

48
1225

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

Дипломна робота

спеціаліста

на тему: «Антагоністична активність макроміцетів щодо
умовно-патогенних бактерій»

«The antagonistic activity of macromycetes towards opportunistic bacteria»

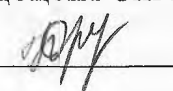
Виконала: студентка денної форми
навчання

Спеціальності 7.04010202

Мікробіологія

Проданець Наталія Михайлівна

Керівник: к.б.н., доцент Зінченко

Оксана Юріївна 

Рецензент: к.б.н., доцент

Мірось Світлана Леонідівна

Рекомендовано до захисту:

Протокол засідання кафедри

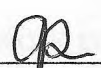
№ 11 від 21.04 2016р.

Захищено на засіданні ЕК № 1

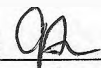
протокол № 19 від 31.05 2016 р.

Оцінка Вірн. / A / 92
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бали)

Завідувач кафедри

 Філіпова Т. О.
(підпис)

Голова ДЕК

 Філіпова Т. О.
(підпис)

Одеса – 2016

779429

Анотація

Проведено вивчення антагоністичної активності міцелію макроміцетів *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus* щодо умовно-патогенних бактерій та дріжджоподібних грибів *C. albicans*, а також впливу фрагментів плодових тіл, спиртових і водних екстрактів плодових тіл грибів на ріст тест-мікроорганізмів. Показано, що в присутності фрагментів плодових тіл гриба *L. edodes* спостерігається значне пригнічення росту *B. subtilis* та *S. aureus*. Виявлено, що фрагменти плодових тіл *P. ostreatus* пригнічують ріст *E. coli*. Установлено, що міцелій *L. edodes* є активним антагоністом *P. vulgaris*, *C. albicans*, *B. subtilis*, *E. faecalis*. Міцелій *P. ostreatus* пригнічує ріст *P. aeruginosa*, *M. luteus*, а також *P. vulgaris* і *E. faecalis*. Міцелій *G. lucidum* є активним антагоністом *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* та *M. luteus*. Виявлено пригнічення водними екстрактами росту *L. edodes* наступних мікроорганізмів – *M. luteus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Водні екстракти *P. ostreatus* пригнічують ріст *E. coli*. Установлено, що спиртовий екстракт *L. edodes* пригнічує ріст грампозитивних бактерій *M. luteus*, *B. subtilis*, *S. aureus*.

Роботу викладено на 46 сторінках, вона містить 3 таблиці та 5 рисунків. Наведено посилання на 40 джерела літератури (29 кирилицею та 11 латиницею).

Ключові слова: антагоністична активність, антимікробна дія, метаболіти, макроміцети.

The antagonistic activity of macromycetes *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus* on opportunistic bacteria and yeast fungi *C. albicans*, and the impact of fragments of fruiting bodies, spirit and water extracts of fruiting bodies of the fungus growth on the test microorganisms has been studied. It was shown that in presence of fragments of fruiting bodies of the fungus *L. edodes* significant inhibition of growth *B. subtilis* and *S. aureus* was observed. It was revealed that pieces of fruit bodies of *P. ostreatus* inhibit the growth of *E. coli*. *L. edodes* mycelium was active antagonist against *P. vulgaris*, *C. albicans*, *B. subtilis*, *E. faecalis*. The mycelium of *P. ostreatus* inhibits the growth of *P. aeruginosa*, *M. luteus*, and *P. vulgaris* and *E. faecalis*. *G. lucidum* mycelium is an active antagonist of *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* and *M. luteus*. Metabolites from aqueous extracts of *L. edodes* effectively inhibited microorganisms *M. luteus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Metabolites from aqueous extracts of *P. ostreatus* inhibit the growth of *E. coli*. It was found out that metabolites of alcohol extract of *L. edodes* actively inhibit the growth of gram-positive bacteria *M. luteus*, *B. subtilis*, *S. aureus*.

The work is expanded on 46 pages, it contains 3 tables and 5 figures. The work contains links to 40 sources of literature (29 Cyrillic and 11 Latinic).

Key words: antagonistic activity, antimicrobial action, metabolites, macromycetes.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Біологічна активність вищих грибів.....	7
1.2. Біологічно активні речовини грибів.....	10
1.3. Первинні метаболіти грибів.....	10
1.4. Вторинні метаболіти грибів.....	11
1.5. Стимулятори росту.....	12
1.6. Вітаміни.....	13
1.7. Антибіотики, що утворюються грибами.....	14
1.7.1. Антибіотики, що утворюються нижчими грибами.....	15
1.7.2. Антибіотики, що утворюються вищими грибами.....	19
1.8. Чутливість бактерій до речовин, виділених з грибів.....	23
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	26
2.1. Місце та матеріали дослідження.....	26
2.2. Визначення впливу фрагментів плодових тіл грибів на ріст умовно-патогенних мікроорганізмів.....	27
2.3. Визначення антагоністичної активності міцелію грибів методом радіальних штрихів	28
2.4. Оцінка впливу водних та спиртових екстрактів грибів на ріст тест-штамів.....	29
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	30
3.1. Дослідження впливу фрагментів плодових тіл грибів щодо тест-штамів.....	30
3.2. Антагоністична активність грибів при сумісному культивуванні з тест-штамами.....	31
3.3. Вплив водних та спиртових екстрактів плодових тіл на ріст тест-мікроорганізмів.....	34
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	40
ВИСНОВКИ.....	42
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	43

ВСТУП

Ретроспективна оцінка подій у XX ст. після зародження антимікробної хіміотерапії дозволяє вважати це століття свого роду першим раундом, котрий проходив спочатку з перевагою творців антимікробних препаратів, а потім у рівній боротьбі людини з патогенними мікроорганізмами, за якої майже на кожен новий хіміотерапевтичний препарат у них знаходилась (правда, через кілька років) нейтралізуюча відповідь; іноді ж патогени, образно кажучи, взагалі перехоплювали ініціативу – загальновідомий приклад з туберкульозною інфекцією [29].

Задовго до початку ери антибіотиків біологічно активні вторинні метаболіти, що утворюються мікроорганізмами як зброя в боротьбі за існування, були частиною природної екосистеми. Зрозуміло, що в існуючих екологічних нішах в процесі еволюції мікроорганізми і, перш за все, продуценти антибіотиків, щоб уникнути самознищення, мали сформувати механізми стійкості. Безсумнівно, що широке застосування антибіотиків надає селективного поштовху, що сприяє поширенню стійких штамів мікроорганізмів [2].

В даний час у вітчизняній та світовій науці спостерігається підвищений інтерес до вивчення грибів. Це пов'язано, насамперед, з кардинальним переглядом значущості та унікальності екологічних функцій, що контролюють гриби в природних екосистемах. По-друге, гриби були і залишаються одним з основних і перспективних об'єктів біотехнології [13].

Утворення антибіотиків грибами, як і іншими організмами, має еволюційно пристосований характер і тісно пов'язане з загальними процесами метаболізму грибів у природі і при культивуванні. Це дозволяє припустити, що в збереженні обмежено розповсюджених видів утворення антибіотиків відіграє певну роль в біології грибів. Допустимо й інше припущення, що утворення антибіотиків широко розповсюдженими видами грибів, що мають вузький спектр дії, може бути корисно грибу у певних

екологічних умовах, при пошкодженні певних субстратів. Виникнення здатності утворювати антибіотики їх та роль у біології видів-продуцентів у природі обумовлені багатьма факторами і біологічними особливостями грибів-продуцентів [29].

З іншого боку, велика пластичність грибів і мінливість процесів їх метаболізму в залежності від умов культивування дозволяє спрямовано регулювати біосинтез конкретних антибіотиків, які зазвичай в природних умовах не утворюються [15].

Антибіотики – специфічні продукти життєдіяльності деяких видів грибів, які затримують або повністю пригнічують ріст інших видів мікроорганізмів. У перекладі з грецького назва означає «проти життя». Отже, антибіотики – це речовини, що володіють токсичною дією їх продуцентів, які володіють отруйною здатністю по відношенню до інших мікроорганізмів. Тому антибіотики можна вважати токсинами бактерій та інших мікроорганізмів. Поняття антибіотиків не є точним, тому що відомі багато антибіотиків, які володіють токсичною дією на організм людини і тварин [2].

Зростає увага дослідників до проблеми резистентності мікроорганізмів до антибіотиків, яка стає одним з факторів, що призводять до стримування широкого використання антибіотиків в медичній практиці. Відповідно розробляються різні підходи для практичного застосування цих лікарських засобів, що сприяють зниженню виникнення стійких форм. До їх числа можна віднести комбіновану антибіотикотерапію, розумне підвищення лікувальних доз, скорочення термінів лікування хворих одним і тим же антибіотиком, періодичну заміну одного препарату іншим, застосування ліпосомальних та інших форм антибіотиків. Не зменшується інтерес дослідників і практиків до хімічної та біологічної модифікації широко відомих і нових антибіотиків, що дає можливість отримувати найбільш ефективні в порівнянні з природними сполуки. Одним з напрямків пошуку нових природних антибіотиків є вивчення видів, що раніше не розглядались

як можливі продуценти антибіотиків [8]. Традиційно як продуценти антибіотичних сполук розглядалися нижчі гриби, однак в останні десятиріччя спостерігається зростаючий інтерес до вивчення біологічної активності метаболітів вищих грибів.

Метою даної роботи було визначення впливу макроміцетів на ріст умовно-патогенних мікроорганізмів.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Визначити вплив тканин плодових грибів на ріст умовно-патогенних бактерій та дріжджоподібних грибів.
2. Дослідити вплив вегетативного міцелію макроміцетів на ріст тест-мікроорганізмів.
3. Дослідити вплив водних та спиртових екстрактів плодових тіл грибів на ріст тест-мікроорганізмів.
4. Порівняти антимікробну активність плодових тіл, міцелію та екстрактів грибів.

Об'єкт дослідження – біологічно активні метаболіти вищих грибів.

Предмет дослідження – антимікробна активність лікарських грибів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Сьогодні спостерігається зростаючий інтерес до отримання біологічно активних сполук з вищих грибів. На сьогодні відома наявність у метаболітів грибів різних типів біологічної активності, серед яких гепатопротекторна, антиоксидантна, протизапальна, антивірусна та бактерицидна, а також онкопротекторна та протипухлинна дія. Крім того, у деяких сполук, отриманих з грибів, виявлена здатність до зниження рівня холестерину та глюкози в кров'яному руслі [1].

Нами досліджено антагоністичну активність п'яти грибів – *G. lucidum*, *P. ostreatus*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *H. erinaceus* – щодо умовно-патогенних бактерій та дріжджоподібних грибів.

Установлено, що в присутності фрагментів плодових тіл гриба *L. edodes* спостерігається значне пригнічення росту грампозитивних бактерій *B. subtilis* та *S. aureus*. Виявлено, що фрагменти плодових тіл *P. ostreatus* пригнічують ріст *E. coli*.

Установлено, що вегетативний міцелій *L. edodes* є активним антагоністом *P. vulgaris*, *C. albicans*, *B. subtilis*, *E. faecalis*. Міцелій *P. ostreatus* пригнічує ріст *P. aeruginosa*, *M. luteus*, а також *P. vulgaris* і *E. faecalis*. При сумісному культивуванні міцелію *G. lucidum* з умовно-патогенними мікроорганізмами також спостерігається антагоністична дія відносно *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* та *M. luteus*.

Виявлено пригнічення росту метаболітами водних екстрактів *L. edodes* наступних мікроорганізмів – *M. luteus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Метаболіти водних екстрактів *P. ostreatus* пригнічують ріст *E. coli*.

Установлено, що метаболіти спиртового екстракту *L. edodes* активно пригнічують ріст грампозитивних бактерій *M. luteus*, *B. subtilis*, *S. aureus*.

Отримані результати свідчать про перспективність подальшого вивчення антагоністичної дії *G. lucidum*, *P. ostreatus*, *L. edodes*, *F. velutipes*,

H. erinaceus щодо розширеного спектру мікроорганізмів, а також про доцільність порівняння активності екстрактів, отриманих за допомогою різних методів.

ВИСНОВКИ

1. В присутності фрагментів плодових тіл гриба *L. edodes* спостерігається значне пригнічення росту грампозитивних бактерій *B. subtilis* та *S. aureus*. Виявлено, що фрагменти плодових тіл *P. ostreatus* пригнічують ріст *E. coli*.
2. Вегетативний міцелій *L. edodes* виявився активним антагоністом *P. vulgaris*, *C. albicans*, *B. subtilis*, *E. faecalis*. Вегетативний міцелій *P. ostreatus* пригнічує ріст *P. aeruginosa*, *M. luteus*, а також *P. vulgaris* і *E. faecalis*. Міцелій *G. lucidum* є активним антагоністом *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* та *M. luteus*.
3. Водні екстракти *L. edodes* пригнічують ріст наступних мікроорганізмів – *M. luteus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Спиртові екстракти *L. edodes* активно пригнічують ріст грампозитивних бактерій: *M. luteus*, *B. subtilis*, *S. aureus*. Водний екстракт *P. ostreatus* пригнічує ріст *E. coli*.
4. Міцелій грибів *L. edodes*, *P. ostreatus*, *G. lucidum* проявляє найбільшу антимікробну активність щодо умовно-патогенних бактерій та дріжджоподібних грибів, у порівнянні з фрагментами плодових тіл, спиртовими та водними екстрактами даних грибів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аниськина В. К., Шкондина Н. А. Грибная биотехнология в медицине. – М.: Национальная академия микологии, 2001. – С. 21-45.
2. Алиханян С.И. Антибиотики. – М.: Мир, 2000. – С. 59-63, 71-72.
3. Белова Н.В. Природа биологической активности высших грибов. – М.: Национальная Академия Микологии, 2000. – С. 5.
4. Билай В.И. Основы общей микологии. – Киев: Высшая школа, 1989. – 392 с.
5. Быкова В. А., Данилина М. В. Биотехнология лекарственных средств. – М.: Медбиозкономика, 1991. – С. 105-108.
6. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка, 1988. – 176 с.
7. Бухман В. М., Исакова Е. Б., Антимонова А. В., Белицкий И. В., Либензон А.В., Краснопольская Л. М. Изучение противоопухолевых свойств мицелия лекарственного гриба *Ganoderma lucidum* (Рейши) (Curt.: Fr) P. Karst. в опытах in vivo // Успехи медицинской микологии / Под ред. Ю. В. Сергеева. – М. : Национальная Академия Микологии, 2015. – 504 с.
8. Денисова Н.П. Лечебные свойства грибов. Этномикологический очерк. Санкт-Петербург: СПбМУ, 1998. – 60 с.
9. Дьяков Ю.Т. Введение в альгологию и микологию. – М.: Изд. МГУ, 2000. – 192 с.
10. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Изд. МГУ, 2004. – С. 73-78.
11. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. Биотехнология. – М.: Высшая школа, 1987. – С. 15-25.
12. Ершова Е.Ю., Тихонова О.В., Лурье Л.М. Антимикробная активность штаммов *Laetiporus sulphureus* в условиях глубинного культивирования // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48. – С. 18-22.

13. *Елинов Н.П.* Основы биотехнологии. – Издательская фирма «Наука», СПб, 1995. – С. 61-73.
14. *Желдакова Р. А.* Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов. – Учебно-методический комплекс. – Минск, 2005. – С. 29 – 50.
15. *Захаров И.А., Касперавичюс М.М.* Грибы в мифах и обрядах. Краткий очерк этномикологии // Микологии и фитопатология. – 1981. – Т. 15, № 1. – С. 66-72.
16. *Иващенко А.В.* Обратный скрининг и перспективы разработки инновационных лекарственных брендов // Фарма 2020. Проблемы и перспективы. – 2001. – С. 48-56.
17. *Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2001. – 260 с.
18. *Мильчук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А.* Биотехнология. – Київ: Поліграфконсалтинг, 2003. – 250 с.
19. *Навашин С.М., Фомина И.П.* Рациональная антибиотикотерапия. Антибиотики: клиническая фармакология. – Смол.: изд. Амипресс, 1994. – 208 с.
20. *Саакян К.Р., Ващенко К.Ф., Дармограй Р.Э.* Чага (черный березовый гриб) // Провизор. – 2004. – №16. – С. 21-25.
21. *Сафронова М.А., Титова Л.В. Феликсова Л.В.* Антибиотическая активность грибов // Детские инфекции. – 2007. – Т.6, №2. – С. 60-62.
22. *Смирнов И.В.* Новые подходы к оптимизации терапии инфекций // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т. 6. – С. 10-21.
23. *Тадаши Г., Мелик-Оганджян Р.Г., Мнацаканян В.А.* Изучение и использование свойств гриба *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. в

- современной медицинской практике // Альтернативная медицина. – 1998. – №1. – С. 29-36.
24. Тартаковский И.С. Современные подходы к антимикробной терапии // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – Т. 2, №10. – 2000. – С. 28-34.
25. Филиппова И.А. Лекарство нового тысячелетия. Грибы против рака. – Санкт-Петербург: Изд. «Диля», 2003. – 160 с.
26. Хмелев К. Ф., Афанасьев А. А. Биоразнообразие и экологические особенности базидиальных макромицетов. – Воронеж: Изд. ВГУ, 2000. – С. 122-125.
27. Шестакова И.В., Ющук Н.Д. Инфекционные заболевания и их проявления в полости рта // Инфекционные болезни. – 2006. – Т. 4, №3. – С. 78-86.
28. Шариков А.М. Исследования антибактериальной активности метаболитов некоторых высших грибов // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 6. – С. 128-129.
29. Яковлева Е.П. Микробная биотехнология: Методическое пособие к лабораторным работам для студентов факультета промышленной технологии лекарств. – СПб: Изд. СПХФА, 2000. – С. 32-39.
30. Bao X.F., Zhen Y., Ruan L., Fang J.N. Purification, characterization, and modification of T-lymphocyte-stimulating polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2002. – Vol. 50, № 5. – P. 623-629.
31. Choquer M., Dekkers K.A. The *CTB1* gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporin biosynthesis and fungal virulence of *Cercospora nicotianae* // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2005. – V. 7. – P. 468-476.

32. Calvo A.M., Wilson R.A., Bok J.W. Relationship between secondary metabolism and fungal development // Microbiol Mol Biol Rev. – 2002. – 447 p.
33. Krystyna Skalicka-Woźniak. Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. strains cultivated on different wood type substrates // Published by Polish Botanical Society. – 2012. – P. 18.
34. Lyndal M.R. Australian *Ganoderma*: identification growth and antibacterial properties / Submitted in total fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy. – July 2004. – P. 2-12, 28-36, 137 -177.
35. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement. – M100-S9, 1999. – V.19, N. 1. – 38 p.
36. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive document // Clin Microbiol Infect. – 1998. – V. 4. – P. 291-296.
37. Prasad Y. Antibacterial activity of the bio-multidrug (*Ganoderma lucidum*) on multidrug resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // Advanced biotechnology. – 2008. – P. 10.
38. Sadaf Quereshi. Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts // People's Journal of Scientific Research. – Vol.3. – №1. – 2010. – P. 9-10.
39. Shah A.J., Tilburn J., Adlard M.W. pH regulation of penicillin production in *Aspergillus nidulans* // FEMS Microbiol Lett. – 2006. – V. 41. – P. 209-212.
40. Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review) // International Journal of Medicinal Mushrooms. – Vol. 1. – P. 31-62.

20.04.2016 