentinula edodes*»**

Магістерська дисертація: 83 с., 48 табл., 13 рис., 46 джерел

Актуальність роботи полягає у необхідності пошуку нових продуцентів антибіотичних сполук у зв'язку з розповсюдженням антибіотикорезистентних мікроорганізмів.

Робота виконувалась згідно з планами науково дослідних робіт лабораторії рослинної екстракції та біоконверсії Інституту харчової біотехнології і геноміки (ІХБГ) НАН України: «Вивчення антибактеріальної активності макроміцетів», № держреєстрації 0115U002083; «Забезпечення оптимальних умов культивування макроміцетів для покращення їх фізіологічної активності та підвищення росту біомаси», № держреєстрації 0118U003812.

Тому метою роботи було встановлення антибактеріальної активності по відношенню до патогенних мікроорганізмів макроміцетів *Fomitopsis betulina* та *Lentinula edodes*.

Завданнями дослідження було:

1. Методом дифузії в агар провести скринінг ряду видів базидіальних грибів та аскоміцетів з метою пошуку антибактеріально активних;
2. Відібрати перспективні види грибів з високою антибактеріальною активністю та порівняти їх ефективність з сучасними антибіотиками та ефірними оліями;
3. Виявити сприятливі умови синтезу антибактеріальних речовин при культивуванні відібраних видів *F. betulina* та *L. edodes*;
4. Дослідити антибактеріальну активність фільтрату культуральної рідини *F. betulina* методом серійних розведень;
5. З'ясувати вплив концентрування та висушування на антибактеріальну активність фільтрату культуральної рідини *F. betulina* проти еталонних тест-культур та клінічних ізолятів;

6. Дослідити вплив ультрафіолету на антибактеріальну активність *F. betulina*;

7. Розробити стартап-проект, присвячений виготовленню БАД з антибактеріальною дією на основі фільтрату культуральної рідини *F. betulina*.

Об'єкт дослідження: культури грибів з Колекції шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Предмет дослідження: антибактеріальні властивості макроміцетів, які оцінюються як здатність до інгібування росту тест-культур мікроорганізмів.

В роботі застосовані мікробіологічні, мікологічні, статистичні методи дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів: під час проведення скринінгу макроміцетів було вперше ідентифіковано антибактеріальну активність грибів *Crinipellis schevczenkovi*, *Hohenbuehelia myxotricha*, *Oxyporus obducens*, *Spongipellis litschaueri*. Серед об'єктів скринінгу було відібрано найактивніших представників *F. betulina* та *L. edodes* і підібрано для них оптимальні умови культивування для накопичення антибактеріальних метаболітів. Встановлено, що фільтрат культуральної рідини *F. betulina* (сконцентрований різними способами) володіє бактерицидною активністю по відношенню до еталонних бактерій в концентраціях від 2,0 до 18,75 мг/мл та щодо полірезистентних клінічних ізолятів в концентраціях від 7,8 до 48,42 мг/мл. Визначено, що ультрафіолетове опромінення позитивно впливає на накопичення біомаси та антибактеріальну активність *F. betulina* відносно *E. coli* та *S. aureus* у малих дозах: 0,28–0,85 кДж/см² (за тривалості опромінення 5 і 15 хв).

Практичне значення одержаних результатів полягає у застосуванні грибів у якості джерела АФІ для препаратів у комплексній протиінфекційній терапії та для розробки лікувально-профілактичних засобів на основі їх сировини (плодових тіл грибів, культуральної рідини та міцелію). Тому в рамках одного із завдань магістерської дисертації було розроблено стартап проект щодо виробництва БАД на основі фільтрату культуральної рідини гриба *F. betulina*.

За темою дисертації здійснено наступні публікації:

T. Zaichenko. Antibacterial Properties of *Lentinus Edodes* / T. Zaichenko // Innovations in Science and Technology: the XVII All-Ukrainian R&D Students Conference Proceeding, (Kyiv, November 22, 2016). – Kyiv, National Technical University of Ukraine „Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute“, 2016. – Part III. – pp. 84–85.

Круподьорова Т.А. Ріст та антибактеріальна активність *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. в культурі / Т.А. Круподьорова, О.Ф. Забейда, В.Ю. Барштейн, Т.О. Зайченко // Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів»: матеріали I Міжнар. наук.-практ. конф. (30–31 березня 2017 року). В 2-х т., Т.2. – Х. : НФаУ, 2017. – с. 188–189.

Зайченко Т.О. Дослідження антибіотикочутливості тест-бактерій / Т.О. Зайченко, Т.А. Круподьорова, О.Ф. Забейда // «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 21 квітня 2017) [Електронне видання]. – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, Вид-во «Політехніка», 2017. – с. 31.

Зайченко Т.О. Антибактеріальні властивості деяких макроміцетів / Т.О. Зайченко, Т.А. Круподьорова, В.Ю. Барштейн, Н.В. Дехтяренко // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2017. – №3, ст. 19–28.

Патент 121324 Україна, МПК С12N1/14, С12P1/02, А61К36/06, А61P31/04, С12R1/645. Штам базидіального гриба *Phellinus igniarius* (Fr.) Quel. 29, який проявляє антибактеріальну активність щодо бактерій *Escherichia coli* / Барштейн В.Ю., Круподьорова Т.А., Забейда О.Ф., Зайченко Т.О.; заявник(и) Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» – № u201707333; заявл. 11.07.2017; опубл. 27.11.2017.

В результаті виконання роботи зроблено наступні висновки:

1. У ході дослідницької роботи здійснено ряд експериментальних досліджень з вивчення антибактеріальної активності базидіоміцетів та аскоміцетів, було відібрано гриби *Lentinula edodes* та *Fomitopsis betulina* з вищою антибактеріальною активністю та з'ясовано для них вплив різних чинників на ріст і рівень інгібуючої активності відносно тест-бактерій.

2. За результатами скринінгу антимікробної активності 30 видів макроміцетів виявлено 27 видів з різним рівнем антибіотичної активності. Зона затримки росту тест-мікроорганізмів *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* 06 та *S. aureus* 209 становила від 9,5 мм до повного пригнічення росту. Відібрано види грибів – *F. betulina* та *L. edodes* з високою антибактеріальною активністю. Антибактеріальна активність фільтратів культуральної рідини *F. betulina* і *L. edodes* може бути зіставлена з дією комерційних антибіотиків та ефірних олій, а також проявляє найширший спектр дії і найвищу інгібуючу активність серед протестованих грибів.

3. Визначено оптимальні параметри культивування для міцелію *L. edodes* і *F. betulina*: температура – 27 ± 1 °C; рН 3,5–4,0; тривалість культивування – 14 діб; джерела вуглецю – целюлоза/сахароза/глюкоза (*F. betulina*), глюкоза/целюлоза (*L. edodes*); джерела азоту – аспарагін/сульфат амонію (*F. betulina*), аспарагін (*L. edodes*). Також було визначено сприятливі параметри синтезу антибактеріальних речовин у культуральній рідині: температура 27 ± 1 °C, рН 5,5, тривалість культивування 14 діб, джерела вуглецю – галактоза для *F. betulina* (у концентрації 10 г/л) та целюлоза (у концентрації 10 г/л) для *L. edodes*, джерела азоту – пептон для *F. betulina* та нітрат амонію для *L. edodes*.

4. Встановлено, що фільтрат культуральної рідини *F. betulina* (в різному агрегатному стані і сконцентрований різними способами) володіє бактерицидною активністю по відношенню до еталонних бактерій *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 в концентраціях від 2,0 до 18,75 мг/мл та щодо полірезистентних клінічних ізолятів *S. aureus* 22/824 MRSA, *S. haemolyticus* MRCNS 134/3569, *P. aeruginosa* MBL 99/3066, *P. aeruginosa* MBL 125/3343, *E. coli* KPC 116/3196, *K. pneumoniae* 6/509 ESBL, AmpC, KPC, *A. baumannii* 50/1496 MBL, *A. baumannii* 88/2995 MBL в концентраціях від 7,8 до 48,42 мг/мл. Враховуючи значення мінімальної бактерицидної концентрації серед всіх досліджених зразків, висушений сконцентрований фільтрат культуральної рідини *F. betulina* є перспективною

сировиною або додатковим компонентом лікарських засобів з антибактеріальними властивостями проти різних патогенних бактерій.

5. Вивчено вплив ультрафіолетового опромінення на ріст та антибактеріальну активність *F. betulina* та визначено, що даний чинник позитивно впливає на накопичення біомаси та антибактеріальну активність відносно *E. coli* та *S. aureus* у малих дозах: 0,28–0,85 кДж/см² (за тривалості опромінення 5 і 15 хв).

6. З метою практичного застосування результатів дослідження було розроблено стартап-проект, який являє собою виробництво БАД на основі фільтрату культуральної рідини гриба *F. betulina*. Отже, сировина, отримана культивуванням даного гриба, є перспективним компонентом препаратів для лікування інфекцій бактеріального походження.

Список використаних у дисертації джерел:

1. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.И. Билай. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.

2. Мацелюх Б.П. Виділення і характеристика антибіотиків стрептоміцетів, ізольованих із ґрунтів України / Б.П. Мацелюх, О.І. Бамбура, О.П. Копейко, О.В. Стоянова // Мікробіол. журн. – 2011. – **73**, № 1. – С. 17–23.

3. Ли Юй. Лекарственные грибы в традиционной китайской медицине и современных биотехнологиях / Ли Юй, Тулигуэл, Бао Хайин, А.А. Широких, И.Г. Широких, Т.Л. Егошина, Д.В. Кириллов, В.А. Сысуев – Киров: О-Краткое, 2009. – 320 с.

4. Ranadive K.R. Glimpses of antimicrobial activity of fungi from world / K.R. Ranadive, M.H. Belsare, S.S. Deokule et al. // J. New Biol. Rep. – 2013. – 2, № 2. – P. 142–162.

5. Alves M.J. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds / M.J. Alves, I.C.F.R. Ferreira, J. Dias, V. Teixeira, A. Martins, M. Pintado // Planta Medica. – 2012. – 78, № 16. – P. 1707–1718.

6. Вассер С.П. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборник научных трудов в двух томах. Т. 1. / С.П. Вассер – Киев: Альтерпрес, 2011. – 212 с.
7. Krupodorova T.A. Antibacterial activity of macromycetes mycelia and culture liquid / T.A. Krupodorova, V.Yu. Barshteyn, E.F. Zabeida, E.V. Pokas // Microbiol. Biotechnol. Lett. – 2016. – 44, № 3. – P. 246–253.
8. Дзигун Л.П. Антимікробні властивості ксилотрофного базидіоміцету *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) murrill / Л.П. Дзигун, А.В. Кудрінецька, О.М. Дуган // Вісник НУ “Львівська політехніка”. – 2011. – № 700. – С. 156–160.
9. Круподьорова Т.А. Антимікробна активність штамів *Ganoderma applanatum* (Pers.: Wallr.) Pat. та *G. lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. в умовах глибинного культивування / Т.А. Круподьорова, Н.А. Бісько, Н.Л. Поєдинок та ін. // Ukr. Botan. J. – 2008. – 65, № 4. – P. 590—595.
10. Imtiaj A. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms / A.Imtiaj, T.S. Lee // World J. Agric. Sci. – 2007. – 3, № 3. – P. 316–321.
11. Dighe S. Antibacterial activity of some Indian mushrooms / S. Dighe, A.D. Agate // Int. J. Med. Mushrooms. – 2000. – № 2. – P. 141–150.
12. Yamac M. Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates / M. Yamac, F. Bilgili // Pharmaceutical Biology. – 2006. – 44, № 9. – P. 660–667.
13. Chelela B.L. Antibacterial and antifungal activities of selected wild mushrooms from Southern Highlands of Tanzania / B.L. Chelela, M.M.A. Chacha // Amer. J. Res. Commun. – 2014. – 2, № 9. – P. 58–68.
14. Moglad E.H.O. Screening of antimicrobial activity of wild mushrooms from Khartoum state of Sudan / E.H.O. Moglad, A.M. Saadabi // Microbiol. J. – 2012. – 2, № 2. – P. 64–69.
15. Akyuz M. Antimicrobial activity of some edible mushrooms in the Eastern and Southeast Anatolia Region of Turkey / M. Akyuz, A.N. Onganer, P. Erecevit, S. Kirbag // Gazi Univ. J. Sci. – 2010. – 23, № 2. – P. 125–130.

16. Rosa L.N. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity / L.H. Rosa, K.M. Machado, C.C. Jacob et al. // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2003. – 98, № 7. – P. 967–974.

17. Tsvetkova I. Antibacterial activity of some Bulgarian higher basidiomycetes mushrooms / I. Tsvetkova, H. Naydenki, A. Petrova et al. // Int. J. Med. Mushr. – 2006. – 8, № 1. – P. 63–66.

18. Sidorova I.I. Bioactive substances of agaricoid basidiomycetes and their possible role in regulation of myco and microbiota structure in soils of forest ecosystems. I. Antibiotic activity of water extracts from basidioms of several dominant agaricoid basidiomycetes / I.I. Sidorova, L.L. Velikanov // Mikol. Fitopatol. – 2000. – № 34. – P. 11–17.

19. Bala N. Evaluation of antibacterial activity of Australian basidiomycetous macrofungi using high-throughput 96-well plate assay / N. Bala, A.B. Aitken, N. Fechner et al. // Pharm. Biol. – 2011. – 49, № 5. – P. 492–500.

20. Кудрявец, Є. Антимікробна активність вищих базидіальних грибів / Євген Кудрявец, Маргарита Ломберг // Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті : програма і матеріали 80 міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів, 10–11 квітня 2014 р. – К. : НУХТ, 2014. – Ч. 1. – С. 620–622.

21. De Carvalho M.P. Investigation of the antibacterial activity of basidiomycetes *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes* / M.P. De Carvalho, S.T. Van Der Sand, E.A.R. Rosa, J.C. Germani, N.K. Ishikawa // Biocencias. – 2007. 15, № 2. – P. 173–179.

22. Патент 2375439 Россия, МПК С12N1/14, А61К36/06. Штамм базидиального гриба *Fomitopsis officinalis*, проявляющий антибактериальную активность в отношении бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* / Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С., Ефремова Н.Ю., Булах Е.М.; заявитель и патентообладатель Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Государственное учреждение Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Сибирского отделения Российской

академии медицинских наук . – № 2008112962/13; заявл. 03.04.2008; опубл. 10.12.2009.

23. Шариков А.М. Исследование антибактериальной активности метаболитов некоторых высших грибов Средней Сибири / А.М. Шариков // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 6. – С. 128–129.

24. Mothana R.A.A. Ganomycins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi* / R.A.A. Mothana, Jansen R., W.D. Jülich, U. Lindequist // J. Nat. Prod. – 2000. – № 63. – P. 416–418.

25. Ameri A. In vitro evaluation of anti-staphylococcal activity of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma praelongum* and *Ganoderma resinaceum* from Pune, India / A. Ameri, J.G. Vaidya, S.S. Deokule // Afr. J. Microbiol. Res. – 2011. – 5, №3. – P. 328–333.

26. Шариков А.М. Гриб-чага *Inonotus obliquus* Pilat: антибиотическая активность метаболитов / А.М. Шариков // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 8. – С. 167–168.

27. Alresly Z. Bioactive triterpenes from the fungus *Piptoporus betulinus* / Z. Alresly, U. Lindequist, M. Lalk et al. // Rec. Nat. Prod. – 2016. – 10, № 1. – P. 103–108.

28. Schillaci D. Antibacterial activity of mediterranean oyster mushrooms, species of genus *Pleurotus* (higher basidiomycetes) / D. Schillaci, V. Arizza, M.L. Gargano, G. Venturella // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2013. – 15, № 6, P. 591–594.

29. Бадалян С.М. Антибактериальная активность культуральной жидкости некоторых базидиальных макромицетов / С.М. Бадалян, Н.Г. Гарибян // Современная микология в России. Первый съезд микологов России. Тезисы докладов, 11–13 апреля 2002 г. – М.: Национальная академия микологии. – с. 249.

30. Zheng H. Purification and characterization of an antibacterial protein from the cultured mycelia of *Cordyceps sinensis* / H. Zheng, Y. Maoqing, X. Liqiu et al. // Wuhan Univ. J. Nat. Sci. – 2006. – 11. – P. 709–714.

31. Novak R. The pleuromutilin antibiotics: a new class for human use / R. Novak, D.M. Shlaes // Curr. Opin. Investig. Drugs. – 2010. – № 11. – P. 182–191.

32. Клечак І.Р. Біотехнології на основі вищих базидіальних грибів роду *Coriolus* Quel / І.Р. Клечак, Л.О. Антоненко // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2012. – № 3. – С. 41–49.
33. VanderMolen K.M. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program / K.M. VanderMolen, H.A. Raja, T. El-Elimat, N.H. Oberlies // AMB Express. – 2013. – v.3, № 71.
34. Дзигун Л.П. Вплив умов культивування на ріст ксилотрофних базидіоміцетів *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. та *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill / Л.П. Дзигун, О.М. Дуган // Вісник аграрної науки Причорномор'я. – 2012. – №1, ст. 178–185.
35. Vieira G.R.T. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antimicrobial metabolites by *Polyporus tricholoma* Mont. / G.R.T. Vieira, M. Liebl; L.B.B. Tavares; R. Paulert; A.S. Júnior // Braz. J. Microbiol. – 2008. – vol.39, no.3.
36. Elisashvili V. Effects of Carbon and Nitrogen Sources in the Medium on *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. (Heterobasidiomycetes) Growth and Polysaccharide Production / V. Elisashvili, K.-K. Tan // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2003. – v. 5, №1.
37. Da Silva B.P. Effects of Carbon Sources and Time of Cultivation on the Antimicrobial Activities of Intra and Extracellular Extracts of *Pleurotus pulmonarius* Cultured in Submerged Conditions / B.P. da Silva, J. Abrahão, R.M. Peralta // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2016. – Volume 5, Number 11. – pp. 97–105.
38. Круподерова Т.А. Рост штаммов *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. и *G. lucidum* (Curt.) P. Karst. в культуре / Т.А. Круподерова, Н.А. Бисько // Современная микология в России. Том 2. Материалы 2-го съезда микологов России. – М.: Национальная академия микологии, 2008. – с. 510.
39. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. – 528 с.

40. Sathesh-Prabu C. Mutation Breeding of Mushroom by Radiation / C. Sathesh-Prabu, Y.-K. Lee // Journal of Radiation Industry. – 2011. – 5, № 4. – pp. 285–295.
41. Sridhar K.R. Antibacterial activity of freshwater fungus *Ingoldiella hamata* / K.R. Sridhar // Advanced biotech.– 2012. – 11, № 7. – pp. 12–15.
42. Sittiwet C. Anti-staphylococcus aureus activity of *Phellinus igniarius* aqueous extract / C. Sittiwet, D. Puangpronpitag // Int. J. Pharmac. – 2008. – 4. – pp. 503–505.
43. Lomberh M.L. Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures / M.L. Lomberh, E.F. Solomko, A.S. Buchalo, B. Kirchhoff // 4th Int. Confer. "Mushroom Biology and Mushroom Products": Proc. – Cuernavaca (Mexico), At IVth Intern. Conf. of Mushroom Biology and Mushroom Products. – Cuernavaca, 2002. – pp. 367–378.
44. Vukoević J. Effect of medium pH and cultivation period on mycelial biomass, polysaccharide, and lignolytic enzyme production by *Ganoderma lucidum* from Montenegro / J. Vukoević, M. Stajić, S. Duletić-Laušević, J. Simonić // Arch. Biol. Sci. – 2006. – 58. – № 3. – pp. 179–182.
45. Maitake Mushroom Supplement [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.activanaturalstore.com/collections/mushroom-vitamins-1/products/maitake-mushroom-supplement>.
46. Сіменко І.В. Аналіз господарської діяльності: навчальний посібник / за заг. ред. І.В. Сіменко, Т.Д. Косової – К. : «Центр учбової літератури», 2013. – 384 с.