

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* FR. В ОТНОШЕНИИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Дегтярёва Е.И., Коваленко С.А., Петровская Т.А.,
Зинкевич О.В., Дегтярёва А.В.

Гомельский государственный медицинский университет
Институт леса НАН Беларуси, Гомель

Щеделистник обыкновенный *Schizophyllum commune* Fr. растет одиночно или черепитчатыми группами на мертвой древесине ослабленных живых, а также на сухостойных и валежных стволах и ветвях лиственных, реже хвойных деревьев, иногда на живых деревьях в местах повреждений. Шляпки нередко с лопастными краями, тонкие, кожистые, сверху светло-серые, войлочные. На нижней поверхности находятся веерообразные расходящиеся кожистые упругие пластинки беловатого цвета, впоследствии становящиеся серовато-розоватыми. Активный рост плодовых тел происходит с середины лета до поздней осени. Грибы этого таксона распространены на всех континентах, кроме Антарктиды, предположительно является самым распространенным грибом на Земле [1].

Ксилотрофный базидиомицет *S. commune* обладает ценными фармакологическими свойствами, используется в странах Юго-Восточной Азии в качестве продуцента биологически активных веществ. Биоактивный полисахарид шизофиллан (сонифилан, шизофиран, или SPG), выделенный из плодовых тел *S. commune*, обладает противоопухолевыми [2, 3], антимикробными [4], гепатопротекторными [5], противовоспалительными [6], антивирусными свойствами [7], действует как стимулятор иммунной системы [8]. Экстракт гриба подавляет *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella paratyphi* B [9]. На основе SPG разработаны и применяются препараты для усиления жизнеспособности организма, для лечения рака молочных желез, шейки матки и желудка, противовоспалительные составы.

Несмотря на то, что щеделистник обыкновенный относится к несъедобным грибам, он не является ядовитым, однако представляет малый кулинарный интерес в связи со своей жесткостью. Гриб употребляется в пищу в Мексике, Бразилии, Индонезии, Индии и странах Африки к югу от Сахары для увеличения содержания белка в основных продуктах питания. Такое предпочтение населением жестких грибов обычно для тропиков, где в жарких влажных условиях более мясистые грибы быстро гниют [10]. В 100 г сухих грибов *S. commune* содержится в среднем 16 г белка, 2 г жира, 68 г углеводов, 408 мг Р, 227 мг К, 188 мг Са, 12,3 мг Fe, 8,8 мг Mg, 5,7 мг Zn, 0,9 мг Cu, 38,6 мг Na, 133 мкг Cr, витамины [11].

В Беларуси есть опыт выращивания *S. commune* на растительных субстра-

тах, так на субстрате из осиновых опилок в смеси с отрубями в соотношении 4:1 урожайность достигала 6,2%. На субстрате из соломы плодоношение не наблюдалось [12].

Исходя из вышеизложенного, представляет определенный научный и практический интерес проведение скрининга наиболее продуктивных штаммов *S. commune* из коллекционного фонда FIB для получения биологически активных веществ, в том числе используемых в медицинской практике. Изучить антимикробные свойства спиртовых экстрактов, полученных из плодовых тел *S. commune*.

Материалы и методы исследования. Объектами лабораторных исследований стали штаммы *S. commune* (113, 127, 248, 390) из коллекции штаммов грибов ГНУ «Институт леса НАН Беларуси» (FIB). Видовая идентификация проводилась в лаборатории геномных исследований и биоинформатики Института леса с использованием генетических методов анализа: ПЦР-анализ, секвенирование по Сэнгеру. В качестве маркерного региона для видового определения использовался фрагмент рибосомной ДНК «18S рДНК-ITS1-5,8S рДНК-ITS2-28S рДНК». Штаммы 127 и 390 выделены в разные годы из тканевого материала плодовых тел, собранных в природных условиях Беларуси; штамм 113 получен в 1988 году из коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии и биотехнологии Академии наук Молдовы (ИМВ); штамм 248 – в 2006 году из Института микробиологии НАН Беларуси (БИМ).

Целью данной работы являлось изучение морфолого-культуральных особенностей вегетативного роста штаммов щелелистника обыкновенного (113, 127, 248, 390) в чистой культуре и на растительных субстратах, а также антимикробных свойств спиртовых экстрактов, полученных из плодовых тел.

Культурально-морфологические исследования чистых культур *S. commune* проводили на сусло-агаровой питательной среде (САС) в трехкратной повторности (сахаристость 4%, pH 6,5) по общепринятым методикам [13, 14]. Диски мицелия диаметром 6 мм вырезали по краю активно растущей колонии грибов, переносили их в центр чашки Петри ($d = 90$ мм) и инкубировали в термостате при температуре 25 °С. Ростовой коэффициент (РК) рассчитывали на 5-е сутки по методике А.С. Бухало [13]. Скорость радиального роста рассчитывали по методике Е.Ф. Соломко.

Изучение скорости роста мицелия штаммов щелелистника обыкновенного на зерновом (овес) субстрате осуществляли в стеклянных емкостях объемом 0,5 л при температуре 25 °С.

Питательный субстрат для культивирования штаммов *S. commune* готовили из ольховых опилок (степень измельчения 1-3 мм) и березовой стружки (степень измельчения 5-10 мм), обогащенных пшеничными отрубями в весовом соотношении 4:1, с добавлением по 1% мела и гипса. Увлажненный субстрат фасовали по 0,7 кг в пакеты ПНД 20 мкм. Субстратные блоки стерилизовали в паровых стерилизаторах насыщенным паром при давлении 0,12 МПа и температуре 122 °С в течение двух часов. Повторность опыта пятикратная. Влажность субстрата с ольховыми опилками после автоклавирования составила 62%, pH

5,5; с березовой стружкой влажность субстрата – 64%, pH 5,4. Инокуляцию производили посевным мицелием щелелистника обыкновенного в количестве 5% от массы субстрата. Субстратные блоки созревали при температуре 25°C. В культивационном помещении температура воздуха поддерживалась 20-22°C, влажность – 80-85%, освещенность – не менее 150 люкс (продолжительность светового дня 10-11 ч), содержание CO₂ – (657±23) ppm.

Для получения вторичных метаболитов использовались сухие плодовые тела *S. commune*. Экстракцию проводили этиловым спиртом 70%. Применяли метод мацерации с продолжительным периодом нагрева экстракционной смеси до температуры +35°C, предотвращающей разрушение энзимов. Спиртовые экстракты отделяли от плодовых тел грибов и фильтровали через бактериальные фильтры. 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. Грибные экстракты растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), доводя раствор до 20000 мкг/мл. Для работы нами были использованы стерильные серологические 96-луночные планшеты с V-образным дном. На одном планшете в рядах А – Н определялась минимальная подавляющая концентрация одновременно для 8 штаммов микроорганизмов.

Для тестирования были использованы суточные культуры 6 клинических изолятов *Staphylococcus aureus*: BC-1, BC-9, BC-12, BC-19; *Enterococcus faecalis* 35758, *E. faecium* 33 VAN-R. 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 и 48 часов. По истечении времени инкубации нами были изучены антибактериальные свойства спиртовых экстрактов из плодовых тел *S. commune*, 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 *S. commune*).

Для изучения бактерицидных свойств спиртовых экстрактов из плодовых тел *S. commune* 10 мкл содержимого из каждой лунки планшета после инкубации (A1-A12) переносили на сектор плотной питательной среды, поместив под чашку Петри шаблон для нанесения. Для каждой лунки использовали индивидуальные наконечники. Чашки подсушивали в термостате в течение 20 минут и маркировали, обозначив точку совмещения с шаблоном. Для каждого ряда планшета использовали отдельную чашу Петри. Чашки выдержат на столе 20 минут до полного впитывания капель в питательную среду, после

чего можно перевернуть чашки Петри и инкубировать в термостате 24 ч, при 35°C. Пользуясь, шаблоном оценивали микробиологическую эффективность спиртовых экстрактов из плодовых тел *S. commune*. Положительный результат (бактерицидный эффект) определялся отсутствием микробного роста в определенном секторе либо при наличии роста в нем не более 1 колонии микроорганизмов [15].

Результаты и их обсуждение. При изучении культуральных особенностей роста штаммов *S. commune* в чистой культуре было установлено, что штамм 248 относится к быстрорастущим (РК>100), остальные штаммы *S. commune* отличаются средней скоростью роста. На 5-е сутки РК варьировал от 59,6 (FIB-113) до 121,0 (FIB-248). Полное заращение чашки Петри наблюдалось на 6-7 сутки, за исключением FIB-113 – на 10 сутки. Выращивание посевного мицелия штаммов *S. commune* осуществляли на зерне овса. Штаммы 127 и 390 зерновой субстрат полностью колонизировали на 10-12 сутки, штаммы 113 и 248 – 24-26 сутки. Нами была изучена скорость роста вегетативного мицелия штаммов *S. commune* на субстрате из ольховых опилок и березовой стружки, обогащенных пшеничными отрубями. Блоки из березовой стружки обрастали данными культурами медленнее. Штаммы 127 и 390 осваивали ольховые опилки на 14-15 сутки, березовую стружку – на 19-21 сутки. Полная колонизация 0,7 кг блоков из ольховых опилок штамма 113 отмечена на 36-42 сутки, мицелием штамма 248 – на 28-31 сутки. Созревание 0,7 кг блоков из березовой стружки культурой 113 наблюдали на 45-48 сутки, культурой 248 – на 42-44 сутки. На 24 сутки после инокуляции созревшие субстратные блоки выставили в помещение для плодоношения. Для дыхания мицелия и для инициирования процесса плодообразования на пакетах с субстратными блоками делали по 6 вертикальных надрезов размером 2 см. У штаммов 113 и 248 плодообразование не выявлено. Вероятнее всего, культуры, переданные из ИМВ и БИМ, представляют собой монокариотический мицелий, полученный из спор. Монокариотические штаммы не способны к производству спорообразующих плодовых тел. Появление примордий штаммов 127 и 390 *S. commune* на субстрате с ольховыми опилками наблюдали на 22-23 сутки после инокуляции субстрата, с березовой стружкой начало плодоношения отмечалось на 29-30 сутки после инокуляции субстрата. Период созревания плодовых тел длился 5-6 суток от появления примордий до снятия грибов. Период плодоношения с одной волны независимо от штамма на блоках с ольховыми опилками составил 28 суток, с березовой стружкой – 35 суток. В ходе реализации полного цикла интенсивного культивирования штаммов *S. commune* проводили оценку урожайности и эффективности биоконверсии. Средняя урожайность штамма 127 на блоках массой 0,7 кг с использованием ольховых опилок составила 3,6%, штамма 390 – 4,8%. На блоках с березовой стружкой урожайность штамма 127 составила 10,5%, штамма 390 – 5,6%. Наибольшее количество плодовых

тел собрано на субстрате с березовой стружкой: 130 штук в среднем на блок по штамму 127 и 51 шт. у штамма 390; на блоках с ольховыми опилками этот показатель составил 42 и 39 штук соответственно. Средняя масса плодовых тел штамма 127 составила 0,6 г, штамма 390 – 0,8-0,9 г. Наиболее высокие показатели эффективности биоконверсии питательных компонентов субстрата показали штаммы 127 и 390 на блоках с березовой стружкой, биологическая эффективность варьировала от 15,6 (FIB-390) до 29,2% (FIB-127); на блоках с ольховыми опилками – от 9,5 (FIB-127) до 12,7% (FIB-390). Самый высокий коэффициент конверсии отмечен у FIB-127 на блоках с березовой стружкой (6,2%).

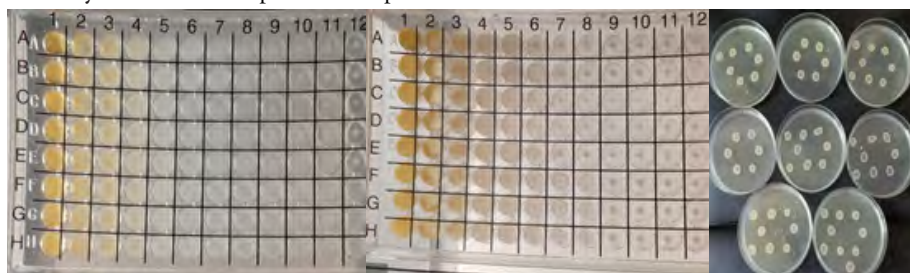
В ходе проведенного исследования были изучены антимикробные свойства спиртовых экстрактов, полученных из плодовых тел базидиальных грибов *S. commune*, культивированных на дубовых субстратных блоках. В таблице 1 отражены минимальные концентрации грибных спиртовых экстрактов, подавляющие рост тест-микроорганизмов.

Таблица 1. Минимальные концентрации грибных спиртовых экстрактов, подавляющие рост тест-микроорганизмов (мкг/мл).

Тест-микроорганизмы	<i>S. commune</i> штамм 127	<i>S. commune</i> штамм 390
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	310	1250*
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	310	625
<i>E. faecium</i> 33 VAN-R	625	1250
<i>E. faecalis</i> 35758	310*	1250
<i>S. aureus</i> BC-1	1250	1250
<i>S. aureus</i> BC-9	1250	1250
<i>S. aureus</i> BC-12	1250	1250
<i>S. aureus</i> BC-19	2500*	2500*

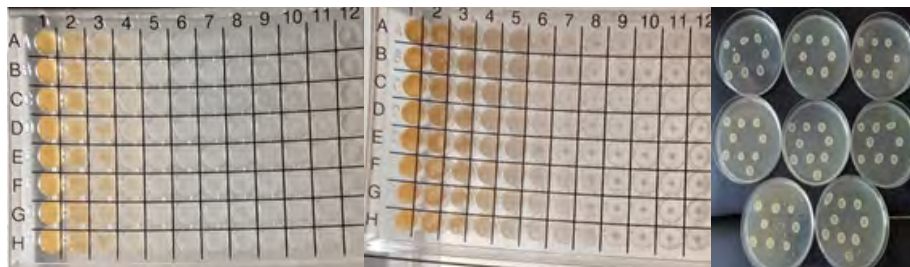
Примечание:* – данная концентрация грибного экстракта оказывает на тест-микроорганизмы бактериостатическое действие.

Результаты, представленные в таблице 1 свидетельствуют о том, что антимикробная активность спиртовых экстрактов из базидиом *S. commune* выше у штамма 127. Однако надо отметить, что грибные экстракты обоих штаммов эффективны в отношении *E. faecalis* VAN-R – МПК 1250. Спиртовые грибные экстракты штамма 127 лучше всего подавляют рост *E. faecalis* ATCC 51299, *E. faecalis* 35758, *S. aureus* ATCC 29213. Необходимо заметить, что лучше оценивать результат антимикробной активности грибных экстрактов на вторые сутки инкубации планшетов в термостате, т.к. на первые сутки результат не очень точный. Для определения МПК экстракта необходимо протестировать содержимое каждой лунки планшета, используя модифицированный метод тестирования бактерицидности экстрактов (рис.1, рис. 2).

Рисунок 1. МПК спиртовых экстрактов *S. commune* штамм 127.

первый день инкубации

второй день инкубации

Рисунок 2. МПК спиртовых экстрактов *S. commune* штамм 390.

первый день инкубации

второй день инкубации

Заключение. Установлено, что спиртовые экстракты из плодовых тел *S. commune*, культивированных на дубовых субстратных блоках обладают антимикробными свойствами в отношении 6 клинических изолятов *S. aureus*: BC-1, BC-9, BC-12, BC-19; *E. Faecalis* 35758, *E. Faceium* 33 VAN-R, *S. aureus* ATCC 29213, *E faecalis* ATCC 51299.

Список литературы

1. Флюк, М. Грибы / М. Флюк; [пер. с нем. В.В. Демина, А.П. Нагдасевой]. – Москва: Эксмо, 2022. – 416 с.
2. Miura, T. Failure in antitumor activity by overdose of an immunomodulating beta-glucan preparation, sonifilan / T. Miura, N.N. Miura, N. Ohno Biol. Pharm. Bull. 2000. – Vol. 23, № 2. – P. 249-53.
3. Zhong K. et al. Immunoregulatory and antitumor activity of schizophyllan under ultrasonic treatment International Journal of Biological Macromolecules. – 2015. – Vol. 80. – P. 302-308.
4. Jayakumar G.C. et al. Preparation and antimicrobial activity of scleraldehyde from Schizophyllum commune. Carbohydrate Research. – 2010. – Vol. 345, № 15. – P. 2213-2219.
5. Kukan M. et al. Effects of sizofiran on endotoxin-enhanced cold ischemia-reperfusion injury of the rat liver. Physiological Research. – 2004. – Vol. 53. – P. 431-43.
6. Zhang Y. et al. Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and

recent developments. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. – 2013. – Vol. 1. – P. 53-71.

7. Chen Z. et al. Characterization of physicochemical and biological properties of Schizophyllum commune polysaccharide extracted with different methods. International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 56. – P. 1425-1434.

8. Yelithao K. Studies on structural properties and immune-enhancing activities of glycomannans from Schizophyllum commune. You Carbohydrate Polymers. – 2019 – Vol. 218. – P. 37-45.

9. Komatsu N. Protective effect of schizophyllan, a polysaccharide of Schizophyllum commune, on bacterial infections of mice Jpn. J. Antibiot. – 1973. – Vol. 26, № 3. – P. 277-283.

10. De Roman M. The contribution of wild fungi to diet, income and health: A World Review. In book: Progress in Mycology. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. – P. 327-348.

11. Hobbs C.R. The chemistry, nutritional value, immunopharmacology, and safety of the traditional food of medicinal split-gill fungus Schizophyllum commune Fr.:Fr. (Schizophyllaceae). A literature review Int. J. of Medicinal Mushrooms. – 2005. – Vol. 7. – P. 127-140.

12. Трухоновец В.В. и соавт. Подбор оптимального субстрата для выращивания лекарственного гриба Schizophyllum commune Fr.: Fr. Наука о лесе XXI века: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию Ин-та леса НАН Беларуси, Гомель, 17-19 нояб. 2010 г. – Гомель: Ин-т леса НАН Беларуси, 2010. – С. 563-566.

13. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного. К: НД, 1988. – 144 с.

14. Дегтярёва Е.И. и соавт. Антимикробные и фунгицидные свойства ксилотрофных базидиомицетов, культивированных на растительных субстратах с добавлением микроудобрений Экологический Вестник Северного Кавказа. – 2021. – Т. 17. – № 2. – С. 28-37.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИЦЕЛИЯ ТРУТОВЫХ ГРИБОВ *FOMES FOMENTARIUS* S.S. И *F. INZENGAE* (POLYPORALES, AGARICOMYCETES)

Гарибян Н.Г, Бархударян А.Л., Бадалян С.М.

Ереванский государственный университет, Армения

В связи с возрастающим числом патогенов, устойчивых к антибиотикам Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) считает, что устойчивые противомикробные инфекции представляют большую угрозу для человечества. В частности, ESKAPE патогены (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.) со множественной лекарственной устойчивостью стали универсальными возбудителями инфекций у людей. Следовательно, профилактика и лечение бактериальных, а также грибковых и вирусных заболеваний остаются серьезной проблемой современной медицины.

Агарикомицеты, в частности трутовые грибы (порядок Polyporales) являются известными продуцентами различных биоактивных соединений с антимикробным действием [Badalyan et al., 2023]. Трутовик настоящий *Fomes*