

Я.І. Савчук, К.С. Циганенко, О.М. Зайченко

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

АНТИБІОТИЧНА АКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ МІКРОМІЦЕТІВ

*Досліджена біологічна активність очищених екстрактів із культуральних фільтратів штамів *Aspergillus niveus* 2411, *Myrothecium cinctum* 910, *Ulocladium consortiale* 960, *Penicillium* sp. 10-51 щодо широкого кола тест-культур. Одержані результати засвідчують високу активність екстрактів щодо грампозитивних бактерій, зокрема досліджуваних представників р. *Bacillus*. Менш активними виявились екстракти грибів щодо грамотрибульних організмів. В той же час, метаболіти *M. cinctum* 910, *Penicillium* sp. 10-51 проявляли високу антибіотичну активність щодо фітопатогенних бактерій.*

*Екстракти грибів проявляли фунгістатичну дію щодо дріжджів, і були малоактивними щодо міцеліальних грибів. Так, екстракти *A. niveus* 2411 та *Penicillium* sp. 10-51 пригнічували ріст *Phoma betae*. Найбільш активними виявились метаболіти *M. cinctum* 910, які проявляли фунгістатичну дію щодо представників р. *Aspergillus* та фітопатогенних ізолятів *Fusarium lactis*, *Rhizoctonia solani* та *Botrytis cinerea*.*

К л ю ч о в і с л о в а: мікроміцети, метаболіти, біологічна активність, фітопатогенні мікроорганізми.

З часів відкриття Флемінгом пеніциліну мікроскопічні гриби залишаються найбільш перспективною групою мікроорганізмів – продуцентів біологічно активних речовин. Традиційно, антибіотики посідають чільне місце серед всього загалу практично важливих речовин, які завдяки широкому спектру дії мають перспективу використання в терапії бактеріальних інфекцій.

Поряд із медичною практикою, антибіотики знайшли своє місце в агропромисловому комплексі як засоби боротьби з фітопатогенними організмами. Актуальним залишається пошук засобів боротьби з міцеліальними та дріжджоподібними грибами, які проявляють резистентність до антибактеріальних засобів і здатні завдавати значної шкоди як здоров'ю людини, так і сільськогосподарським угіддям.

Слід зазначити, що постановка роботи з пошуку нових біологічно активних речовин є і залишається однією з пріоритетних, а мікроскопічні гриби – однією з найбільш перспективних груп мікроорганізмів.

Раніше нами [4, 5] був виконаний системний скринінг антибіотичних, фунгіцидних та фітотоксичних активностей широкого загалу мікроміцетів. За результатами скринінгу було відібрано 4 найбільш активних штами. Надалі дослідження фітотоксичної активності цих штамів щодо значного кола рослин підтвердили їх широкий спектр біологічних активностей і необхідність подальших досліджень.

З огляду на викладене, подальша робота проводилась на рівні очищених екстрактів з культуральних фільтратів з використанням ширшого кола тест-організмів. Поряд із цим, ми сподіваємось на розширення спектра біологічних активностей, які проявлялись на рівні культуральних фільтратів.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були екстракти з культуральних фільтратів активних штамів мікроміцетів (*Aspergillus niveus* 2411 Blochwitz, *Myrothecium cinctum* 910 (Corda) Sacc., *Ulocladium consortiale* 960 (Thüm.) E.G. Simmons, *Penicillium* sp. 10-51).

Екстракт отримували шляхом триразової екстракції з культурального фільтрату активних сполук хлороформом у співвідношенні 4:1.

Далі отриманий екстракт упарювали і попередньо очищали від білків (осадження 10 % розчином ацетату свинцю), проводили обезжирення (рідина-рідинний перерозподіл н-гексан:ацетонітрил) та депігментацію (адсорбція активованим вугіллям).

Антибіотичну активність екстрактів визначали загальноприйнятим методом дисків [3]. Висновок про активність робили за наявністю чи відсутністю зон затримки росту тест-організмів навколо дисків.

© Я.І. Савчук, К.С. Циганенко, О.М. Зайченко, 2013

Як тест-системи використовували грампозитивні бактерії (*Staphylococcus aureus* B918, B904, B909; *Bacillus subtilis* 617, B901, B902; *Bacillus licheniformis* 5; *Micrococcus varians* AC613; *M. flavus* AC634; *Mycobacterium smegmatis* B917), грамнегативні бактерії (*Escherichia coli* B906, B916; *Salmonella abony* B921; *Proteus vulgaris* B905), фітопатогенні бактерії (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 7591; *P. aeruginosa* B900, B907; *P. syringae* pv. *syringae* 8523; *P. syringae* 3023; *Agrobacterium tumefaciens* 8628, 8464; *Erwinia aroideae* 8636), ґрунтові бактерії (*Azotobacter chroococcum* B-6003, *A. vinelandii* B-6017; *Bradyrhizobium japonicum* B-6035; *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 2486; *B. megaterium* B-5724) дріжджі (*Candida albicans* 690, Y-2681; *C. utilis* Y-984; *C. tropicalis* Y-2473; *C. kefyri* 899; *Trichosporon cutaneum* 1502), міцеліальні гриби (*Botrytis cinerea* F-16812; *Rhizoctonia solani* 16036; *Phoma betae* 16865; *A. fumigatus* 910; *A. flavus* 1674, *A. parvulus* 3142; *A. niger* 51; *Fusarium lactis* 50680, 50678, 50714; *F. oxysporum* 220).

Штами тест-мікроорганізмів були люб'язно надані в наше розпорядження з відділу фітопатогенних бактерій, відділу антибіотиків та відділу фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ, за що ми щиро вдячні.

Бактеріальні тест-організми культивували у пробірках на скошеному агаризованому середовищі впродовж 24 годин. Всі бактеріальні тест-культури вирощували при температурі 37°C, виняток складали лише фітопатогенні бактерії, які культивували при 30°C. Тест-культури дріжджів та міцеліальних грибів вирощували у пробірках на скошеному агаризованому суслі при температурі 26°C впродовж двох (дріжджі) та семи (мікроміцети) діб.

У разі скринінгу за антибіотичними властивостями як тест-організми використовували добові бактеріальні культури, вирощені в пробірках на скошеному агаризованому середовищі при 37°C. В пробірку додавали стерильну дистильовану воду та струшували до одержання однорідної суспензії, з густиною 5×10^6 кл/мл. 0,2 мл такої суспензії вносили стерильно у пробірку з 20 мл розплавленого та охолодженого до 40°C агаризованим середовищем, перемішували і виливали в стерильну чашку Петрі. Після застигання на поверхню середовища розкладали диски, оброблені екстрактами з культуральних фільтратів досліджуваних мікроміцетів.

На кожен диск наносили по 20 мкл хлороформного розчину екстракту. Для приготування розчину розчиняли 10мг екстракту в 10мл розчинника.

Зони затримки росту бактеріальних тест-культур вимірювали після інкубації чашок Петрі протягом 18–24 годин [2].

Аналогічним шляхом виконували скринінг за антифунгальними властивостями, де як тест-організми використовували культури дріжджоподібних та міцеліальних грибів, вирощених у пробірках на скошеному агаризованому суслі при 26°C.

Зони затримки росту тест-культур дріжджоподібних грибів вимірювали після інкубації чашок Петрі протягом 48 годин, а мікроскопічних грибів протягом 96 годин при 26°C. Дослідження виконані в чотирьох повторностях, а наведені дані є середніми значеннями.

Результати та їх обговорення. Як видно з даних, наведених у таблиці, всі досліджені екстракти проявляли високий рівень антибіотичної активності щодо грампозитивних тест-культур. Так, екстракт з культурального фільтрату *A. niveus* 2411 був активним щодо всіх бактерій цієї групи. Зокрема, метаболіти гриба проявляли антибіотичну активність щодо трьох штамів *S. aureus* та трьох штамів *B. subtilis*. Більш активними екстракти гриба були щодо *B. licheniformis* 5 та *M. smegmatis* B917, де зони затримки росту бактерій в обох випадках становили по 20 мм. Метаболіти *A. niveus* 2411 проявляли активність і щодо досліджуваних представників р. *Micrococcus*, а зона затримки росту *M. flavus* AC634 становила 40 мм, що може свідчити про високий рівень антибіотичної активності метаболітів гриба щодо бактерій цього виду.

Деяко менш активними були екстракти інших трьох штамів грибів. Так, метаболіти *Penicillium* sp. 10-51 та *M. cinctum* 910 виявились не активними щодо *S. aureus* B904 і *M. varians* AC613. Екстракт *M. cinctum* 910 не був активним і щодо *M. flavus* AC634. Проте екстракти обох штамів проявляли антибіотичну дію щодо представників р. *Bacillus*, а зони затримки росту бактерій були в межах від 10 до 31 мм. Метаболіти *U. consortiale* 960 теж були активними щодо представників бацил та р. *Micrococcus*. Поряд із цим, вони не проявляли, на відміну від інших трьох штамів, активності щодо *M. smegmatis* B917.

Таблиця

Антибіотична активність екстрактів з культуральних фільтратів мікроміцетів щодо бактерій, дріжджів та мікроскопічних грибів.

№	Тест-організми	Штами	Діаметри зон затримки росту тест-культур, мм			
			<i>A. niveus</i> 2411	<i>M. cinctum</i> 910	<i>U. consortiale</i> 960	<i>Penicillium</i> sp. 10-51
Грамположитивні бактерії						
1	<i>S. aureus</i>	B918	17	13	17	12
2		B904	19	0*	20	0
3		B909	13	11	0	16
4	<i>B. subtilis</i>	617	15	16	17	31
5		B901	16	14	23	22
6		B902	17	10	10	22
7	<i>B. licheniformis</i>	5	20	28	18	20
8	<i>M. varians</i>	AC613	17	0	10	0
9	<i>M. flavus</i>	AC634	40	0	12	15
10	<i>M. smegmatis</i>	B917	22	11	0	18
Грамнегативні бактерії						
11	<i>E. coli</i>	B906	12	0	0	13
12		B916	17	0	0	11
13	<i>S. abony</i>	B921	0	12	0	15
14	<i>P. vulgaris</i>	B905	0	0	0	0
Фітопатогенні бактерії						
15	<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	7591	18	30	12	21
16	<i>P. aeruginosa</i>	B900	0	0	0	0
17		B907	0	0	0	10
18	<i>E. aroideae</i>	8636	23	41	19	34
19	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	8523	0	0	0	21
20	<i>P. syringae</i>	3023	0	0	0	0
21	<i>A. tumefaciens</i>	8628	10	12	0	18
22		8464	0	16	0	0
Грунтові бактерії						
23	<i>A. chroococcum</i>	B-6003	0	0	0	0
24	<i>A. vinelandii</i>	B-6017	0	0	0	0
25	<i>B. japonicum</i>	B-6035	0	0	0	0
26	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	2486	0	0	0	0
27	<i>B. megaterium</i>	B-5724	18	33	17	25
Дріжджі						
28	<i>C. albicans</i>	690	0	20	10	22
29		Y-2681	20	15	0	19
30	<i>C. utilis</i>	Y-984	0	0	0	0
31	<i>C. tropicalis</i>	Y-2473	0	19	0	12
32	<i>C. kefir</i>	899	14	17	14	26
33	<i>T. cutaneum</i>	1502	12	36	12	18
Мікроскопічні гриби						
34	<i>B. cinerea</i>	F-16812	0	29	0	26
35	<i>R. solani</i>	16036	0	22	0	0
36	<i>P. betae</i>	16865	14	13	0	12
37	<i>A. fumigatus</i>	910	0	9	0	0
38	<i>A. flavus</i>	1674	0	10	0	0
39	<i>A. parvulus</i>	3142	0	11	0	0
40	<i>A. niger</i>	51	10	14	0	0
41	<i>F. lactis</i>	50680	0	9	0	0
42		50678	0	8	0	0
43		50714	0	11	0	0
44	<i>F. oxysporum</i>	220	0	0	0	0

*Примітка. 0 – активність відсутня

Таким чином, всі досліджені екстракти мали високий рівень антибіотичної активності щодо грампозитивних мікроорганізмів. Особливо слід відзначити їх активність щодо стафілококів та бацил.

Привертає увагу антибіотична активність екстракту *A. niveus* 2411 щодо *M. flavus* AC634, та штамів *S. aureus*, що дає підстави сподіватись на можливість практичного застосування, враховуючи існування проблеми резистентності [13]. Звичайно така перспектива потребує подальших, більш глибоких досліджень.

Поряд із цим, останнім часом з'явилися дані щодо проблем, пов'язаних із формуванням біоплівки клінічними ізолятами цього виду, що теж становить серйозну загрозу [18].

Менш активними виявились екстракти грибів щодо грамнегативних бактерій. Так, метаболіти *U. consortiale* 960 проявляли незначну активність щодо двох тест-об'єктів (*P. syringae* pv. *lachrymans* 7591 та *E. aroidea* 8636). Слід звернути увагу на те, що культуральний фільтрат цього гриба був більш активним щодо грамнегативних бактерій, і проявляв антибіотичну активність щодо *E. coli* B906 [5]. Це, як нам здається, може свідчити про те, що антибіотична активність цього гриба може бути обумовлена кількома сполуками, а розбіжність в особливостях дії зумовлюється їх різною хімічною природою та властивостями екстрагенту. Можна припустити, що при екстракції з культуральних фільтратів активних сполук відносно неполярним розчинником (хлороформ) не забезпечувався повний перехід активної речовини в екстрагент.

Більш активними щодо грамнегативних тест-об'єктів були екстракти *A. niveus* 2411 та *M. cinctum* 910. Так, метаболіти *A. niveus* 2411 проявляли активність щодо двох штамів *E. coli*, а екстракт *M. cinctum* 910 був активним щодо *S. abony* B921. Поряд із цим, обидва штами були активними щодо фітопатогенних бактерій, зокрема, метаболіти *M. cinctum* 910 проявляли високий рівень антибіотичної активності щодо *P. syringae* pv. *lachrymans* 7591 та *E. aroidea* 8636, зони затримки росту яких становили 30 та 41 мм, відповідно. Менш активними були метаболіти гриба щодо двох штамів *A. tumefaciens*.

Як ми вже зазначали [4], висока фітотоксична активність штамів *M. cinctum* 903 та 910 може бути обумовлена синтезом макроциклічних трихотеценових мікотоксинів (МЦТЦ). Проте, за даними літератури [8, 6], цим речовинам не властива антибактеріальна активність. З огляду на це, ми можемо сподіватись, що цей вид активностей метаболітів *M. cinctum* 910 обумовлений наявністю сполук іншої природи.

Загалом, представникам р. *Myrothecium* не властива антибактеріальна активність. Дослідження свідчать [17], що види *M. carmichaelii*, *M. roridum*, *M. verrucaria*, *M. tonganese* малоактивні щодо бактеріальних тест-організмів, і лише представники *M. cinctum* виявились активними щодо деяких видів бактерій, але при цьому не проявляли жодної активності щодо фітопатогенних видів, зокрема, *P. syringae*. Як бачимо, наші дані засвідчують протилежне. Культуральні фільтрати штамів *M. cinctum* 903 та 910 [5], а також екстракт з культурального фільтрату *M. cinctum* 910 продемонстрували високий рівень антибіотичної активності, що, на наш погляд, розширює уявлення про антибіотичний потенціал представників виду *M. cinctum*. З іншого боку, є підстави сподіватись на те, що активні метаболіти *M. cinctum* 910 можуть мати перспективи в боротьбі з фітопатогенними бактеріями.

Найбільш активним серед досліджуваних грибів щодо грамнегативних бактерій виявився штам *Penicillium* sp. 10-51. Метаболіти гриба виявились не активними лише щодо чотирьох тест-організмів, в той же час, як штами *P. vulgaris* B905, *P. aeruginosa* B900 та *P. syringae* 3023 виявились повністю резистентними щодо дії метаболітів досліджуваних грибів. Екстракт з культуральних фільтратів *Penicillium* sp. 10-51 проявляв активність до двох штамів *E. coli* та *S. abony* B921. Поряд із цим, метаболіти гриба проявляли високий рівень активності щодо фітопатогенних бактерій. Так, за виключенням *P. aeruginosa* 907, зони затримки росту тест-культур становили від 18 до 34 мм. Слід зауважити, що екстракти інших грибів взагалі не проявляли активності щодо досліджуваних штамів цього фітопатогену.

Одержані результати засвідчують, що потенціал антибіотичної активності екстрактів досліджуваних мікроміцетів щодо грамнегативних бактерій не є таким високим, як у випадку з їх активністю щодо грампозитивних бактерій. Це, вочевидь, може бути пояснене особливостями будови їх клітинної стінки.

В той же час, слід зауважити, що екстракти грибів продемонстрували активність щодо фітопатогенних бактерій. І це питання, як нам здається, заслуговує на особливу увагу. Так, метаболіти всіх чотирьох досліджених штамів виявились активними щодо *E. aroidea* 8636 та *P. syringae* pv. *lachrymans* 7591. Поряд з цим, вони були також активними щодо *A. tumefaciens* 8628.

Слід зауважити, що традиційні методи боротьби з фітопатогенними бактеріями, зокрема представниками *P. syringae*, вичерпали свій потенціал. Так, застосування солей міді та інших важких металів [32], вже не дає бажаних результатів, оскільки все частіше з'являються повідомлення про виділення стійких штамів бактерій щодо цих токсикантів. Термічна обробка посівного насіння [9] теж є не досить ефективним засобом. З огляду на це, метод часто комбінують із застосуванням бактерицидів та антибіотиків. Але використання більш сучасних методів, зокрема, застосування мікробів-антагоністів та їх метаболітів дає змогу якісніше контролювати популяції фітопатогенних бактерій.

Так, ізолят *P. putida* проявляє антагоністичну активність [23] щодо широкого кола патогенів *P. syringae*. Поряд з цим, ізолят *A. radiobacter*, продукуючи специфічний антибіотик «агроцин 84», здатен демонструвати в польових умовах високий рівень контролю *A. tumefaciens* [25].

Було показано [30], що екстракти з рослин родини *Asteraceae* теж здатні пригнічувати ріст цього фітопатогену. В ряді робіт наводяться дані щодо перспективності використання проти фітопатогену *E. aroidea* антибіотика, виділеного з *Streptomyces lavandule* var. *hainanensis* [34]. Поряд із цим, зі штаму *P. aurantiaca* В-162 було виділено антибіотик пірролінітрин [7], який в досліджах *in vitro* проявляє високу активність щодо фітопатогенних ізолятів *Pseudomonas* та *Erwinia*.

Як бачимо, технологія біологічного захисту рослин від фітопатогенних бактерій в основному розроблена на основі бактеріальних мікроорганізмів, тому, як нам здається, дослідження антибіотичної активності мікроміцетів та її практичне використання заслуговують на більшу увагу.

Раніше ми акцентували увагу на можливості практичного використання корисних властивостей відібраних штамів мікроміцетів, що незаперечно ставить питання їх впливу на ґрунтову мікрофлору. Постановка таких досліджень дає підстави зробити висновок про безпечність метаболітів гербіцидної дії щодо азотфіксувальних бактерій, які, як відомо, відіграють значну роль в урожайності сільськогосподарських культур.

Як видно з даних, наведених в таблиці, екстракти досліджуваних грибів не проявляли активності щодо представників родів *Azotobacter*, *Bradyrhizobium* та *Rhizobium*, що є обнадійливим.

Метаболіти всіх досліджуваних грибів виявили активність щодо *B. megaterium* В-5724, і найбільш активними були штами *M. cinctum* 910 та *Penicillium* sp. 10-51 із зонами затримки росту 33 та 25 мм, відповідно. Висока активність екстрактів грибів щодо цієї бактерії зумовлена, як вже згадувалось, чутливістю представників р. *Bacillus* до їх метаболітів.

Мікроскопічні гриби, поряд із корисними властивостями, можуть проявляти і небажані ефекти (токсигенні, фітопатогенні та патогенні). Слід також зауважити, що мікроміцети є набагато стійкішими, порівняно з бактеріями, не лише до антибіотиків, але й до інших засобів та методів контролю чисельності небажаних організмів. Тому проблема розповсюдження фітопатогенних та токсигенних грибів ставить перед сучасними біотехнологіями завдання пошуку ефективних засобів боротьби з цим лихом.

Культуральні фільтрати активних штамів поряд із антибактеріальною та фітотоксичною проявляли також і фунгістатичну активність [5], у зв'язку з чим ми розширили набір дріжджових тест-культур, а також додатково залучили до скринінгу 11 штамів мікроміцетів, представлених фітопатогенними та токсигенними ізолятами, а також сапрофітним штамом *A. parvulus* 3142.

З даних, наведених у таблиці, можна бачити, що екстракти досліджуваних грибів різною мірою проявляють фунгіцидну активність. Так, незначну активність продемонстрували екстракти штамів *A. niveus* 2411 та *U. consortiale* 960 щодо *C. kefyi* 899 та *T. cutaneum* 1502. Поряд із цим, екстракт *A. niveus* 2411 проявляв активність щодо *C. albicans* Y-2681. Слід наголосити

на тому, що культуральному фільтрату цього гриба взагалі не була властива фунгіцидна активність щодо досліджуваних тест-культур [5]. З огляду на це, ми можемо припустити, що:

- штам *A. niveus* 2411 здатен синтезувати сполуки з суто фунгіцидною активністю, однак, потенціал їх синтезу не є достатнім, щоб на рівні культуральних фільтратів спостерігати біологічну активність;

- при концентруванні активних метаболітів гриба, вони, поряд із антибактеріальною активністю, здатні проявляти і фунгіцидну дію. Адже відомо, що дріжджі більш стійкі, на відміну від бактерій, до речовин з антибіотичною активністю.

Таке ж припущення справедливе щодо пояснення фунгіцидної активності екстрактів штаму *U. consortiale* 960, культуральний фільтрат якого проявляв слабку активність щодо *C. albicans* 690 і не виявив її щодо інших тест-культур.

Більш активними щодо дріжджів виявились екстракти інших двох штамів. Так, метаболіти *M. cinctum* 910 проявляли фунгіцидну активність щодо чотирьох представників р. *Candida* та *T. cutaneum* 1502. Активним щодо цих п'яти тест-культур виявився екстракт *Penicillium* sp. 10-51, проте зони затримки росту дріжджів були меншими.

Як бачимо з даних, наведених у таблиці, екстракти грибів, за виключенням *M. cinctum* 910, виявились малоактивними щодо міцеліальних тест-організмів. Так, метаболіти *U. consortiale* 960 взагалі не впливали на культури мікроскопічних грибів, за наявності активності щодо трьох дріжджових тест-організмів.

Екстракти *A. niveus* 2411 проявляли незначну фунгістатичну активність щодо фітопатогену *P. betae* 16865 та *A. niger* 51, про що свідчать зони затримки росту цих тест-культур. Поряд із цим, незначну активність проявляли екстракти *Penicillium* sp. 10-51. Так, метаболіти гриба були активними щодо *P. betae* 16865 та іншого фітопатогену *B. cinerea* F-16812. Слід зауважити, що метаболіти цього гриба хоч і не проявляли фунгістатичної активності до представників р. *Aspergillus*, однак, інгібували процес спорогенезу цих тест-грибів, внаслідок чого навкруг дисків утворювались аспорогенні зони діаметром від 24 до 33 мм. Це може свідчити, що активним метаболітам *Penicillium* sp. 10-51 поряд із фунгіцидною та фінгістатичною активностями притаманна аспорогенна дія.

Можна припустити, що ці речовини можуть регулювати процес спорогенезу у гриба-продуцента і бути використаними як засоби біоконтролю. Відомо, що спори грибів *A. fumigatus*, *A. flavus* та *A. niger* здатні викликати сильні алергічні реакції [1]. Поряд із цим, вони мають токсичні властивості і є причиною аспергильозів.

На відміну від метаболітів інших трьох грибів, екстракт *M. cinctum* 910 проявляв значний рівень фунгістатичної активності щодо міцеліальних тест-культур. Так, він був активним щодо фітопатогенних ізолятів і токсигенних грибів. Зокрема, найбільш активними метаболіти *M. cinctum* 910 були щодо фітопатогенів *B. cinerea* F-16812 та *R. solani* 16036. Менш активним екстракт гриба виявився щодо представників р. *Aspergillus* та трьох фітопатогенних ізолятів *F. lactis*. Слід зазначити, що представники *F. lactis* поряд із фітопатогенними властивостями здатні проявляти і токсигенні.

Так, було показано [31, 35] що фітопатогенні ізоляти *F. lactis*, виділені з солодкого перцю, здатні продукувати моніліформін, фумонізін, боверицин.

Таким чином, слід сподіватись на те, що активні метаболіти *M. cinctum* 910 можуть мати перспективи практичного застосування в боротьбі із цим фітопатогеном. Адже в літературі вкрай мало повідомлень щодо ефективних засобів біоконтролю цього патогену.

Неактивними виявились метаболіти *M. cinctum* 910 щодо токсигенного штаму *F. oxysporum* 220.

Високу фунгіцидну активність штаму *M. cinctum* 910 можна пояснити його здатністю до продукування МЦТЦ. Цьому класу речовин, як ми зазначали, притаманний широкий спектр біологічних активностей, і зокрема, яскраво виражені фунгістатичні властивості [6].

Ці сполуки проявляють активність щодо дріжджів (рр. *Candida*, *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Trichosporon* та ін.) та міцеліальних грибів (рр. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor* та ін.). Так, мінімальні інгібуючі концентрації веррукарину А та рорідину А щодо дріжджів становлять 0,5 мкг/мл [8]. Зважаючи на таку високу фунгістатичну

активність, чутливі штами дріжджів використовуються як індикаторні тест-організми щодо цих мікотоксинів.

З іншого боку, дослідження свідчать, що ізоляти *M. cinctum* здатні продукувати речовини з фунгістатичною активністю іншої природи. Так, з культуральних фільтратів *M. cinctum* [20] було виділено та охарактеризовано активний метаболіт FR227244. Автори встановили, що ця сполука проявляє антифунгальну активність щодо *C. utilis*, *C. parapsilosis*, проте, менш активною вона була щодо *C. albicans*, *C. krusei* та *C. tropicalis*. Поряд із цим, спостерігали фунгістатичну активність щодо представників р. *Aspergillus* та патогенних ізолятів р. *Trichophyton* [21]. Було встановлено, що активна сполука належить до ряду тритерпенових глікозидів, і одним із можливих механізмів її дії є пригнічення синтезу глюкану, що підтверджується також і даними щодо морфології гіф *A. fumigatus*.

На даному етапі досліджень ми не можемо сказати напевне, який клас метаболітів визначає ті чи інші антибіотичні активності штамів *M. cinctum* 903 та 910, оскільки дані щодо антибактеріальних властивостей сполуки FR227244 не наводяться. Однак, ми не виключаємо можливості того, що поряд із МЦТЦ і сполуками тритерпенової природи активні штами продукують також інші метаболіти, в т.ч. із антибактеріальною активністю.

Загалом, не зважаючи на те, що екстракти досліджуваних штамів проявляють низький рівень активності щодо міцеліальних тест-культур, можна відзначити активності штамів *A. niveus* 2411 та *Penicillium* sp. 10-51 щодо фітопатогенного ізоляту *P. betae* 16865. Цей фітопатоген здатен уражувати корінці та проростки цукрового буряка, завдаючи значної шкоди урожайності цієї важливої сільськогосподарської культури [22]. На сьогодні розробляється широкий спектр методів біоконтролю цього шкодочинного агента. Зокрема, повідомляється [10, 24], що бактерії – представники родів *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus* – здатні проявляти антагоністичні властивості щодо *P. betae* та *R. solani*. Інші дослідження свідчать, що гриби *B. brassiana*, *B. brongniartii*, *Paecilomyces farinosus*, *Metarhizium anisopliae* проявляють достатній рівень контролю популяції фітопатогену в тепличних умовах [27]. Найбільш активним серед цих грибів виявився *M. anisopliae*. В ряді інших робіт повідомляється про перспективність використання *Chaetomium globosum* [32]. З огляду на це, ми можемо сподіватись що активні метаболіти штамів *A. niveus* 2411 та *Penicillium* sp. 10-51 можуть мати перспективи в боротьбі з фітопатогеном *P. betae*.

Цікавими нам видаються дослідження фунгістатичної активності *Penicillium* sp. 10-51 та *M. cinctum* 910 щодо представників *B. cinerea*, адже метаболіти грибів продемонстрували високий рівень активності щодо цього фітопатогену. Слід зауважити, він здатен уражати широке коло рослин, зокрема, найбільшої шкоди він завдає виноградникам та плантаціям квітів. З огляду на це, було розроблено широкий спектр методів боротьби із цим агентом. Так, було показано [29, 16], що ряд бактерій р. *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. pumilis*, *B. lentimorbus*), а також *E. intermedius*, *Kurthia sibirica* тощо проявляють антагоністичні властивості щодо *B. cinerea*. Поряд із цим, повідомляється, що представники р. *Trichoderma* здатні проявляти високий рівень контролю щодо фітопатогенних грибів, зокрема, щодо *B. cinerea* [26, 28]. В ряді робіт наводяться дані щодо високої активності неспецифічних фунгіцидів синтетичного походження щодо цього фітопатогену та інших методів контролю [14].

Як бачимо, дані літератури свідчать про актуальність досліджень у цьому напрямку, і ми сподіваємось на те, що активні метаболіти *Penicillium* sp. 10-51 та *M. cinctum* 910 можуть мати перспективи в контексті боротьби з цим фітопатогеном.

Поряд із цим, активні метаболіти *M. cinctum* 910, які проявляють високу активність щодо ізоляту *R. solani* 16036, потребують подальших досліджень з огляду на можливості їх застосування в боротьбі з цим фітопатогеном. Адже відомо, що представники *R. solani* здатні уражувати кореневу систему, листя та стебла багатьох сільськогосподарських рослин. Як альтернатива хімічним засобам боротьби з цим шкодочинним агентом, розробляються методи біоконтролю. Так, в ряді робіт [11, 15, 19] було запропоновано використання в якості агентів біологічного контролю широкий набір сапрофітних грибів – представників рр. *Trichoderma*, *Gladiolium* та *Verticillium*. В тепличних умовах було показано, що гриби-антагоністи демонструють високий рівень контролю фітопатогену на різних видах рослин (томатах, картоплі, гороху тощо). Щодо механізмів їх дії, то тут мають місце явища мікопаразитизму, продукування речовин із фунгіцидною дією та лізуючих ферментів, які руйнують міцелій фітопато-

гену. Поряд із цим, наводяться дані щодо актуальності застосування бактеріальних ізолятів в боротьбі з *R. solani* [12].

Таким чином, подальші дослідження антифунгальних властивостей метаболітів *A. niveus* 2411, *M. cinctum* 910 та *Penicillium* sp. 10-51 можуть бути перспективним напрямком досліджень. Поряд із цим, слід наголосити, що за даними літератури [17], представники р. *Myrothecium*, поряд із антифунгальною активністю, можуть проявляти мікопаразитичні властивості щодо фітопатогенних грибів рр. *Alternaria* та *Sclerotinia*, що створює додаткове підґрунтя подальших досліджень.

Слід узагальнити, що екстракти з культуральних фільтратів активних грибів проявляють широкий спектр антибіотичної активності щодо кола досліджуваних тест-організмів. За результатами вивчення можна сказати, що активні метаболіти грибів мають перспективи для подальших досліджень їх активностей. Поряд із цим, було показано, що активні метаболіти грибів *A. niveus* 2411, *M. cinctum* 910 та *U. consortiale* 960 мають широкі антибактеріальні властивості, про що досі в доступній нам літературі не згадувалось. Зокрема, в енциклопедичних виданнях «*Fungal metabolites*» та «*Handbook of secondary fungal metabolites*» відсутня будь-яка інформація щодо здатності представників *A. niveus* та *U. consortiale* продукувати біологічно активні речовини. Щодо потенціалу синтезу біологічно активних речовин представниками *M. cinctum*, як ми вже показали, існують лише окремі роботи, в яких описано їх антибіотичну активність щодо досить вузького кола тест-організмів. Слід наголосити на тому, що проаналізувавши дані літератури та зіставивши їх із результатами наших досліджень, ми дійшли висновку, що антибіотична активність штаму *M. cinctum* 910 щодо грампозитивних бактерій може бути обумовлена синтезом нових, досі не відомих, метаболітів, що, на наш погляд, потребує подальших більш глибоких досліджень.

Таким чином, як нам здається, ми обґрунтували необхідність подальших досліджень активних метаболітів штамів як можливих засобів боротьби з фітопатогенними бактеріями та грибами. Поряд із цим, ми не відкидаємо можливості того, що не лише активні сполуки, але і їх продуценти можуть бути запропоновані для подальших досліджень у ролі агентів біологічного контролю фітопатогенів. Варто також погодитись із тим, що нами встановлений широкий спектр біологічної активності екстрактів *A. niveus* 2411 та *U. consortiale* 960, про що досі не було відомо.

Я.И.Савчук, Е.С.Цыганенко, А.М.Зайченко

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев

АНТИБИОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

Резюме

Исследована биологическая активность очищенных экстрактов из культуральных фильтратов штаммов *Aspergillus niveus* 2411, *Myrothecium cinctum* 910, *Ulocladium consortiale* 960, *Penicillium* sp. 10-51 в отношении широкого круга тест-культур. Полученные результаты показали высокую активность экстрактов относительно грамположительных бактерий, в частности исследуемых представителей р. *Bacillus*. Менее активными экстракты грибов оказались относительно грамотрицательных организмов. В то же время, метаболиты *M. cinctum* 910, *Penicillium* sp. 10-51 проявляли высокую антибиотическую активность относительно фитопатогенных бактерий. Экстракты грибов проявляли фунгистатическое действие относительно дрожжей, и были малоактивными относительно мицелиальных грибов. Так, экстракты *A. niveus* 2411 и *Penicillium* sp. 10-51 подавляли рост *Phoma betae*. Наиболее активными оказались метаболиты *M. cinctum* 910, которые проявляли фунгистатическое действие относительно представителей р. *Aspergillus* и фитопатогенных изолятов *Fusarium lactis*, *Rhizoctonia solani* и *Botrytis cinerea*.

К л ю ч е в ы е с л о в а: микромицеты, метаболиты, биологическая активность, фитопатогенные микроорганизмы.

Ya.I. Savchuk, K.S. Tsyganenko, O.M. Zaichenko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

ANTIBIOTIC ACTIVITY OF SOME FUNGI

S u m m a r y

Biological activity of pure extracts of cultural filtrates of *Aspergillus niveus* 2411, *Myrothecium cinctum* 910, *Ulocladium consortiale* 960, *Penicillium* sp. 10-51 concerning wide spectrum of test-organisms was investigated. It was shown that the extracts had high levels of antibacterial activity against Gram-positive microorganisms, especially against *Bacillus* genus. But their activity against Gram-negative bacteria was a bit lower. On the other hand, metabolites of *M. cinctum* 910 and *Penicillium* sp. 10-51 did show the activity concerning phytopathogenic bacteria.

Extracts of fungi showed fungistatic activity against yeasts, but they were not so active concerning fungal test-cultures. Extracts of *A. niveus* 2411, *Penicillium* sp. 10-51 suppressed the growth of *Phoma betae*. The highest level of fungistatic activity was shown by metabolites of *M. cinctum* 910. They showed activity against *Aspergillus* genus strains and phytopathogenic isolates of *Fusarium lactis*, *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea*.

The paper is presented in Ukrainian.

K e y w o r d s: fungi, metabolites, biological activity, phytopathogenic organisms.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Savchuk Ya. I., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Билай В.Й., Пидопличко Н.М. Токсикообразующие микроскопические грибы и вызываемые ими заболевания человека и животных. – Киев: Наук. думка, 1970. – 291 с.
2. Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. – М.: Высш. шк., 1965. – 212 с.
3. Методы экспериментальной микологии /Под ред. В.Й. Билай. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
4. Савчук Я.И. Гербицидная активность некоторых микромицетов // Микробиол. журн. – 2012. – 74, № 3. – С. 43–48.
5. Савчук Я.И., Зайченко О.М. Оцінка потенціалу мікроміцетів щодо синтезу біологічно активних речовин // Там само. – 2010. – 72, № 2. – С. 15–20.
6. Тутельян В. А., Кравченко Л. В. Микотоксины (медицинские и биологические аспекты). – М.: Медицина, 1985. – 320 с.
7. Фекуслова И.Н. Синтез антибиотиков ароматической природы у бактерий *Pseudomonas aurantiaca* B-162 : Автореф. дисс. канд. биол. наук. – Минск: Белорусский государственный университет, 2006. – 26 с.
8. Bamburgh J.R. Biological and biochemical actions of trichothecene mycotoxins // Progr. Mol. and Subcell. Biol. – 1983. – 8, N 1. – P. 41–110.
9. Baker K.F. Thermotherapy of planting material // Phytopathology. – 1962. – 52. – P. 1244–1255.
10. Barahona E., Navazo A., Martínez-Granero F., Zea-Bonilla T. Pérez-Jiménez R. M., Martín M., Rivilla R. *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – 77, N 15. – P. 5412–5419.
11. Barakat R.M., Al-Mahareeq F., Ali-Shtayeh M. S., Al-Masri M. I. Biological control of *Rhizoctonia solani* by indigenous *Trichoderma* spp. isolates from Palestine // Hebron University Research Journal. – 2007. – 3, N 1. – P. 1–15.
12. Bunkar R.R., Mathur K. Antagonism of local biocontrol agents to *Rhizoctonia solani* inducing dry root rot of chilli // J. Mycol. Pl. Pathol. – 2001. – 31, N 1. – P. 50–53.
13. Chambers H. F., DeLeo F. R. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era // Nat. Rev. Microbiol. – 2009. – 7, N 9. – P. 629–641.
14. Couderchet M. Benefits and problems of fungicide control of *Botrytis cinerea* in vineyards of Champagne // Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France. – 2003. – 42, N 4. – P. 165–171.
15. Demirci E., Eken C., Dane E. Biological control of *Rhizoctonia solani* on potato by *Verticillium biguttatum* // African Journal of Biotechnology. – 2009. – 8, N 11. – P. 2503–2507.

16. Donmez M. F., Esitken A., Yildiz H., Ercisli S. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria // Journal of Animal & Plant Sciences. – 2011. – **21**, N 4. – P. 758–763.
17. Gülay T., Grossmann F. Antagonistic Activity of five *Myrothecium* species against fungi and bacteria *in vitro* // Phytopathology. – 1994. – **140**, N 2. – P. 97–113.
18. Harriott M., Noverr C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance // Antimicrob. Ag. Chemother. – 2009. – **53**, N 9. – P. 3914–3922.
19. Howell C.R. Relevance of mycoparasitism in the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Gliocladium virens* // Phytopathology. – 1987. – **77**, N 7. – P. 992–994.
20. Kobayashi M., Kanasaki R., Ezaki M., Sakamoto K., Takase S., Fujie A., Hino M., Hori Y. FR227244, a novel antifungal antibiotic from *Myrothecium cinctum* No. 002. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties // J. Antibiot. – 2004. – **57**. – P. 780–787.
21. Kobayashi M., Sato I., Abe F., Nitta K., Hashimoto M., Fujie A., Hino M., Hori Y. FR227244, a novel antifungal antibiotic from *Myrothecium cinctum* No. 002. II. Biological properties and mode of action // J. Antibiot. – 2004. – **57**. – P. 788–796.
22. Kober S. K., Gallian L. Growth chamber evaluations of seedborne fungi as seed and seedling pathogens of sugarbeet // Phytopathology. – 1988. – **78**. – P. 1515.
23. Liao C. H. Antagonism of *Pseudomonas putide* strain PP22 to phytopathogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent // Plant Dis. – 1989. – **73**. – P. 223–226.
24. Lovic B., Heck C., Gallian J.J., Anderson A.J. Inhibition of the sugarbeet pathogens *Phoma betae* and *Rhizoctonia solani* by bacteria associated with sugarbeet seeds and roots // Sugar Beet Research. – 1993. – **30**, N 3. – P. 46–52.
25. McClure N.C., Ahmadi A.R., Clare B.G. The role of agrocin 434 produced by *Agrobacterium* strain K84 and derivatives in the biological control of *Agrobacterium* biovar 2 pathogens // CSIRO Division of Soils Australia. – 1994. – P. 125–127.
26. Montealegre J., Valderrama L., Sánchez S., Herrera R. et al. Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants // Electronic Journal of Biotechnology. – 2010. – **13**, N 2. – P. 238–244.
27. Roberti R., Ghisellini L., Innocenti G. Biological control of blackleg of beet (*Phoma betae*) by *Metarhizium anisopliae* // Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. – 1993. – **100**, N 2. – P. 203–210.
28. Shafir S., Dag A., Bilu A., Abu-Toamy M., Elad Y. Honey bee dispersal of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* T39: effectiveness in suppressing *Botrytis cinerea* on strawberry under field conditions // European Journal of Plant Pathology. – 2006. – **116**. – P. 119–128.
29. Siripornvisal S. Biocontrol Efficacy of *Bacillus subtilis* BCB3-19 against Tomato Gray Mold // KMITL Sci. Tech. J. – 2010. – **10**, N 2. – P. 122–134.
30. Stanojković A., Piviš R., Jošić D., Stanojković A. The possibility of using plant extracts in control of *Agrobacterium tumefaciens* (Schmit and Townsend) Conn// Zbornik Radova 44. Hrvatski i 4 Medunarodni Simpozij Agronoma, Opatija, Hrvatska. – 2009. – P. 99–103.
31. Van Poucke K., Monbaliu S., Munaut F., Heungens K., De Saeger S., Van Hove F. Genetic diversity and mycotoxin production of *Fusarium lactis* species complex isolates from sweet pepper // Int. J. Food Microbiol. – 2012. – **153**, N1-2. – P. 28–37.
32. Washington W.S. Effect of Bordeaux mixture sprays applied after flowering on fruit finish of apricot // Plant Prot.Q. Victoria. – 1991. – **6**. – P. 188–189.
33. Walther D., Gindrat D. Biological control of damping-off of sugar-beet and cotton with *Chaetomium globosum* or a fluorescent *Pseudomonas sp.*// Can. Journal of Microbiology. – 1988. – **34**, N 5. – P. 631–637.
34. Xei D.L., Ni C.F., Zhu C.X. Control of bacterial soft rot of crucifers with a newly developed antibiotic // Chi. J. Biol. Control. – 1990. – **6**, N 2. – P. 74–77.
35. Yang Y., Bouras N., Yang J., Howard R.J., Strelkov S.E. Mycotoxin production by isolates of *Fusarium lactis* from greenhouse sweet pepper (*Capsicum annuum*) // Int. J. Food Microbiol. – 2011. – **151**, N 2. – P. 150–156.

Отримано 26.11.2012