

Т.А. КРУПОДЬОРОВА <sup>1</sup>, Н.А. БІСЬКО <sup>1</sup>,  
Н.Л. ПОЄДИНОК <sup>1</sup>, Н.Ю. МИТРОПОЛЬСЬКА <sup>1</sup>,  
Б.Ф. ВАСИЛЬЄВА <sup>2</sup>, О.В. ЄФРЕМЕНКОВА <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України  
вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 01601, Україна

<sup>2</sup> ДУ НДІ пошуку антибіотиків ім. Г.Ф. Гаузе РАМН  
вул. Велика Пироговська, 11, м. Москва, 119992, Росія

## АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *GANODERMA APPLANATUM* (PERS.: WALLR.) PAT. ТА *G. LUCIDUM* (CURT.: FR.) P. KARST. В УМОВАХ ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

*Ключові слова:* Ganoderma spp., глибинне культивування, антимікробна активність, тест-культури мікроорганізмів

Масове, у багатьох випадках невиправдане, використання антибіотиків спричинює виникнення та поширення досить стійких штамів патогенних мікроорганізмів. Великою проблемою є внутрішньолікарняні інфекції, зокрема найпоширеніші — стафілококові. У деяких клініках серед виділених стафілококів частота метицилін-резистентних (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — MRSA) штамів, як правило, стійких не лише до метициліну, а й інших бета-лактамних антибіотиків, досягає 80 % [1]. Проблема підвищення стійкості патогенних мікроорганізмів до лікарських препаратів робить актуальним пошук нових ефективних природних антибіотиків [2]. Останнім часом зростає увага до вищих базидіоміцетів як потенційних джерел біологічно активних речовин, у тому числі антибіотиків [6, 7, 12, 16].

У літературі наводяться результати визначення антимікробної активності естрактів плодових тіл [5, 8, 14, 15] і культуральної рідини [13] різних видів вищих базидіальних грибів. Опубліковані дані свідчать про активність видів роду *Ganoderma* (*G. lucidum*, *G. applanatum*, *G. oregonense*, *G. australe*) проти бактерій з родів *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* та *Escherichia coli* [5, 14, 16].

Нашою метою було тестування антимікробної активності штамів *G. applanatum* (Pers.: Wallr.) Pat. та *G. lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

### Матеріали та методи досліджень

Об'єктами дослідження були 13 штамів *G. applanatum* і 27 — *G. lucidum* з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України [3]. Для з'ясування антимікробної активності використовували 14 тест-культур з російської Колекції мікроорганізмів: *Bacillus subtilis* ATCC 6633,

© Т.А. КРУПОДЬОРОВА, Н.А. БІСЬКО, Н.Л. ПОЄДИНОК, Н.Ю. МИТРОПОЛЬСЬКА,  
Б.Ф. ВАСИЛЬЄВА, О.В. ЄФРЕМЕНКОВА, 2008

*B. mycoides* 537, *B. pumilis* NCTC 8241, *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, INA 00761, INA 00762, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ATCC 8461, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aspergillus niger* INA 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259, *Candida albicans* INA 00763. Гриби культивували у колбах з відбійниками об'ємом 500 мл (об'єм середовища — 100 мл) на качалці (80 об/хв, температура — 28 °С) на глюкозо-пептонному середовищі (рН 5,5) такого складу (г/л): глюкоза— 10, пептон — 3, дріжджовий екстракт — 0,02,  $K_2HPO_4$  — 1,  $KH_2PO_4$  — 1,  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  — 0,25,  $H_2O$  — 1 л. У колбу вносили інокулюм — сім сусло-агарових дисків діаметром 7 мм з міцелієм 7-добової культури. На 14-ту та 21-шу доби росту з кожної колби стерильно відбирали зразки (5 мл) культуральної рідини з дрібнодисперсною біомасою, яку відразу заморожували.

Антимікробну активність розморожених проб та їхніх екстрактів визначали за допомогою методу паперових дисків [4]. Для отримання екстрактів у проби вносили 0,5 об'єму етилацетату, струшували протягом години та залишали на добу за температури 4 °С. Етилацетатну фракцію відділяли та упарювали насухо. До залишку додавали 10 % водневого метанолу в кількості 1/10 від початкового об'єму проби. Після 10-кратної концентрації антимікробну активність проби визначали за відношенням до трьох грампозитивних штамів бактерій: *S. aureus* INA 00761 (MRSA — methicillin resistant *S. aureus*) — стійких до 32 мкг/мл оксациліну, *S. aureus* INA 00762 (MSSA — methicillin sensitive *S. aureus*) — стійких до 0,125 мкг/мл оксациліну, *B. subtilis* ATCC 6633, а також за відношенням до міцеліального гриба *A. niger* INA 00760.

## Результати досліджень та їх обговорення

Результати досліджень показали відсутність антимікробної активності зразків культуральної рідини з дрібнодисперсною біомасою 13 штамів *G. applanatum* та 27 штамів *G. lucidum* стосовно всіх використаних тест-культур.

Екстракти зразків усіх штамів *G. applanatum* та *G. lucidum* також не були активними проти *A. niger* INA 00760. Водночас ми виявили антибактеріальні речовини в екстрактах зразків 6 штамів *G. applanatum* та 8 — *G. lucidum*. За ступенем чутливості до метаболітів *Ganoderma* spp. (за винятком *G. lucidum* 1908) тест-культури бактерій утворюють такий ряд: *S. aureus* INA 00761 (MRSA) > *S. aureus* INA 00762 (MSSA) > *B. subtilis* ATCC 6633 (таблиця). Проти тест-штаму *S. aureus* INA 00761 (MRSA) відзначена 100 % активність усіх штамів *G. applanatum* та *G. lucidum*, 50 % штамів *G. applanatum* та 38 % штамів *G. lucidum* були активними проти *S. aureus* INA 00762 (MSSA), 17% штамів *G. applanatum* та 25% *G. lucidum* — проти *B. subtilis*. *G. lucidum* 1607 і 1903 утворюють сполуки, що добре дифундують в агаровому середовищі, проте вони не інгібують, а послаблюють ріст штаму *S. aureus* INA 00761 (MRSA) (таблиця).

М. Семерджієва та Я. Васельський [13] вивчали антибіотичну активність 338 видів базидіоміцетів, і в аналогічних умовах росту виявили 16-міліметрову зону інгібування росту *B. subtilis* грибом *G. applanatum*. Ми отримали подібні

Антибактеріальна активність екстрактів зразків штамів *G. applanatum* та *G. lucidum*

Штам	Тривалість культивування, доби	Діаметр зони інгібування росту тест-культур, мм			
		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	
		methicillin resistant	methicillin sensitive		
<i>G. applanatum</i>					
1552	14	15	14	10	
	21	—	—	—	
1530	14	14	10	—	
	21	—	—	—	
1898	14	—	—	—	
	21	9	9	—	
1672	14	12	—	—	
	21	13	—	—	
1701	14	—	—	—	
	21	15	—	—	
1553	14	16	—	—	
	21	14	—	—	
<i>G. lucidum</i>					
1908	14	10	10	16	
	21	—	—	—	
1905	14	—	—	—	
	21	12	12	9	
1912	14	—	—	—	
	21	10	10	—	
1670	14	16	—	—	
	21	—	—	—	
1889	14	13	—	—	
	21	—	—	—	
1903	14	—	—	—	
	21	(14)	—	—	
1607	14	(14)	—	—	
	21	—	—	—	
1910	14	11	—	—	
	21	—	—	—	

П р и м і т к и: «—» — антибактеріальна активність не виявлена; у дужках вказано діаметр зони послабленого росту тест-культур.

результати щодо інгібування росту *B. subtilis* штамом *G. applanatum* 1552 (таблиця). Активність плодових тіл корелює з такою у культурі, тому ступінь інгібування росту *S. aureus* дослідженими нами штамми *G. applanatum* та *G. lucidum* аналогічна антибактеріальній активності таких афілофоральних

грибів, як *Daedalea confragosa* (Bolton) Pers., *Gleophyllum sepiarium* (Wulfen) P. Karst., *Serpula lacrymans* (Wulfen) J. Schrot, *Schizophyllum commune* Fr. [13]. Зони інгібування росту *B. subtilis* протестованими нами штамми *G. applanatum* та *G. lucidum* мали розміри, подібні отриманим в експериментах з *Coriolum hirsutus* (Wulfen) Pat., *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bond et Sing, *Gleophyllum saeparium* (Wulfen) P. Karst., *Merulius minor* Falck [5].

Порівнюючи антибіотичну активність штамів обох досліджених видів *Ganoderma* в обраних умовах культивування, слід виділити штами *G. applanatum* 1552, *G. lucidum* 1908 і 1905, з найширшим спектром антимікробної активності (таблиця). Однак більшість штамів (1553, 1672, 1701, 1910, 1670, 1889) були ефективними лише щодо одного тест-штаму *S. aureus* INA 00761 (MRSA). Чіткої міжвидової різниці за ступенем і спектром антимікробної активності у протестованих нами штамів не відзначено. Проте у відсотковому співвідношенні антибактеріальна активність характерна для 46 % штамів *G. applanatum* та 30 % штамів *G. lucidum*.

Деякі автори [5, 13] вважають необхідним тривале поверхнєве чи глибинне культивування вищих базидіальних грибів для утворення антибіотиків. Ми відзначаємо аналогічну тенденцію лише для деяких штамів *G. applanatum* та *G. lucidum*. Так, подовження експозиції культивування до 21 доби сприяло прояву антимікробної активності у 33 % штамів *G. applanatum* та 38 % — *G. lucidum*. І, навпаки, тривале культивування (до 21-єї доби) пригнічувало антибіотичну активність у 33 % штамів *G. applanatum* та 62 % — *G. lucidum*. Водночас активність 33 % штамів *G. applanatum* на 14-ту та 21-шу доби росту була майже однаковою (таблиця).

За спектром антимікробної дії досліджені нами штами можна розподілити на 3 групи: штами *G. applanatum* 1552 та *G. lucidum* 1908, 1905 пригнічують ріст усіх трьох тест-бактерій, штами *G. applanatum* 1530 та *G. lucidum* 1898, 1912 — двох тест-культур, решта культур (*G. applanatum* 1672, 1701, 1553 та *G. lucidum* 1670, 1889, 1903, 1607, 1910) — лише однієї тест-бактерії (таблиця). Слід відзначити штам *G. lucidum* 1908 — активніший до *B. subtilis*, ніж до стафілококів. Особливості прояву антибактеріальної активності пов'язані, можливо, з біосинтезом антибактеріальних сполук різної хімічної природи.

Відомо, що антибактеріальні властивості грибів можуть зумовлюватися утворенням у процесі росту органічних кислот [9, 11], тритерпеноїдів, стероїдів [10, 16]. В обраних нами умовах культивування на 14-ту і 21-ту доби рН культуральної рідини становила 6,0, за винятком штаму *G. lucidum* 1908 — рН 7,0. Ці рівні рН не є бактерицидними щодо тест-культур, тому прояв антибактеріальної активності в наших дослідах пов'язаний, вірогідно, з синтезом тритерпеноїдів та/чи стероїдів і не залежить від біосинтезу органічних кислот.

Отже, одержані нами результати доводять наявність антимікробної активності у досліджених штамів *G. applanatum* та *G. lucidum* з Колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

## Висновки

Протестовано антимікробну активність зразків культуральної рідини з дрібнодисперсною біомасою і зразків їх екстрактів 13 штамів *G. applanatum* та 27 — *G. lucidum* щодо тест-культур мікроорганізмів. Антигрибна активність стосовно *A. niger* не виявлена як у зразках культуральної рідини з дрібнодисперсною біомасою цих культур, так і в їхніх екстрактах. В обраних умовах культивування антибактеріальні речовини утворювалися лише в екстрактах зразків шести штамів *G. applanatum* та восьми — *G. lucidum*. Штами *G. applanatum* 1552 і *G. lucidum* 1908 були найактивнішими проти *meticillin sensitive S. aureus* (стійкий до 0,125 мкг/мл оксациліну), *meticillin resistant S. aureus* (стійкий до 32 мкг/мл оксациліну) та *B. subtilis*.

1. Васильева Е.И., Соколова В.И. К проблеме грибковой инфекции // Успехи мед. микол. / Под ред. Ю.В.Сергеева.— М.: Нац. акад. микол., 2003. — 2. — С. 284.
2. Дудник Ю.В. Перспективы создания препаратов, активных в отношении устойчивых форм бактерий // Антибиотики и химиотерапия. — 1999. — 4, № 12. — С. 15—18.
3. Каталог культур Колекції шапинкових грибів (ІВК) / А.С. Бухало, Н.Ю. Митропольська, О.Б. Михайлова. — К.: Ін-т ботан. ім. М.Г. Холодного НАНУ, НВФ «Славутич-дельфін», 2005. — 36 с.
4. Методы экспериментальной микологии/ Под ред. В.И. Билай. — Киев: Наук. думка, 1982. — С. 274—275.
5. Шверина А.Н., Низковская О.П., Фалина Н.Н и др. Биосинтетическая активность высших грибов. — Л.: Наука, 1969. — С. 96—100.
6. Anke T. Basidiomycetes: A source for new bioactive secondary metabolites from bioactive secondary metabolites Bioactive metabolites from microorganisms / Ed. by Bushell M.E. and Grafe U. — Amsterdam: Elsevier, 1989. — P. 51—77.
7. Berdy J. Bioactive microbial metabolites // J. Antibiot. — 2005. — 58, № 1. — P. 1—26.
8. Dighe S., Agate A.D. Antibacterial activity of some indian mushrooms / Int. J. Med. Mushr. — 2000. — 2. — P. 141—150.
9. Gadd G.M. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes // Advances in Microbial Physiology. — 1999. — 41. — P. 47—92.
10. Lehmkuhl G. A., Smania A. Jr, Monache F. D. et al. Triterpenes and Sterols from *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. (Aphyllphoromycetidae) // Int. J. Med. Mushr. — 2000. — 2. — P. 303—311.
11. Loewus F.A. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi // Phytochemistry. — 1999. — 52. — P. 193—210.
12. Lui G.-T. Recent advances in research of pharmacology and clinical applications of *Ganoderma* P. Karst. species (Aphyllphoromycetidae) in China // Int. J. Med. Mushr. — 1999. — 1. — P. 63—67.
13. Semerdžieva M., Veselsky J. Lěčive houby dřívě a nyní — Praha: Academia praha, 1986. — P. 138—142.
14. Smania A., Monache F. D. et al. Antibacterial Activity of Basidiomycetes // Int. J. Med. Mushr. — 2001. — 3. — P. 87.
15. Tsvetkova I., Naydenski H., Petrova A. et al. Antibacterial activity of some bulgarian higher basidiomycetes mushrooms // Int. J. Med. Mushr. — 2006. — 8. — P. 63—66.
16. Wasser S., Weis A. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (Review) // Int. J. Med. Mushr. — 1999. — 1. — P. 31—62.

Рекомендує до друку  
А.С. Бухало

Надійшла 03.12.2007

Т.А. Круподерова <sup>1</sup>, Н.А. Бисько <sup>1</sup>, Н.Л. Поединок <sup>1</sup>, Н.Ю. Митропольская <sup>1</sup>,  
Б.Ф. Васильева <sup>2</sup>, О.В. Ефременкова <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев, Украина

<sup>2</sup> ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН,  
г. Москва, Россия

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *GANODERMA APPLANATUM* (PERS.: WALLR.) PAT. И *G. LUCIDUM* (CURT.: FR.)  
P. KARST. В УСЛОВИЯХ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Протестирована антимикробная активность образцов культуральной жидкости с мелко-дисперсной биомассой и их экстракты 13 штаммов *G. applanatum* и 27 штаммов *G. lucidum* по отношению к тест-культурам. Антигрибная активность против до *A. niger* у вышеперечисленных культур не установлена ни в образцах культуральной жидкости с мелкодисперсной биомассой, ни в их экстрактах. В данных условиях культивирования образование антибактериальных веществ выявлено только в экстрактах образцов 6 штаммов *G. applanatum* и 8 штаммов *G. lucidum*. Для штамма *G. applanatum* 1552 и штамма *G. lucidum* 1908 установлена наибольшая антимикробная активность против *meticillin sensitive S. aureus* (устойчивый к 0,125 мкг/мл оксациллина), *meticillin resistant S. aureus* (устойчивый к 32 мкг/мл оксациллина) и *B. subtilis*.

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* *Ganoderma* spp., глубинное культивирование, антимикробная активность, тест-культуры микроорганизмов.

Т.А. Krupodyorova <sup>1</sup>, N.A. Bisko <sup>1</sup>, Poedinok N.L. <sup>1</sup>, Mitropolskay N.Ju. <sup>1</sup>,  
B.F. Vasiljeva <sup>2</sup>, O.V. Efremenkova <sup>2</sup>

<sup>1</sup> M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences, Kyiv

<sup>2</sup> Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *GANODERMA APPLANATUM*  
(PERS.: WALLR.) PAT. AND *G. LUCIDUM* (CURT.: FR.)  
P. KARST. STRAINS IN THE SUBMERGED CONDITIONS

Antimicrobial activity of *G. applanatum* (13 strains) and *G. lucidum* (27 strains) tested in the samples of culture liquid with biomass and in their extracts on test-cultures. Antifungal activity of all investigated strains against *A. niger* in the samples of culture liquid and in their extracts has not been found. Antibacterial activity was determined only in extracts of 6 strains of *G. applanatum* and of 8 strains of *G. lucidum*. Antimicrobial activity against *meticillin-sensitive S. aureus* (resistant to 0.125 mkg/ml oxacillin), *meticillin-resistant S. aureus* (resistant to 32 mkg/ml oxacillin) and *B. subtilis* was demonstrated for strains of *G. applanatum* 1552 and *G. lucidum* 1908.

*К e y w o r d s:* *Ganoderma* spp., submerged cultivation, antimicrobial activity, test-cultures of microorganisms.