

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»
Національна академія наук України

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця на
правах рукопису

Зайченко Тетяна Олександрівна

УДК 604:582.284:573.7:57.04:615.32

ДИСЕРТАЦІЯ

ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ ТА БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ШТАМІВ *FOMITOPSIS BETULINA* В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Спеціальність – 091 «Біологія»

Галузь знань – 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Т.О. Зайченко

Науковий керівник: Круподьорова Тетяна Анатоліївна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник

АНОТАЦІЯ

Зайченко Т.О. Особливості росту та біосинтетичної активності штамів *Fomitopsis betulina* в культурі *in vitro*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2025.

Дисертаційна робота присвячена комплексному дослідженню штамоспецифічних особливостей росту та біосинтетичної активності базидієвого гриба *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai (березова губка), відомого своїми цінними лікувальними властивостями, що здавна використовуються у народній медицині різних країн. Терапевтична ефективність цього виду підтверджується сучасними науковими дослідженнями, які демонструють його антимікробну, протипухлинну, імуномодулювальну, антиоксидантну та інші біологічні активності. Водночас, попри значну кількість даних літератури, що стосуються дикорослих плодових тіл *F. betulina*, відомості про його морфофізіологічні властивості в умовах культури *in vitro* залишаються фрагментарними та недостатніми, що й обумовлює актуальність дослідження.

У рамках роботи охарактеризовано 22 штами *F. betulina*, серед яких 11 одержано з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК), а решта – ізольовані автором самостійно.

З метою поповнення колекційного фонду та розширення наукових даних щодо виду березової губки, в культуру інтродуковано 11 нових штамів, ізольованих із дикорослих плодових тіл, зібраних на *Betula pubescens* Ehrh. у межах Національного природного парку «Голосіївський» (м. Київ) та в південній лісосмузі м. Суми. Верифікацію чистих культур проведено за морфологічними та мікроскопічними ознаками. Отримані культури передано до

Колекції культур шапинкових грибів НАН України (ІВК), що має статус Національного надбання України. Новим ізолятам присвоєно колекційні номери ІВК 2770–2778, 2785, 2786.

Здійснено характеристику макроморфологічних ознак та вивчено швидкість росту вегетативного міцелію 22 штамів *F. betulina* на агаризованих середовищах (картопляно-декстрозному агарі, глюкозо-пептон-дріжджовому агарі, Сабуро-декстрозному агарі, мальт-екстракт агарі). Виявлено їх штамоспецифічні особливості залежно від середовища культивування. Описано такі макроморфологічні ознаки штамів березової губки в культурі, як структура (шерстиста, шерстисто-повстяна та повстяна) та колір колоній (здебільшого білий), колір реверзumu (найчастіше незмінений), схильність до утворення примордіїв (формувалися після 3 тижнів культивування ближче до краю колоній), здатність до штамоспецифічних варіацій (зміни в пігментації колоній та реверзumu, зональності й щільності колоній, швидкості утворення примордіїв) та їхні відмінності залежно від поживного середовища при твердофазному культивуванні. Встановлено, що радіальна швидкість росту коливалась від $3,50 \pm 0,33$ до $8,75 \pm 0,50$ мм/добу. Окремі штами краще росли на різних поживних середовищах: глюкозо-пептон-дріжджовий агар забезпечував максимальний ріст *F. betulina* 2786, Сабуро-декстрозний та картопляно-декстрозний агар сприяли росту *F. betulina* 2366, а мальт-екстракт агар був оптимальним для росту *F. betulina* 2775.

З'ясовано вплив на рівні утворення біомаси та продукування екзополісахаридів всіх досліджених штамів *F. betulina* рідких (глюкозо-пептон-дріжджового, Сабуро-декстрозного, картопляно-декстрозного, мальт-екстракту) поживних середовищ. Кількість накопиченої міцеліальної маси варіювала від $2,28 \pm 0,26$ до $13,72 \pm 0,05$ г/л залежно від середовища та конкретної культури. Вперше визначено рівні вмісту екзополісахаридів у виду *F. betulina* в культурі, які коливалися від $0,02 \pm 0,00$ до $2,20 \pm 0,31$ г/л. За результатами скринінгу 22 штамів за рівнем продукування міцелію та екзополісахаридів встановлено

найперспективніший штам *F. betulina* 311 та визначено оптимальним для його культивування Сабуро-декстрозне рідке середовище.

Проведено серію експериментів по встановленню наявності антагоністичної активності березової губки відносно умовно патогенних та паразитичних грибів у подвійній культурі. Встановлено, що штамми *F. betulina* були неактивними лише проти *Cladobotryum mycophilum* (Oudem.) W. Gams & Hooz. Антагоністична дія штамів *F. betulina* щодо тест-культур ранжувалася у послідовності: *Aspergillus fumigatus* Fresen. < *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. < *Penicillium polonicum* K. Zaleski < *Aspergillus niger* Tiegh. < *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. < *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát ≤ *Pichia kudriavzevii* Boidin, Pignal & Besson ≤ *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout < *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallett. Уперше у подвійній культурі досліджено антагоністичну активність *F. betulina* відносно *A. fumigatus*, *C. mycophilum*, *F. poae*, *H. annosum*, *M. nivale*. Розраховано антагоністичні індекси досліджених культур *F. betulina*, які коливалися у межах 28,0–37,5. Найвищий індекс на рівні 37,5 встановлено для штаму *F. betulina* 2771, високий рівень антагоністичної активності (індекс антагонізму >35,0) проявили також *F. betulina* 978, 989, 2364, 2770 та 2772.

Досліджено біосинтетичний потенціал штамів березової губки – антибактеріальну, антиоксидантну активність етилацетатних екстрактів міцеліальної маси та культуральної рідини, а також рівень вмісту фенольних сполук. З'ясовано штамоспецифічні особливості біологічної активності досліджених культур.

Встановлено наявність антибактеріальної активності екстрактів біомаси та культуральної рідини *F. betulina* відносно усіх тест-бактерій (грампозитивних *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* та грамнегативних *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). Діаметр затримки росту тест-мікроорганізмів становив від 8,0±0,0 до 22,5±0,5 мм. Найширший спектр активності виявлено в екстракті культуральної рідини та міцелію штамів *F. betulina* 978 та 2778.

Підтверджено наявність антиоксидантної активності екстрактів міцеліальної маси та культуральної рідини штамів *F. betulina*. Рівень інгібування вільних радикалів варіював від $18,32 \pm 0,50$ % до $96,66 \pm 0,40$ % для культуральної рідини і від $7,74 \pm 2,40$ % до $90,95 \pm 0,60$ % для міцелію. Штами *F. betulina* 2773 у культуральній рідині та *F. betulina* 988 у біомасі мали максимальні значення антиоксидантної активності. Інтерес викликають штами *F. betulina* 2777 і 2778, які мали високу (≥ 80 %) активність як в культуральній рідині, так і в міцелії.

Наявність фенольних сполук встановлено у всіх штамів *F. betulina*. Вміст фенолів в екстрактах культуральної рідини варіював від слідових кількостей ($\leq 0,01$ мг еквіваленту галової кислоти (ЕГК)/г сухого екстракту) до $8,57 \pm 0,18$ мг ЕГК/г, а в екстрактах міцеліальної маси – від слідових кількостей до $5,48 \pm 0,10$ мг ЕГК/г сухого міцелію. Найвищий рівень фенолів виявлено в екстракті міцелію штаму *F. betulina* 2771 та в екстракті культуральної рідини штаму *F. betulina* 2777.

За підсумком усіх проведених скринінгових досліджень для подальшої роботи відібрано штам *F. betulina* IBK 2777 з метою визначення сприятливих параметрів культивування стосовно накопичення біомаси, фенольних сполук та антиоксидантної активності.

Підтверджено видову приналежність відібраного штаму *F. betulina* 2777 за допомогою молекулярно-генетичних методів, що гарантує відтворюваність результатів та надійність для подальшого комерційного застосування штаму. Отримані нуклеотидні послідовності ITS-регіону рДНК депоновано до міжнародної бази даних GenBank під реєстраційним номером PQ184655.

При визначенні придатного розчинника для екстракції міцелію обрано 70 % етанол. Для оптимального співвідношення продукування фенолів та міцелію, високого рівня антиоксидантної активності, визначено сприятливі параметри культивування *F. betulina* 2777: спосіб інкубації – культивування за статичних умов, температура – 25 ± 2 °C, pH – 6,0, тривалість – 14 діб, джерело вуглецю у поживному середовищі – ксилоза, джерело азоту – сульфат амонію.

Отримані результати створюють передумови для подальших досліджень щодо з'ясування складу та структури метаболітів з антиоксидантною дією. Це дозволить у майбутньому використовувати міцелій березової губки з високою антиоксидантною ефективністю.

Статистичний аналіз показників накопичення біомаси, екзополісахаридів, фенольних сполук, прояву антибактеріальної та антиоксидантної активностей 22 штамів *F. betulina* дозволив виявити низку закономірностей. Показовою є сильна (за шкалою Коена) позитивна кореляція між рівнями антиоксидантної активності та вмістом фенольних сполук в етилацетатних екстрактах міцелію ($r = 0,91$) та культуральної рідини ($r = 0,52$) досліджених штамів. За рештою біосинтетичних показників екстрактів культуральної рідини не виявлено значущих взаємозв'язків. Позитивні залежності різної величини ($r = 0,24$ – $0,76$) були виявлені між антибактеріальною активністю (відносно *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* та *S. aureus*), антиоксидантною активністю та кількістю фенолів екстрактів міцелію. Рівні продукування біомаси обернено пропорційно (від $r = -0,04$ до $r = -0,48$) корелюють із біологічними активностями (антиоксидантною та антибактеріальною проти *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* та *S. aureus*). Встановлено позитивну кореляцію ($r = 0,91$) між вмістом фенолів у міцелії та кількістю біомаси відповідних штамів *F. betulina*. Незначну позитивну кореляцію ($r = 0,32$ – $0,38$) спостерігали між кількістю біомаси та екзополісахаридів на 2 середовищах: Сабуро-декстрозному та мальт-екстракті.

Обчислено кореляцію між рівнями накопичення міцеліальної маси, фенольних сполук та величиною антиоксидантної активності спиртових (етанол 70 %) екстрактів міцелію штаму *F. betulina* 2777, отриманого за різних умов культивування. Встановлено позитивну залежність ($r = 0,60$ – $0,74$) між кількістю біомаси та вмістом фенолів при різних температурах, тривалості та культивуванні за статичних умов чи динамічного струшування. Антиоксидантна активність практично не корелювала з вмістом фенолів. За величиною впливу кожний параметр культивування *F. betulina* 2777 можна

ранжувати як: температура > тривалість культивування за статичних умов > рН > тривалість культивування при динамічному струшуванні > джерела вуглецю > джерела азоту. У подальших дослідженнях культур *F. betulina* варто приділити увагу здатності до утворення фенольних сполук, екзо- та ендополісахаридів, каротиноїдів, токоферолів, аскорбінової кислоти та інших речовин з антиоксидантним потенціалом.

Таким чином, встановлено штамоспецифічні особливості біосинтетичної активності поліпорового макроміцета – *Fomitopsis betulina* за різних умов культивування. Зазначимо про необхідність комплексного підходу до дослідження біологічної активності грибів, що включає аналіз як ендегенних, так і екзогенних метаболітів для повного розкриття їхнього біотехнологічного потенціалу. Отримані результати створюють науково обґрунтовану основу для подальшого використання перспективних штамів *F. betulina* як продуцентів екзополісахаридів, фенольних сполук та метаболітів з антимікробними й антиоксидантними властивостями, зокрема для розробки нових біомедичних засобів, дієтичних добавок і засобів біоконтролю. Дослідження має значний прикладний потенціал і відповідає пріоритетним напрямкам сталого розвитку України до 2030 року, сприяючи досягненню цілей: 3 (міцне здоров'я), 9 (інновації та інфраструктура), 12 (відповідальне споживання) та 15 (збереження екосистем). Використання макроміцетів як джерел біоактивних речовин спрямоване на реалізацію біоекономічного підходу із мінімальним впливом на довкілля, а збереження та дослідження штамового різноманіття підкреслює роль мікобіоти у розвитку національної біотехнологічної галузі та у вирішенні окремих екологічних і медичних проблем.

Ключові слова: макроміцети, *Fomitopsis betulina*, екстракти з грибів, міцеліальна біомаса, культуральна рідина, метаболіти, антимікробна та антиоксидантна активність, умови культивування, біоконтроль.

SUMMARY

Zaichenko T.O. Characteristics of growth and biosynthetic activity of *Fomitopsis betulina* strains in culture *in vitro*. – Manuscript.

The thesis for the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in specialty 091 «Biology». – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

The dissertation provides a comprehensive study of the strain-specific growth characteristics and biosynthetic activity of the basidiomycete fungus *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai (Birch polypore). This mushroom is renowned for its valuable medicinal properties, which have been used in folk medicine across different countries since ancient times. Modern scientific research confirms the therapeutic efficacy of this species, demonstrating its antimicrobial, antitumor, immunomodulatory, antioxidant and other biological activities. Despite the considerable amount of literature concerning the fruiting bodies of *F. betulina* growing in the wild, information on its morphophysiological properties *in vitro* remains fragmentary and insufficient, which determines the relevance of this study.

As part of this study, 22 strains of *F. betulina* were characterised, including 11 obtained from the IBK Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine. The remaining strains were isolated in the culture by the author.

To replenish the collection fund and expand the scientific data about Birch polypore, 11 new strains were introduced into the culture, having been isolated from wild-grown fruiting bodies collected on *Betula pubescens* Ehrh. within the Holosiivskyi National Nature Park (Kyiv) and in the southern forest belt of Sumy, Ukraine. The pure cultures were verified by their morphological and microscopic features. The cultures obtained were transferred to the IBK Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of

Sciences of Ukraine, which has National Heritage status in Ukraine. The new isolates were assigned IBK collection numbers 2770–2778, 2785, and 2786.

The macromorphological characteristics were described, and the growth rate of the vegetative mycelium of 22 *F. betulina* strains was studied on agarised media (potato dextrose agar, glucose-peptone-yeast agar, Sabouraud dextrose agar and malt extract agar). Strain-specific features were emerged depending on the culture medium used. The following macromorphological features of Birch polypore strains in culture were described: structure (woolly, woolly-felt and felt) and color of colonies (mostly white), color of reversum (most often unchanged), tendency to form primordia (formed after 3 weeks of cultivation closer to the edge of colonies), ability to exhibit strain-specific variations (changes in pigmentation of colonies and reversum, zonation and density of colonies, rate of primordia formation) and their differences depending on the culture medium during solid-phase cultivation. The radial growth rate of the cultures ranged from 3.50 ± 0.33 to 8.75 ± 0.50 mm/day. Individual strains preferred different nutrient media: glucose-peptone-yeast agar provided maximum growth of *F. betulina* 2786, *F. betulina* 2366 grew best on Sabouraud-dextrose and potato-dextrose agar, and malt extract agar supported the growth of *F. betulina* 2775.

The influence of various liquid nutrient media (glucose-peptone-yeast, Sabouraud dextrose, potato dextrose and malt extract) on biomass formation and exopolysaccharide production levels in all the studied *F. betulina* strains was determined. The amount of grown mycelium mass varied from 2.28 ± 0.26 to 13.72 ± 0.05 g/l depending on the medium and specific culture. We also determined the levels of exopolysaccharides in *F. betulina* species for the first time, which ranged from 0.02 ± 0.00 to 2.20 ± 0.31 g/l. Based on screening of 22 strains according to their mycelium and exopolysaccharide production levels, the most promising strain, *F. betulina* 311, was identified. The Sabouraud dextrose liquid medium was suitable for its cultivation.

A series of experiments were conducted to determine the antagonistic activity of the Birch polypore fungus against opportunistic and parasitic fungi in dual culture. *F. betulina* strains were only inactive against *Cladobotryum mycophilum* (Oudem.)

W. Gams & Hooz. The antagonistic effect of *F. betulina* strains against the test cultures was ranked as follows: *Aspergillus fumigatus* Fresen. < *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. < *Penicillium polonicum* K. Zaleski < *Aspergillus niger* Tiegh. < *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. < *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát ≤ *Pichia kudriavzevii* Boidin, Pignal & Besson ≤ *Candida albicans* (C. P. Robin) Berkhout < *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I. C. Hallett. The antagonistic activity of *F. betulina* against *A. fumigatus*, *C. mycophillum*, *F. poae*, *H. annosum* and *M. nivale* was studied in dual culture for the first time. The antagonism index of the studied *F. betulina* cultures was calculated and ranged from 28.0 to 37.5. The highest index (37.5) was established for strain *F. betulina* 2771; high levels of antagonistic activity (antagonism index >35.0) were also shown by strains *F. betulina* 978, 989, 2364, 2770, and 2772.

The biosynthetic potential of Birch polypore strains was studied, i.e. the antibacterial and antioxidant activity of the ethyl acetate extracts of the mycelium and culture liquid, as well as the level of phenolic compounds. The strain-specific features of the biological activity of the studied cultures were determined according to the obtained data.

The antibacterial activity of *F. betulina* biomass and culture liquid extracts was demonstrated against all the test bacteria (gram-positive *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, and gram-negative *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*). The diameter of growth inhibition of the test microorganisms ranged from 8.0±0.0 to 22.5±0.5 mm. The widest range of activity was found in the culture liquid and mycelium extracts of *F. betulina* strains 978 and 2778.

The antioxidant activity of the mycelium and culture liquid extracts of the *F. betulina* strains was confirmed. The level of free radical inhibition ranged from 18.32±0.50% to 96.66±0.40% for the culture liquid and from 7.74±2.40% to 90.95±0.60% for the mycelium. *F. betulina* 2773 demonstrated the highest antioxidant activity in the culture liquid, and *F. betulina* 988 revealed the highest activity in the biomass. The strains *F. betulina* 2777 and 2778 are of interest as they

exhibited high ($\geq 80\%$) antioxidant activity in both the culture liquid and the mycelium.

The presence of phenolic compounds was confirmed in all *F. betulina* strains. The total phenolic content in the culture liquid extracts ranged from trace amounts (≤ 0.01 mg gallic acid equivalent (GAE) per g dry extract) to 8.57 ± 0.18 mg GAE/g dry extract, and in the mycelium extracts, it ranged from trace amounts to 5.48 ± 0.10 mg GAE/g dry mycelium. The highest concentrations of phenolic compounds were found in the mycelium extract of *F. betulina* strain 2771 and the culture liquid extract of strain 2777.

Based on the results of all the screening studies, strain *F. betulina* IBK 2777 was selected for further research into determining favourable cultivation parameters for increasing biomass accumulation, phenolic compound production and antioxidant activity enhancement.

The species verification of strain *F. betulina* 2777 was confirmed using molecular genetic methods. This guarantees the reproducibility of the results, making the strain reliable for further commercial use. The nucleotide sequences obtained for the ITS region of the rDNA were deposited in the international GenBank database under the accession number PQ184655.

After determining a suitable solvent for mycelium extraction, 70% ethanol was selected. To optimise the ratio of phenol production and mycelium, as well as obtain a high level of antioxidant activity, favourable cultivation parameters for *F. betulina* 2777 were established: an incubation method involving cultivation under static conditions; a temperature of 25 ± 2 °C; a pH of 6.0; a duration of 14 days; and a carbon source (xylose) and a nitrogen source (ammonium sulfate) in the culture medium. The results obtained create prerequisites for further research to determine the composition and structure of metabolites with antioxidant effects. This will allow further development of a product based on Birch polypore mycelium with high antioxidant efficiency.

Statistical analysis of the biomass, exopolysaccharides and phenolic compounds accumulation levels, as well as antibacterial and antioxidant activity rate

of 22 *F. betulina* strains, revealed several regularities. Notably, a strong (following Cohen's scale) positive correlation was observed between antioxidant activity levels and phenolic compound content in ethyl acetate extracts of mycelium ($r = 0,91$) and culture liquid ($r = 0,52$) from the studied strains. No significant correlations were found for the other biosynthetic parameters of the culture liquid extracts. Positive correlations of varying scale ($r = 0,24$ – $0,76$) were found between antibacterial activity against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*, antioxidant activity and the amount of phenols in mycelium extracts. Levels of biomass production were found to be negatively correlated (from $r = -0,04$ to $r = -0,48$) with biological activities (i.e. antioxidant and antibacterial activity against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*). A positive correlation ($r = 0,91$) was found between the phenol content in the mycelium and the biomass amount of the corresponding *F. betulina* strains. A slight positive correlation ($r = 0,32$ – $0,38$) was demonstrated between biomass and exopolysaccharides on two media: Sabouraud-dextrose and malt extract.

The correlation was calculated between the levels of mycelial mass accumulation, phenolic compound content and antioxidant activity in alcoholic (ethanol 70%) extracts of the *F. betulina* 2777 strain mycelium obtained under different cultivation conditions. A positive correlation ($r = 0,60$ – $0,74$) was established between the amount of biomass and the content of phenolic compounds at different temperatures and durations of cultivation under static or dynamic shaking conditions. However, the antioxidant activity did not correlate significantly with the phenol content. The influence of each cultivation parameter on *F. betulina* 2777 can be ranked as follows: temperature > duration of cultivation under static conditions > pH > duration of cultivation with dynamic shaking > carbon sources > nitrogen sources. Future studies of this species should focus on the ability of *F. betulina* to accumulate phenolic compounds, exopolysaccharides, endopolysaccharides, carotenoids, tocopherols and ascorbic acid, as well as other substances with antioxidant potential.

Thus, the strain-specific features of the polypore macrofungus *Fomitopsis betulina* biosynthetic activity were established under different cultivation conditions.

We emphasise the importance of an integrated approach to studying fungal biological activity, which should include analysing both endogenous and exogenous metabolites in order to fully reveal their biotechnological potential. The results obtained provide a scientifically robust foundation for the future exploitation of promising *F. betulina* strains as producers of exopolysaccharides, phenolic compounds, and metabolites with antimicrobial and antioxidant properties. This is particularly relevant for the development of new biomedical products, dietary supplements, and biocontrol agents. This research has significant practical applications and aligns with Ukraine's sustainable development priorities until 2030, contributing to the achievement of goals 3 (good health and well-being), 9 (industry, innovation, technology and infrastructure), 12 (responsible consumption and production) and 15 (life on land). Using macromycetes as sources of bioactive substances implements a bioeconomic approach with minimal environmental impact. Conserving and studying strain diversity emphasises the role of mycobiota in developing the national biotechnology industry and solving certain environmental and health problems.

Key words: macromycetes, *Fomitopsis betulina*, fungi extract, mycelial biomass, culture liquid, metabolites, antimicrobial and antioxidant activity, cultivation conditions, biocontrol.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті у періодичних виданнях

1. **Zaichenko T**, Barshteyn V, Sevindik M, Krupodorova T. Antibacterial and antioxidant activities of *Fomitopsis betulina* extracts. Open Agric J. 2025 Feb 20;19:e18743315375853. DOI: [10.2174/0118743315375853250213061411](https://doi.org/10.2174/0118743315375853250213061411) (Scopus Q3). (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробка результатів, написання статті).
2. **Kizitska T**, Barshteyn V, Sevindik M, Krupodorova T. Evaluation of *Fomitopsis betulina* strains for growth on different media and exopolysaccharide production.

Arch Biol Sci. 2024 July 2;76(3):257-65. DOI: [10.2298/ABS240523018K](https://doi.org/10.2298/ABS240523018K) (Scopus Q3). (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, в обробці результатів та у підготовці статті).

Тези доповідей у матеріалах конференцій

1. **Зайченко ТО.** Антагоністична активність окремих макроміцетів відносно деяких фітопатогенних грибів у дуальній культурі. В: Біологія рослин та біотехнології: збірка тез V конференції молодих учених; 2025 Трав 15-16; Київ. К.: ДУ «ІХБГ НАНУ»; 2025. с. 60.
2. **Зайченко ТО, Барштейн ВЮ, Круподьорова ТА.** Вплив умов культивування базидієвого гриба *Fomitopsis betulina* на антиоксидантну активність його міцелію. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Хохленкова НВ, Двінських НВ, Калюжная ОС, редактори. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали V міжнародної наук.-практ. конф; 2025 Берез 28; Харків. Х.: НФаУ; 2025. с. 190-2.
3. **Зайченко ТО, Барштейн ВЮ, Круподьорова ТА.** Вплив умов культивування на синтез фенольних сполук міцелієм макроміцета *Fomitopsis betulina*. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Філімонова НІ, Кошова ОЮ, редактори. «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині»: матеріали III науково-практичної міжнародної дистанційної конференції; 2025 Берез 21; Харків. Х.: НФаУ; 2025. с. 101-3.
4. **Кізіцька ТО, Круподьорова ТА.** Антагоністична активність штамів *Fomitopsis betulina* відносно рослинних патогенів *Microdochium nivale* та *Fusarium roae*. В: Біологія рослин та біотехнології: збірка тез IV конференції молодих учених; 2024 Трав 16-18; Київ. Київ: ДУ «ІХБГ НАНУ»; 2024. с. 59.
5. **Кізіцька ТО, Круподьорова ТА, Ратушняк ВВ, Барштейн ВЮ.** Особливості морфології штамів *Fomitopsis betulina* на агаризованих поживних середовищах. В: «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XVIII Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів і

- молодих вчених, 2024 Трав 17; Київ. Київ: КПП ім. Ігоря Сікорського; 2024. с. 102-4.
6. **Кізіцька ТО**, Круподьорова ТА, Барштейн ВЮ, Ратушняк ВВ. Антагоністична активність штамів *Fomitopsis betulina* відносно *Penicillium polonicum*. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Хохленкова НВ, Калюжная ОС, Двінських НВ, редактори. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали III міжнародної наук.-практ. інтернет-конф.; 2023 Берез 24; Харків. Х.: НФаУ; 2023. с. 200-2.
 7. **Kizitska TO**, Barshteyn VYu, Ratuchnuak VV, Krupodorova TA. Isolation of macromycete *Fomitopsis betulina* strains – potential producer of biologically active substances. In: Mankovska O, Papuga O, Nesterenko Ye, Sobolevskiy M, Antonenko S, editors. The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology; 2022 June 15-17; Kyiv, Ukraine. Kyiv: IMBG of NAS of Ukraine; 2022. p. 39.
 8. **Кізіцька ТО**, Круподьорова ТА, Барштейн ВЮ, Сабибін ОВ. Антагоністична активність штамів *Fomitopsis betulina* відносно *Cladobotrium mycophillum* та *Aspergillus fumigatus*. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Хохленкова НВ, Калюжная ОС, Двінських НВ, редактори. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали II міжнародної наук.-практ. інтернет-конф.; 2022 Трав 20; Харків. Х.: НФаУ; 2022. с. 127-8.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	19
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД СУЧАСНОГО СТАНУ ДОСЛІДЖЕНЬ МАКРОМІЦЕТА <i>FOMITOPSIS BETULINA</i> (BULL.) В.К. CUI, M.L. HAN & Y.C. DAI ТА ЙОГО БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ	29
1.1 Загальна характеристика <i>Fomitopsis betulina</i> (філогенетичне положення, морфологічна структура та біоекологічні особливості)	29
1.2 Терапевтичні властивості гриба <i>Fomitopsis betulina</i> та його біологічно активні сполуки	31
1.3 Біотехнологічні аспекти культивування <i>Fomitopsis betulina in vitro</i>	40
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	44
2.1 Штами <i>Fomitopsis betulina</i>	44
2.2 Молекулярно-генетичні дослідження	45
2.3 Тест-культури макро- та мікроміцетів і бактерій	46
2.4 Поживні середовища.....	47
2.5 Визначення показників росту і морфології	49
2.6 Визначення кількості екзополісахаридів	50
2.7 Оцінка антагоністичної активності	50
2.8 Екстракція міцеліальної маси та культуральної рідини.....	52
2.9 Визначення антибактеріальної активності	53
2.10 Оцінка антиоксидантної активності.....	53
2.11 Визначення вмісту фенольних сполук.....	54
2.12 Встановлення впливу умов культивування	55
2.13 Статистична обробка результатів.....	56
РОЗДІЛ 3. МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА КУЛЬТУРАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ШТАМІВ <i>FOMITOPSIS BETULINA</i>	58
3.1 Виділення нових штамів <i>Fomitopsis betulina</i>	58
3.2 Макроморфологічні особливості колоній	61

3.3 Швидкість радіального росту міцеліальних колоній	64
3.4 Рівень накопичення міцеліальної маси	67
3.5 Рівень накопичення екзополісахаридів	70
РОЗДІЛ 4. АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ <i>FOMITOPSIS BETULINA</i> ВІДНОСНО ДЕЯКИХ МІКРО- ТА МАКРОМІЦЕТІВ	76
4.1 Штамоспецифічні реакції взаємодій <i>Fomitopsis betulina</i> і <i>Cladobotryum mycophilum</i>	77
4.2 Штамоспецифічні реакції взаємодій <i>Fomitopsis betulina</i> і <i>Aspergillus</i> spp.	79
4.3 Штамоспецифічні реакції взаємодій <i>Fomitopsis betulina</i> і <i>Penicillium polonicum</i>	83
4.4 Штамоспецифічні реакції взаємодій <i>Fomitopsis betulina</i> і фітопатогенних видів	87
4.5 Штамоспецифічні реакції взаємодій <i>Fomitopsis betulina</i> і <i>Sacharomycetaceae</i>	91
4.6 Антагоністична активність <i>Fomitopsis betulina</i> відносно макроміцетів.....	97
4.7 Оцінка загальної антагоністичної активності <i>F. betulina</i>	105
РОЗДІЛ 5. БІОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ <i>FOMOTOPSIS BETULINA</i>	111
5.1 Антибактеріальна активність	112
5.2 Антиоксидантна активність	119
5.3 Вміст фенольних сполук	122
5.4 Кореляція між параметрами біосинтезу	123
РОЗДІЛ 6. ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМУ <i>FOMITOPSIS BETULINA</i> ІВК 2777 З МЕТОЮ ПІДВИЩЕННЯ РІВНЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ТА ЗАГАЛЬНОГО ВМІСТУ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК	129
6.1 Вибір штаму для оптимізації процесу культивування	129
6.2 Вибір розчинника для екстракції міцеліальної маси	132
6.3 Визначення оптимальної температури інкубації	135
6.4 Оцінка ефективності способу та тривалості культивування	137

6.5 Вплив джерел вуглецю у поживному середовищі.....	141
6.6 Вплив джерел азоту у поживному середовищі	145
6.7 Визначення оптимального рівня рН поживного середовища	149
6.8 Кореляція між рівнями накопичення міцеліальної маси, фенольних сполук та величиною АОА за різних умов культивування	152
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	158
ВИСНОВКИ	168
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	171
ДОДАТОК А.....	192
ДОДАТОК Б	195
ДОДАТОК В	196
ДОДАТОК Г	197

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АА – антагоністична активність

АБ – амарантове борошно

АБА – антибактеріальна активність

АІ – антагоністичний індекс

АОА – антиоксидантна активність

БАР – біологічно активні речовини

ВФС – вміст фенольних сполук

ГА – глюкозо-аспарагінове рідке середовище

ГПД – глюкозо-пептон-дріжджове рідке середовище

ГПДА – глюкозо-пептон-дріжджовий агар

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЕГК – еквівалент галової кислоти

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ЕПС – екстрацелюлярні полісахариди (екзополісахариди)

КГА – картопляно-глюкозний агар

КД – картопляно-декстрозне рідке середовище

КДА – картопляно-декстрозний агар

КР – культуральна рідина

КУО – колонієутворювальна одиниця

МБК – мінімальна бактерицидна концентрація

МЕ – рідке середовище з мальт-екстрактом

МЕА – мальт-екстракт агар

МІК – мінімальна інгібувальна концентрація

ММ – міцеліальна маса

МХА – агаризоване середовище Мюллера-Хінтона

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ПС – поживне середовище

рДНК – рибосомальна ДНК

СД – Сабуро-декстрозне рідке середовище

СДА – Сабуро-декстрозний агар

ТЕ-буфер – буфер, який містить Трис-НCl та ЕДТА

Трис-НCl – Трис(гідроксиметил)амінометан гідрохлорид

УФ – ультрафіолет

ABTS – 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонова кислота)

BLAST – базовий інструмент пошуку локального вирівнювання (Basic Local Alignment Search Tool)

DPPH – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідазил

FRAP – залізовідновлювальна антиоксидантна здатність (ferric reducing antioxidant power)

GR – швидкість росту міцелію (growth rate)

GR_{avr} – середня швидкість росту міцелію (average growth rate)

IC₅₀ – концентрація напівмаксимального інгібування (half maximal inhibitory concentration)

ITS – внутрішній транскрибований спейсер (internal transcribed spacer)

NCBI – Національний центр біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnological Information)

pH – водневий показник (*pondus Hydrogenii*)

PI – відсоток інгібування росту гриба (percentage inhibition)

RGR – радіальна швидкість росту (radial growth rate)

Vr – радіальна швидкість росту

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Завдяки швидкому накопиченню біомаси та здатності до синтезу різноманітних біологічно активних речовин гриби широко використовуються як продукти харчування та об'єкти біотехнологічної промисловості. Значна кількість представників царства Fungi, зокрема макроміцети, є потенційним джерелом біологічно активних сполук. На рівні з лікарськими рослинами, базидіоміцети використовувалися у народній медицині протягом століть по всьому світу.

Одним із відомих базидієвих грибів із терапевтичною активністю є *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai (раніше відомий як *Piptoporus betulinus*), або ж березова губка [1-3]. Плодові тіла цього виду застосовувалися в народній медицині протягом багатьох століть. У традиційній медицині *F. betulina* використовувався як антимікробний та антипаразитарний засіб. Також його використовували для лікування ран, ректальних новоутворень та захворювань шлунково-кишкового тракту [1,4]. Сучасні дослідження підтвердили протипухлинну, протизапальну, противірусну, антимікробну, антиоксидантну та протималарійну активності *F. betulina* [1-3,5-7]. Результати досліджень цитотоксичної активності цього гриба демонструють, що екстракти плодових тіл, зокрема етанольний та метанольний, проявляють селективну цитотоксичність щодо злоякісних клітин, характеризуючись мінімальним впливом на нормальні клітини [6]. Біологічна активність *F. betulina* зумовлена наявністю широкого спектра біологічно активних сполук. Li et al. [3] систематизували дані про 109 вторинних метаболітів та низькомолекулярних речовин, ідентифікованих у плодових тілах *F. betulina* (96 сполук) та міцеліальній біомасі (13 сполук). Ці речовини належать до різних груп: найчастіше трапляються дані про тритерпени (поліпоренові кислоти, ланостани, фомефіцинова кислота, бетулін, бетулінова кислота, пероксид ергостеролу, тумулозові та піптолінові кислоти тощо), тетратерпени (лікопен, β -каротин), полісахариди (глюкани), органічні кислоти (аскорбінова кислота), четвертинні

аміни (піптамін), феноли (гідрохінони, токофероли), зокрема і фенольні кислоти (сирінгова, галова, 5-гідроксибензойна, протокатехова, хлорогенова та ін.). Рідше згадується про сексві-, ди- і монотерпени, похідні індолу, жирні кислоти, кетони, альдегіди, спирти [2,3,5,8-10].

Більшість досліджень проведено на плодових тілах *F. betulina*, тоді як менше уваги приділялося міцелію та рідкій культурі. Деякі дослідження, зокрема в Україні, були присвячені росту міцелію *F. betulina*: морфологічним та культуральним властивостям гриба на агаризованих середовищах [11], впливу умов культивування та ультрафіолетового (UVC) опромінення на його ріст та антибактеріальну активність [12-15], а також впливу різних джерел вуглецю та азоту і рН середовища на ріст 11 штамів *F. betulina* [16].

Біосинтетична активність природних плодових тіл та міцелію, культивованого *in vitro*, демонструє певні відмінності [1,3,8]. Однак, якщо стандартизувати умови вирощування міцеліальних культур, розбіжності у синтезі біологічно активних сполук суттєво зменшуються. Використання чистих культур макроміцетів у біотехнологічних та медичних цілях є перспективним і відтворюваним методом, що забезпечує ефективну продукцію грибної біомаси та її метаболітів [8]. У зв'язку з цим, дослідження *Fomitopsis betulina* в умовах культури є актуальним. Встановлення оптимальних умов інкубації, з урахуванням біологічних характеристик гриба, дозволить досягти максимальної продуктивності міцелію та культуральної рідини з найвищою біологічною активністю. Врахування штамоспецифічних відмінностей є критично важливим, оскільки різні штами можуть демонструвати значні варіації в рості, метаболічній активності та синтезі біологічно активних сполук. Це визначає актуальність та перспективність проведених досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у рамках науково-дослідних робіт відділу рослинних харчових продуктів та біофортифікації Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» (м. Київ). Роботу виконано в рамках держбюджетних тематик:

«Штамоспецифічні особливості росту та синтезу метаболітів перспективних видів базидієвих грибів за різних умов культивування» (№ ДР 0112U000435, 2021–2023 рр.), «Скринінг базидієвих грибів з високою антиоксидантною активністю, перспективних для підвищення захисних сил організму людини» (№ ДР 0124U002425, 2024–2025 рр.).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – дослідити біологічні особливості штамів *F. betulina* в культурі *in vitro*.

Для досягнення поставленої мети сформульовано такі завдання:

- виділити нові штами *F. betulina* з плодових тіл, зібраних в ареалі їх поширення;
- встановити вплив поживних середовищ на культурально-морфологічні особливості штамів *F. betulina*;
- провести скринінг штамів *F. betulina* за швидкістю росту вегетативного міцелію, накопиченням біомаси та екзополісахаридів;
- оцінити антагоністичну активність штамів *F. betulina*;
- встановити антибактеріальну активність міцелію та культуральної рідини штамів *F. betulina*;
- встановити антиоксидантну активність міцелію та культуральної рідини штамів *F. betulina*;
- визначити рівень вмісту фенольних сполук в міцелії та культуральній рідині штамів *F. betulina*;
- встановити вплив умов культивування на накопичення біомаси, фенольних сполук та антиоксидантну активність біотехнологічно перспективного штаму.

Об'єкт дослідження – штамоспецифічні особливості *F. betulina* за різних умов вирощування.

Предмет дослідження – особливості культивування, накопичення міцеліальної біомаси та біологічно активних метаболітів штамами *F. betulina*.

Методи дослідження. Використовували світлову мікроскопію, біотехнологічні та мікологічні методи (виділення нових штамів *F. betulina*,

культивування *F. betulina* й інших макро- та мікроміцетів *in vitro*, визначення антагоністичної активності, модифікація умов культивування *F. betulina*); мікробіологічні методи (встановлення антибактеріальної активності, культивування бактерій *in vitro*); фізико-хімічні методи (рН-метрія, спектрофотометрія у видимій та ультрафіолетовій областях); хімічні методи (якісні та кількісні реакції, екстракція, гравіметрія); молекулярно-генетичні методи (електрофорез, полімеразна ланцюгова реакція, секвенування). Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel та онлайн-ресурсу Statistics Kingdom [17].

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведене комплексне дослідження штамоспецифічної біосинтетичної активності базидієвого гриба *F. betulina* за різних умов культивування.

Інтродуковано в культуру 11 ізолятів *F. betulina*, отриманих із дикорослих плодових тіл, що становить вагомий внесок у збереження та дослідження біорізноманіття мікобіоти, а також розширює уявлення про екологічну пластичність та адаптаційний потенціал цього виду.

Вперше встановлено здатність штамів березової губки накопичувати екзогенні полісахариди у культурі на різних поживних середовищах та фенольні сполуки у культуральній рідині.

Уперше у подвійній культурі встановлено антагоністичну активність *F. betulina* відносно *Aspergillus fumigatus* Fresen, *Cladobotryum mycophilum* (Oudem.) W. Gams & Hooz., *Fusarium poae* (Peck) Wollenw, *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallett.

Вперше охарактеризовано вплив параметрів культивування (рН, температури, джерел вуглецю та азоту, тривалості статичного та динамічного культивування) на рівень антиоксидантної активності та вміст фенольних сполук міцелію березової губки *F. betulina* 2777 *in vitro*.

Вперше обраховано кореляційні взаємозв'язки для *F. betulina* між кількома параметрами одночасно: антибактеріальною, антиоксидантною активністю, вмістом фенольних сполук, накопиченням біомаси та

екзополісахаридів. Обчислення проведене для 22 досліджених штамів і для біотехнологічно перспективного штаму *F. betulina* 2777, який культивували за різних умов. Цей підхід дозволив комплексно охарактеризувати метаболічний профіль штамів та визначити перспективні умови культивування для отримання біологічно активних сполук.

Практичне значення одержаних результатів. Одинадцять нових штамів *F. betulina* передано до Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК) (Акт приймання-передачі від 21.04.2025), що сприяє збереженню цінного генофонду та створює підґрунтя для подальших фундаментальних і прикладних біотехнологічних досліджень.

Видову приналежність штаму *F. betulina* 2777 підтверджено молекулярно-генетичними методами (реєстраційний номер PQ184655 у GenBank), що гарантує відтворюваність результатів та надійність для подальшого комерційного застосування.

Дослідження впливу умов культивування на біологічну активність *F. betulina* 2777 є критично важливим для цілеспрямованого використання штаму як біотехнологічного продуцента антиоксидантних метаболітів та подальшого масштабування їхнього отримання.

Штам *F. betulina* 2777 впроваджено у виробничий процес на підприємстві «Царство грибів» (ТОВ «ЕСМАШ-3», м. Київ). Встановлено, що регульоване внесення джерел вуглецю та азоту у поєднанні з контрольованими параметрами рН і температури забезпечує оптимальні умови для інтенсивного обростання субстрату міцелієм, що сприяє скороченню тривалості виробничого циклу, зниженню енергозатрат і підвищенню якості посівного матеріалу (Акт впровадження від 13.04.2025). Отримані результати мають практичне значення для подальшого використання культури у біотехнологічних процесах на промисловому рівні.

Наукові та прикладні результати дисертаційної роботи можуть бути використані науковцями, викладачами, аспірантами та здобувачами освіти біологічного та біотехнологічного профілю.

Особистий внесок здобувача. Обрання теми роботи, постановку мети та завдань досліджень, аналіз отриманих результатів, планування структури дисертаційної роботи та підготовку публікацій за результатами проведених досліджень здійснено спільно з науковим керівником к.б.н., с.н.с. Круподьоровою Т. А.

Безпосередньо авторкою здійснено пошук та аналіз літературних джерел за темою дисертації, а також основні експериментальні дослідження (виділення чистих культур, скринінги штамів *F. betulina* за ростовими, біосинтетичними характеристиками і біологічною активністю, оптимізація умов культивування відібраного штаму).

Наукові роботи опубліковані у співавторстві з к.б.н., с.н.с. Круподьоровою Т. А., к.т.н., с.н.с. Барштейном В. Ю., доктором філософії (PhD), доцентом Севендіком М., с.н.с. Ратушняком В. В. та провідним інженером Сабибіним О. В. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, пошукачу належить фактичний матеріал і основний творчий доробок. Обсяг особистого внеску здобувача в підготовку публікацій, що увійшли до дисертації, становить 80 %.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи опубліковано на: V конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнології» (Київ, Україна, 2025); V міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, Україна, 2025); V науково-практичній міжнародній дистанційній конференції «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині» (Харків, Україна, 2025); IV конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнології» (Київ, Україна, 2024); XVIII міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» (Київ, Україна, 2024); III міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, Україна, 2023); The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology (Київ, Україна, 2022); II міжнародній

науково-практичній інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, Україна, 2022).

Публікації. Під час виконання дисертаційного дослідження опубліковано 10 робіт, зокрема 2 статті в періодичних виданнях, індексованих у міжнародній наукометричній базі даних Scopus **Q3**, 8 тез доповідей на наукових конференціях.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 197 сторінках машинописного тексту і складається зі вступу, 6 розділів, узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел та 4 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 170 сторінок друкованого тексту. Робота містить 6 таблиць та 48 рисунків. Список використаних джерел містить 174 найменування, з яких 25 кирилицею та 149 латиницею.

Авторка висловлює особливу подяку науковій керівниці к.б.н., с.н.с. Тетяні Анатоліївні Круподьоровій за вагому допомогу у проведенні теоретичних та експериментальних досліджень і за ґрунтовне консультування в обговоренні результатів та висновків.

Також авторка виражає вдячність керівництву та співробітникам відділу рослинних харчових продуктів та біофортифікації за матеріально-технічну допомогу у проведенні дослідів, за співавторство у написанні публікацій і за влучні зауваження по роботі.

Авторка вдячна д.б.н., проф., Ніні Анатоліївні Бісько за люб'язно надані штами макроміцетів із Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки Національної Академії наук України імені М.Г. Холодного Національної академії наук України (м. Київ, Україна).

Неймовірна вдячність Силам безпеки й оборони України, волонтерам та усім небайдужим громадянам за можливість далі жити й працювати!

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД СУЧАСНОГО СТАНУ ДОСЛІДЖЕНЬ МАКРОМІЦЕТА *FOMITOPSIS BETULINA* (BULL.) B.K. CUI, M.L. HAN & Y.C. DAI ТА ЙОГО БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

Аналіз сучасного стану вивчення *Fomitopsis betulina* свідчить про наявність значного наукового інтересу до цього виду з боку фахівців різних галузей. Водночас встановлено, що дослідження є переважно несистемними та епізодичними, що підкреслює необхідність цілісного й структурованого наукового підходу до вивчення цього виду.

1.1 Загальна характеристика *Fomitopsis betulina* (філогенетичне положення, морфологічна структура та біоекологічні особливості)

Згідно з аналізом даних літератури [18], *Fomitopsis betulina* (Bull.) B. K. Cui, M. L. Han & Y. C. Dai (березова губка, березовий трутовик, фомітопсис березовий, піптопор березовий) є одним із перспективних видів грибів для дослідження. У сучасній систематиці цей вид належить до царства Гриби (Fungi), відділу Базидіомікота (Basidiomycota), класу Агарикоміцети (Agaricomycetes), порядку Поліпоральні (Polyporales), родини Фомітопсидові (Fomitopsidaceae) та роду Фомітопсис (Fomitopsis), до якого він був перенесений на основі проведених молекулярно-філогенетичних досліджень (аналіз послідовностей ДНК, зокрема ITS та LSU) [19,20].

Раніше цей гриб тривалий час був відомий під назвою *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst., рідше під іншими назвами (синонімами) [2]:

- *Agarico-pulpa pseudoagaricon* Paulet,
- *Boletus betulinus* Bull.,
- *Fomes betulinus* (Bull.) Gillot & Lucand,
- *Polyporus betulinus* (Bull.) Fr.,
- *Placodes betulinus* (Bull.) Quél.,
- *Ungularia betulina* (Bull.) Lázaro Ibiza,

- *Ungulina betulina* (Bull.) Pat.

Трутовик березова губка широко розповсюджений по всьому світу, особливо в північних помірних зонах Європи, Північної Америки та Азії. Згідно з класифікацією Червоного списку Міжнародного союзу охорони природи (IUCN Red List Categories), лише у Латвії статус *F. betulina* визначено як LC (Least Concern) – вид з найменшим ризиком вимирання [21]. Це макроміцет, який спричиняє буру гниль деревини беріз [22]. Спочатку руйнується серцевинна частина стовбура, потім заболонь [23] утворюючи коричневі, кубічні тріщини, які легко розщеплюються. Здебільшого паразитує в листяних та мішаних лісах, на повалених, сухостійних мертвих та живих деревах та гілках *Betula* spp.: *Betula pendula* Roth., *B. pubescens* Ehrh., *B. papyrifera* Marsh. і *B. obscura* Kotula [1].

Попри наявність окремих літературних згадок [2,24] щодо потенційної можливості вживання молодих плодових тіл (карпофорів), *F. betulina* належить до неїстівних видів. Органолептично він характеризується злегка гіркуватим присмаком, сильним приємним ароматом та терпким гірко-кислим смаком. Карпофори є однорічними (рис. 1.1), мають форму бічних шапок, що варіюють за морфологією: від випукло-подушковидних до приплюснуто-копитовидних, округлих або ниркоподібних, досягаючи 5–20 (до 30) см у діаметрі та 2–6 см у товщину.



Рис. 1.1. Плодове тіло березової губки (Національний природний парк «Голосіївський», Святошинсько-Біличанський масив, листопад 2021 р.)

Карпофори сидячі або з псевдоніжкою, характеризуються жорсткою, дерев'янистою консистенцією та білувато-засмаглою або рожевуватою поровою поверхнею з переважно дрібними та регулярними порами; гіменофор трубчастий. Плодові тіла розвиваються поодинокі або невеликими групами, вкриті лакунарною, гладкою кіркою (яка з віком може розтріскуватися), без зональності; на ранніх стадіях розвитку мають кремове або біле забарвлення, з віком набуваючи охристо-коричневих або сірувато-коричневих відтінків.

1.2 Терапевтичні властивості гриба *Fomitopsis betulina* та його біологічно активні сполуки

Плодові тіла *F. betulina* містять біологічно активні речовини (БАР) із цінними лікувальними властивостями. Терапевтичні властивості *F. betulina* мають глибоке історичне коріння, що підтверджується знахідкою фрагментів цього гриба серед спорядження Еці (Ötzi), крижаної мумії людини, яка жила понад 5300 років тому та була виявлена під час археологічних розкопок в Альпах [1]. Широко використовували плодові тіла в народній медицині як антисептик у країнах Балтії [25], є такі згадки і для Європи та США [26,27]. Традиційно застосовували цей трутовик також при лікуванні різних видів раку, як імуностимулювальний, протипаразитарний засіб, при шлунково-кишкових розладах [26,28-31], а також – для зупинки кровотечі [26,29,31].

Слід наголосити, що практично всі згадані вище терапевтичні застосування отримали підтвердження в результаті наукових досліджень. Аналіз терапевтичних властивостей та біологічно активних метаболітів *F. betulina* систематизовано у вичерпних оглядах різних років [1-3,18,24,26]. Результати оглядів свідчать, що *F. betulina* є багатим джерелом біологічно активних сполук, проте особливе значення мають полісахариди, терпени, органічні кислоти та їхні похідні, поряд з іншими компонентами, такими як протеїни, глікопротеїнові комплекси, ферменти та пігменти. Загалом, ідентифіковано вже понад 100 вторинних метаболітів *F. betulina* [3]. Встановлено 47 різних тритерпенів ланостанового типу та виявлено наявність трьох типів ергостанових та двох

типів тритерпенів лупанового ряду, що ще більше підкреслює хімічне різноманіття метаболічного профілю цього виду. Зазначимо, що із культуральної рідини *F. betulina* виділено три сесквітерпени, зокрема один трициклічний сесквітерпен – криптосфераолід В (рис. 1.2 А), і два біциклічних сесквітерпени (рис. 1.2 Б, В), сім дитерпенів (рис. 1.2 Г–И) [32].

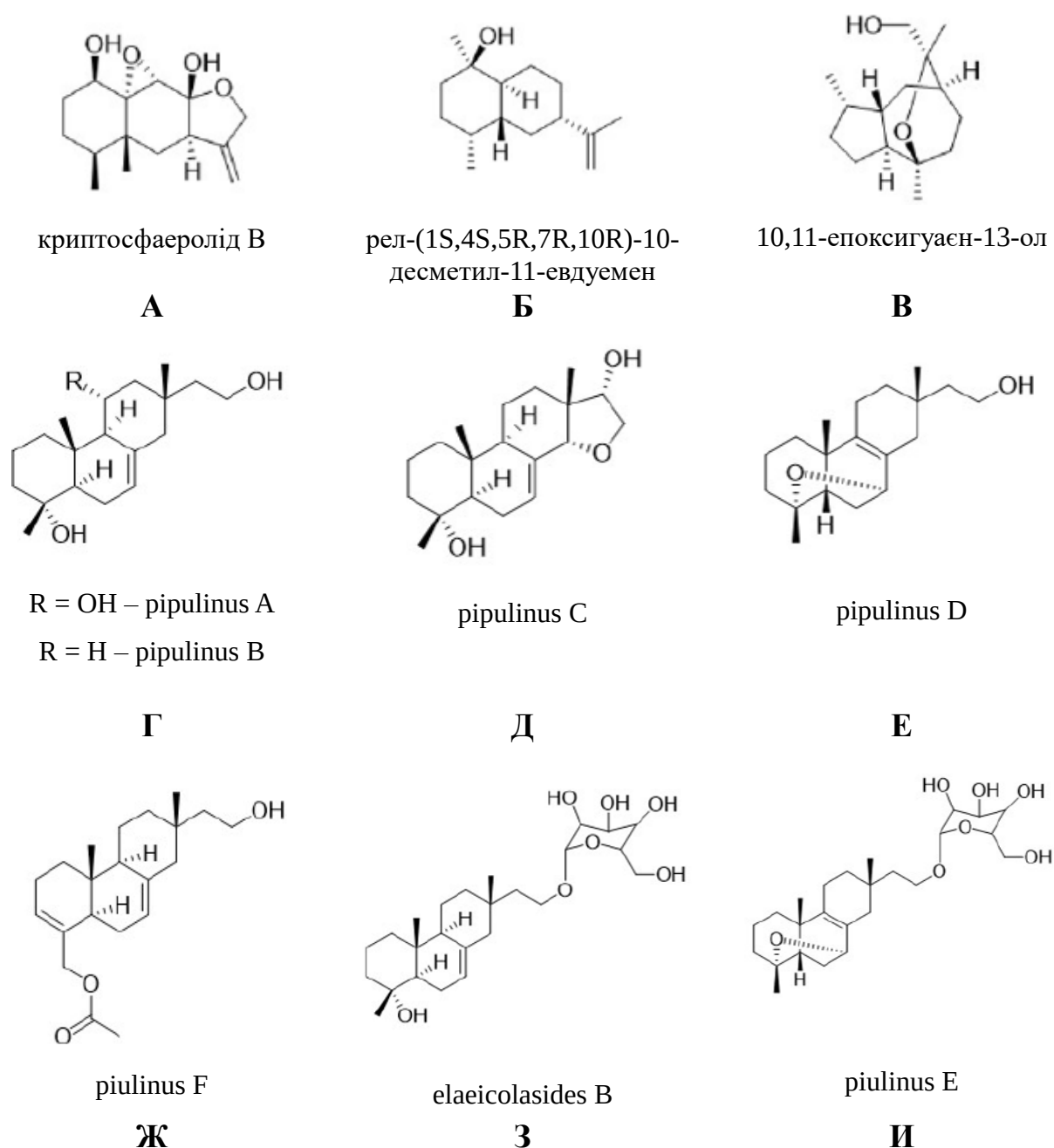


Рис. 1.2. Хімічна структура терпенів *F. betulina* [32]: сесквітерпени (А–В), дитерпени (Г–И)

Ці природні метаболіти гриба демонструють широкий спектр терапевтичної активності. До прикладу, значна увага дослідників була зосереджена на вивченні протипухлинної дії. Встановлено її наявність в екстрактах березової губки на різних моделях раку, включаючи клітини Hela (рак шийки матки), A549 (карцинома легень людини), HT-29 (аденокарцинома ободової кишки) та C6 (гліома щура), 3L мишачої карциноми легень Льюїса і клітини лімфоцитарної лейкемії L1210, карциноми щитовидної залози людини FTC238, нейробластоми SK-N-AS, карциноми молочної залози T47D, карциноми гортані Нер-2 [1]. Описано лише фрагментарні результати протипухлинної та цитотоксичної активності міцелію цього макроміцета. Загалом у *F. betulina* ідентифіковано 18 терпенів, які мають підтверджену протиракову дію [3]. Продемонстровано антипроліферативну активність міцелію березової губки, що проявлялася у здатності ефірного та спиртового екстрактів знижувати життєздатність, частково пригнічувати проліферацію та адгезію клітин аденокарциноми товстої кишки [33]. Етилацетатний екстракт міцелію позитивно впливав на підвищення життєздатності клітин лінії кератиноцитів (HaCaT) та послаблював арешт клітинного циклу в фазі G0/G1, індукований сироватковим голодуванням [34]. Це свідчить про наявність проліферативної або цитопротекторної активності екстракту, а також може вказувати на потенційні ранозагоювальні або регенеративні властивості, що особливо важливо для кератиноцитів з метою регенерації шкіри.

Не менш важливим напрямом досліджень є антиоксидантний потенціал грибів. Активні форми кисню та активні форми азоту – це вільні радикали, здатні до руйнації здорових клітин організму. Дисбаланс внаслідок надлишкового утворення вільних радикалів відомий як окислювальний стрес, який є основним фактором старіння та розвитку низки дегенеративних захворювань у людини [35]. Деякими дослідниками підтверджено наявність антиоксидантної активності *F. betulina* за допомогою низки методів, включаючи реакцію з 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом (DPPH) [9,36-40] та 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфоною) (ABTS) [37], визначення

відновлювальної здатності за методом FRAP [36,38,41] та знебарвлення β -каротину [38]. Антиоксидантну активність обумовлюють такі сполуки: α -, β -, γ -, δ -токоферолі; аскорбінова кислота; β -каротин; лікопен [9,38]; *n*-гідроксибензойна кислота; протокатехова кислота; ванілінова кислота [9,41]. Здатність *F. betulina* знешкоджувати вільний радикал DPPH була відзначена нещодавно у двох дослідженнях: щодо екстрактів міцелію [39,42] та культуральної рідини [39].

Ряд робіт присвячено вивченню протизапальної активності *F. betulina* [36,43,44]. На сьогодні відомо про 17 сполук з протизапальними властивостями, ідентифікованих у *F. betulina* [3]. Шість тритерпенових кислот демонстрували інгібувальний вплив на набряк вух мишей, індукований 12-О-тетрадеканоїлфторбол-13-ацетатом [43]. Три поліпоренові кислоти продемонстрували різний рівень протизапальної активності [44]. Зокрема, спостерігалось значне інгібування 3α -гідроксистероїддегідрогенази (3α -HSD) за методом Пеннінга та гіалуронатліази із застосуванням N-цетил-N-триметиламонію броміду за методом Ферранте, а також помірне пригнічення активності циклооксигенази-1. В екстракті плодового тіла *F. betulina*, отриманому за допомогою гарячого лугу, виявлено інгібувальну активність щодо ангіотензинперетворювального ферменту [36].

Наразі існує нагальна потреба в розробці нових антибактеріальних препаратів через постійну появу патогенів, які набувають мультирезистентність до існуючих антибіотиків, а також через виявлення нових видів збудників інфекцій. Дослідники особливо зацікавлені в препаратах, отриманих з природних джерел, які проявляють антибактеріальну активність і мають мінімальні побічні ефекти. Увагу дослідників також зосереджено на вивченні антимікробної активності березової губки. Значну кількість робіт присвячено вивченню антибактеріальної активності *F. betulina*, що підсумовано в огляді Pleszczyńska et al. [1]. У ньому зазначено здатність різних екстрактів інгібувати ріст таких бактерій, як *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Brucella* sp., *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Rhodococcus equi, *Sarcina lutea*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*. В огляді Li et al. [3] наведено п'ять сполук з антибактеріальною активністю з *F. betulina*.

Зазначимо, що антибактеріальна активність міцелію та культуральної рідини вивчалася лише фрагментарно. Встановлено здатність культуральної рідини *F. betulina* (штам 327 IBK) пригнічувати ріст еталонних бактерій *B. subtilis* і *S. aureus* [12,13,15], *E. coli* [12,13], *P. aeruginosa* та клінічних поліризистентних ізолятів *S. aureus* 22/824 MRSA, *S. haemoliticus* 134/3569 MRCNS, *P. aeruginosa* 99/3066 MBL, *P. aeruginosa* 125/3343 MBL, *E. coli* 116/3196 KPC, *Klebsiella pneumoniae* 6/509 ESBL, AmpC, KPC, *Acinetobacter baumannii* 50/1496 MBL, *A. baumannii* 88/2995 MBL [14]. Антибактеріальна активність міцелію цього ж штаму гриба здатна була пригнічувати ріст еталонних тест-бактерій *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* [13]. Вивчалися також й інші штами *F. betulina* з колекції IBK. У дослідженні Михайлової [42] етилацетатні екстракти культуральної рідини та спиртові (етанол 70 %) екстракти міцелію чотирьох штамів пригнічували ріст *B. subtilis*, *E. coli* і *S. aureus*, але також одна із цих культур (*F. betulina* IBK 2020) проявила здатність до інгібування *P. aeruginosa* екстрактом міцелію.

У дослідженні Alresly [45] здійснене порівняння антимікробної активності плодових тіл березової губки, а також інтродукованого в культуру міцелію й культуральної рідини. Метанольні та гексанові екстракти плодових тіл і метанольні екстракти міцелію пригнічували ріст *B. subtilis* і *S. aureus*. Зазначимо, що метанольний екстракт міцелію зокрема був здатний до інгібування *P. aeruginosa*, а метанольний екстракт плодових тіл діяв додатково на *E. coli*. В свою чергу, етилацетатні екстракти культуральної рідини проявили найширший спектр дії проти всіх вказаних тест-бактерій.

Під час фітохімічного дослідження етилацетатного екстракту плодових тіл *F. betulina* [46] виділили новий біоактивний тритерпен ланостан, ідентифікований як 3 β -ацетокси-16-гідрокси-24-оксо-5 α -ланоста-8-ен-21-оєва кислота. Крім того, десять відомих тритерпенів, а саме поліпоренова кислота А,

поліпоренова кислота С, три похідні поліпоренової кислоти А, бетулінова кислота, бетулін, пероксид ергостеролу, 9,11-дегідроергостерол пероксид та фомефіцинова кислота також були виділені з карпофорів. Всі ізольовані сполуки були протестовані на антимікробну активність щодо деяких грампозитивних та грамнегативних бактерій. Нововиявлений тритерпен та деякі інші сполуки показали антимікробну активність щодо грампозитивних бактерій *B. subtilis* та *S. aureus*. Щодо грамнегативних *E. coli* та *P. aeruginosa* новий тритерпен виявив незначну активність.

Ряд досліджень продемонстрували наявність антимікотичної активності *F. betulina*. Для спиртових екстрактів плодових тіл визначили мінімальну інгібувальну концентрацію 0,5–1,0 мг/мл відносно *Absidia coerulea* Bainier (синонім *Absidia orchidis* (Vuill.) Hagem) [47]. Методом дифузії в агар показано, що екстракт плодового тіла пригнічував ріст *Saccharomyces cerevisiae* (Desm.) Meyen й *Aspergillus fumigatus* [48], тоді як ізольована з культуральної рідини гриба речовина – піптамін (рис. 1.3) – інгібувала ріст *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout, *Kluyveromyces marxianus* (E.C. Hansen) Van der Walt, *Rhodotorula rubra* (Schimon) F.C. Harrison, *Sporobolomyces salmonicolor* B. Fisch. & Brebeck ex Kluyver & C.B. Niel, *Penicillium notatum* Westling [5]. Варто згадати, що піптамін володіє також і антибактеріальними властивостями [5]. Також культуральна рідина, екстрагована за допомогою етилацетату, була активною відносно *C. maltosa* Komag., Nakase & Katsuya [45].



Рис. 1.3. Хімічна структура піптаміну, ізольованого із культуральної рідини *F. betulina* [5]

Методом сумісного культивування встановлено антифунгальний потенціал міцелію *F. betulina* (штам 327 IBK) щодо пригнічення росту *Issatchenkia orientalis* Kudryavtsev (сучасна назва *Pichia kudriavzevii* Boidin, Pignal & Besson, також відомий синонім *Candida krusei* (Castell.) Berkhout), різних штамів *C. albicans* [49], *Aspergillus niger* Tiegh. і *Penicillium polonicum* K. Zaleski [50]. Березова губка також проявляла здатність у подвійній культурі і до конкуренції з макроміцетами, зокрема чагою – *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát [51].

Противірусну активність плодових тіл *F. betulina* щодо вірусу герпесу, грипу, поліовірусу та вірусу везикулярного стоматиту систематизовано в огляді Sevindik та співавторів [7].

Нейропротекторна активність плодових тіл березової губки вивчалася епізодично. Встановлено *in vitro*, що спиртові та ефірні екстракти проявляють здатність захищати нейрони від пошкоджень, індукованих цисплатином, трофічним стресом та екситотоксичністю [52].

Особливої уваги заслуговує дослідження, присвячене вивченню хімічного складу та біологічної активності екстрактів з плодових тіл та міцелію *F. betulina* [8]. Встановлено, що загальний вміст фенольних кислот міцелію становив 22,56 мг на 100 г сухої маси (СМ), тоді як у плодових тілах – 37,08 мг/100 г СМ. У зразках міцелію та плодових тіл ідентифіковано сиринову, галову, 5-гідроксибензойну та 3,4-дигідрофенілоцтову кислоти. У міцелії та плодових тілах визначено одинадцять жирних кислот. Виявлено, що вміст індивідуальних жирних кислот у екстрактах, отриманих з біомаси міцелію, варіював у широкому діапазоні: від приблизно 35,8 % (пальмітинова кислота) до 0,4 % (пальмітоолеїнова кислота). У екстрактах із плодових тіл концентрація цих сполук коливалася від 41,6 % (стеаринова кислота) до 0,4 % (цис-10-пентадеканова кислота). Вміст пальмітинової кислоти в екстрактах з біомаси був у 2,5 рази вищим, а міристинової кислоти – у 9 разів вищим порівняно з екстрактами з плодових тіл. Особливо показовим є те, що вміст лінолевої кислоти в екстрактах з міцеліальних культур перевищував аналогічний

показник для плодових тіл у 23 рази. Екстракт міцелію продемонстрував значну цитотоксичну активність відносно клітин раку передміхурової залози. Натомість, екстракт плодових тіл виявив помірний вплив на життєздатність клітин меланоми (лінії WM795 та A375) і раку передміхурової залози (лінія PNT-2). Інкубація епітеліальних клітин легень з екстрактом біомаси призводила до значного зниження рівня циклооксигенази-2 порівняно з клітинами лінії A549, активованими ліпополісахаридом.

Зазначимо, що ми акцентували увагу на вторинних метаболітах міцелію та культуральної рідини *F. betulina* та їхній біологічній активності, що є пріоритетним у контексті даної роботи.

Привертає увагу те, що більшість дослідників для вивчення біосинтетичних властивостей березової губки аналізують саме сирі екстракти. Виділення біологічно цінних вторинних метаболітів є наступним етапом подібних експериментів. На нашу думку, з огляду на особливості технологічного процесу, робота саме з культивованим міцелієм є більш зручною та оптимальною. Безумовно, не варто недооцінювати і профіль екзогенних метаболітів, тому для ізолювання сполук з культуральної рідини теж необхідно розробляти ефективні протоколи.

На всіх етапах роботи з біомасою *F. betulina* постає питання вибору оптимального екстрагента для вилучення цільових БАР. У літературі наявні лише фрагментарні дані по екстракції фенольних та інших сполук з міцелію *F. betulina*, вирощеного в культурі, та визначенню біологічних активностей (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Розчинники, які обирали для екстракції БАР з культивованого міцелію *F. betulina*, згідно з літературними даними

БАР та біологічні активності, які визначали	Екстрагенти
Фенольні сполуки (загальний вміст)	Метанол, етанол 70 % [42]
Фенольні кислоти	Метанол [8]
Похідні індолу	Метанол [8]
Тритерпени	Етанол 80 % [45]

Продовження табл. 1.1

Тритерпеноїди	Метанол 95 % + 1 % HCl (концентрована) [8]
Стероли	Метанол:дихлорометан (75:25) [8]
Жирні кислоти	Хлороформ:метанол (2:1) [8]
(1,3)- β -D-глюкани	Вода [45]
Антимікробна активність	Метанол, вода, гексан [45], етанол 70 % [42]
Антиадгезивна активність відносно <i>Campylobacter jejuni</i>	Метанол, вода [45]
Антиоксидантна активність	Метанол, етанол [42]
Протизапальна активність	Метанол [8]
Цитотоксична активність	Метанол [8], вода [45]

Так само, для екстракції плодових тіл та культуральної рідини дослідники обирали воду [1,36,37,45,53,54], спирт [1,33,40,47,54], водно-спиртові суміші [42,45], луи [36], кислоти [8,41], метанол [1,8,9,38,41,42,45,48,53], ефір [1,33], дихлорометан [8,53], етилацетат [5,41,42,45,46], хлороформ [1,8], гексан [45], бензол [1] та інші розчинники. Тож підбір ефективних методик, реагентів, обладнання тощо є вагомим чинником для оптимізації процесу отримання БАР.

Таким чином, незважаючи на те, що дослідження біологічної активності є доволі диверсифікованим процесом через використання різноманітних методичних підходів і дослідницьких об'єктів (плодових тіл, міцелію, культуральної рідини, а також їхніх екстрактів), численні дослідження підтверджують цінний терапевтичний потенціал *F. betulina*. Хоча більшість наукових робіт зосереджені на вивченні дикорослих плодових тіл цього поліпорового гриба, встановлена біологічна активність міцелію та культуральної рідини також беззаперечно свідчить про їхню фармакологічну значущість. У зв'язку з цим, доцільним є застосування комплексного підходу до вивчення біологічної активності та метаболітів, що можуть продукуватися як внутрішньоклітинно, так і позаклітинно.

1.3 Біотехнологічні аспекти культивування *Fomitopsis betulina* in vitro

Аналіз даних літератури свідчить про те, що, незважаючи на виявлені різноманітні терапевтичні активності та ідентифіковані дієві біологічно активні метаболіти *F. betulina*, кількість наукових публікацій, присвячених дослідженню цього гриба в умовах культури *in vitro*, залишається незначною.

Враховуючи здатність *F. betulina* спричиняти деревну буру гниль, низка досліджень була спрямована на вивчення механізмів деградації деревини та продукування відповідних ферментів. У дослідженні Shang et al. [55] продемонстровано значну деградацію деревини *Betula platyphylla* під впливом *F. betulina*, що призвело до втрати 57 % сухої маси та 74 % голоцелюлози протягом 30 днів інкубації на інокульованих зразках. Порівняно з цим, культивування гриба на пшеничній соломі протягом 98 днів спричинило втрату 65 % сухої маси [56], що підкреслює здатність *F. betulina* до ефективної біологічної трансформації різних субстратів в умовах культури. При твердофазному [56] і глибинному культивуванні на соломі [57] та на зразках деревини [55,58] встановлено комплекс ферментів *F. betulina*, що беруть участь у деградації лігноцелюлози. Дослідниками також виявлена здатність *F. betulina* продукувати амілазу, протеазу та ліпазу [11,59], целюлазу, β -глюканазу, пероксидазу, тирозиназу [11] за якісними реакціями.

Наявні лише епізодичні відомості щодо культивування *F. betulina* з метою отримання карпофорів у контрольованих умовах. Вирощування *F. betulina* на колодах *Betula davurica* Pall. показало потенціал для отримання значної кількості плодових тіл, що варіювало від 212 до 1298 г свіжої ваги на одне або два плодових тіла з колоди [60]. Зрілі плодові тіла трутовика (штам PB01) досягали ваги від 50 до 120 г на субстраті з березової тирси з додаванням органічних добавок, біологічна ефективність субстрату становила 12–16 % [54]. У 2019 році Ду та співавтори [61] здійснили серію експериментів з метою інтродукції та культивування дикого штаму *F. betulina* YВНВ-1, виділеного в гірському регіоні Чанбай. Їх дослідження демонструють розробку ефективної біотехнологічної стратегії для культивування отриманого ізоляту в

лабораторних умовах, починаючи з вибору оптимального штаму та поживних середовищ і закінчуючи контрольованим отриманням плодових тіл. Першим етапом стало культивування міцелію на картопляно-декстрозному агарі (КДА), де спостерігався швидкий ріст з утворенням щільної та чистої структури грибниці з обмеженим повітряним міцелієм. Наступним кроком була підготовка складнішого субстрату, що складався з 80 % кукурудзяних зерен, 10 % тирси, 8 % висівків, 1 % гіпсу та 1 % вапна при вологості 60 %, який повністю колонізувався міцелієм протягом 18 днів. Для стимулювання плодоношення склад субстрату змінено на 76 % березової тирси, 20 % пшеничних висівків, 2 % соєвого борошна, 1 % вапна та 1 % гіпсу з вологістю 60–65 %. Інокуляція призвела до проростання міцелію протягом трьох днів, а повна колонізація субстрату відбулася за 35–40 днів. Ініціація плодових тіл відбувалася під впливом світла на поверхні культиваційних пакетів, формуючи сферичні зачатки. Ретельний контроль умов забезпечив їхній подальший розвиток у напівкруглі плодові тіла розміром 8–10 см завдовжки, 5–8 см завширшки та 1–3 см завтовшки приблизно за 15 днів. Після висушування вага окремих плодових тіл коливалася від 9 до 20 г.

Основна увага дослідників була зосереджена на вивченні росту міцелію *F. betulina* на агаризованих поживних середовищах та встановленні морфологічних і культуральних характеристик різних штамів [11,62-64]. Відповідно до результатів цих досліджень, міцелій *F. betulina*, культивований на агаризованому середовищі, зазвичай характеризується білим, відносно однорідним, пухнасто-повстяним ростом з рівними краями колоній та радіальним розповсюдженням гіф. Гіфальна система переважно димітична. Генеративні гіфи є затиснутими, гіаліновими, розгалуженими, з діаметром 1,5–3,5 мкм, тоді як скелетні гіфи мають діаметр 3–4 мкм, меншу кількість розгалужень та потовщені стінки [1]. Морфологічні особливості вегетативного міцелію включають наявність значної кількості пряжок різноманітної форми та структури (поодинокі, парні, мутовчасті), ширину генеративних гіф у межах 1,5–2,0 мкм, а також формування міцеліальних тяжів та анастомозів [11].

Встановлено доцільність отримання міцелію гриба (штам IBK 327) при глибинному культивуванні за статичних умов на рідких поживних середовищах на основі відходів олійно-екстракційного виробництва – шротах та макухах [65]. Ряд робіт присвячено вивченню впливу умов культивування на біосинтетичну активність гриба. Виявлено наявність штамової мінливості реакції росту *F. betulina* на дію кадмію (Cd) на агаровому середовищі та в рідкій культурі [66,67]. Так, швидкість росту чотирнадцяти досліджених штамів *F. betulina* мала меншу мінливість, ніж рівень продукування біомаси, що свідчить про те, що радіальна швидкість росту є більш видоспецифічною і, отже, більш цінною для міжвидових порівнянь ростових реакцій.

Встановлено вплив поживного середовища на набуття антибактеріальної активності як міцеліальної біомаси, так і культуральної рідини [12]. З'ясовано вплив поживного середовища на морфологію та швидкість радіального росту культур [11,62-64]. Відповідно до результатів досліджень [11,68], штами *F. betulina* ростуть на агаризованих поживних середовищах зі швидкістю радіального росту у межах 3,6–9 мм/добу.

Застосування мутагенезу, зокрема ультрафіолетового опромінення з довжиною хвилі 254 нм, продемонструвало здатність посилювати біосинтез цільових сполук у *F. betulina*. Так, оптимізована доза УФ-опромінення (0,85 кДж/см²) призводила до збільшення антибактеріальної активності культуральної рідини штаму IBK 327 проти *E. coli*. Водночас, вищі дози опромінення мали негативний вплив на активність проти *B. subtilis* та *S. aureus* [15]. Ці результати підкреслюють перспективність використання фізичного мутагенезу як інструменту для направленої модифікації біоактивних властивостей культур *F. betulina*.

За допомогою однофакторного аналізу досліджено вплив параметрів культивування, зокрема температури [13,47], pH [13,16,69], джерел азоту та вуглецю [13,16], тривалості культивування на ріст *F. betulina* [13,42], а також з метою визначення оптимального складу поживного середовища для отримання

максимальної міцеліальної біомаси та продукування антибактеріальних метаболітів [13].

Таким чином, з огляду на встановлені терапевтичні властивості *F. betulina*, цей макроміцет залишається важливим об'єктом досліджень у галузі біотехнології, мікології та фармакології. Експериментальні дослідження чистих культур є ключовим інструментом для поглибленого розуміння фундаментальних аспектів його росту, метаболізму, живильних та екологічних потреб. Крім того, такі дослідження відіграють вирішальну роль у виявленні нових сполук та активностей, розширюючи потенціал практичного застосування цього виду, зокрема у фармацевтичній, нутрицевтичній та косметичній промисловості. Для успішної реалізації біотехнологічних підходів існує потреба у науково обґрунтованому відборі перспективних штамів-продуцентів та встановленні закономірностей їхнього росту і синтезу метаболітів. Зважаючи на залежність вмісту біологічно активних сполук від умов культивування, оптимізація параметрів *in vitro* є актуальним напрямом досліджень, що має важливе практичне значення для підвищення ефективності продукування цінних метаболітів у процесі культивування *F. betulina*.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Штами *Fomitopsis betulina*

З метою дослідження росту та біологічної активності березової губки *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai використано 22 штами. Одинадцять штамів *F. betulina* під номерами 311, 327, 978, 988, 989, 2269, 2290, 2363, 2364, 2366, 2399 надано Колекцією культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України (ІБК) [70]. Решта 11 штамів виділено із плодових тіл (16 шт.), зібраних на *Betula pubescens* Ehrh. у південній лісосмузі м. Суми та у Національному природному парку «Голосіївський» (Святошинсько-Біличанський масив м.Києва) у вересні-листопаді 2021 р.

Введення грибів у культуру здійснювали за загальноприйнятими методиками [71]. Використовували свіжі плодові тіла (зібрані за 1–2 дні до виділення). Базидіоми очищали від бруду, промивали по черзі у проточній водопровідній, потім у дистильованій і стерильній дистильованій воді. Далі плодові тіла обробляли розчином 70 % етилового спирту. В асептичних умовах ділили плодове тіло на шматки і вирізали невеликі шматочки зсередини пінцетом та/або скальпелем, простерилізованими у полум'ї пальника. Отримані фрагменти висівали на чашки Петрі з глюкозо-пептон-дріжджовим агаром (ГПДА) та інкубували при 25 ± 2 °C. Культури регулярно перевіряли на наявність контамінації. Для оцінки мікроскопічної морфології, зокрема наявності пряжок на гіфах, використовували світлову мікроскопію (мікроскоп Zeiss Primo Star, Німеччина). Зразки для світлової мікроскопії готували з вегетативного міцелію у фазі активного росту (7 доба) з використанням дистильованої води. Після росту в культурі гриби ідентифікували на основі візуальних характеристик, таких як морфологія та колір колоній. Посівні культури інтродукованих грибів зберігали в пробірках на скошеному мальт-екстракт агарі (MEA) при температурі 4 °C.

Після інтродукції штамів у культуру їх передано до Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, де вони отримали номери 2770 (штам із м. Суми), 2771, 2772, 2773, 2774, 2775, 2776, 2777, 2778, 2785, 2786 (штами із НПП «Голосіївський»). Культури зберігалися у пробірках при 4 °C на скошеному МЕА.

2.2 Молекулярно-генетичні дослідження

Для підтвердження видової приналежності штаму *F. betulina* IBK 2777 проведено виділення ДНК та подальший її аналіз. Екстракцію ДНК здійснювали з нативного міцелію, вирощеного на чашках з ГПДА, за модифікованим протоколом DNA MicroPrep Isolation from Plants [72].

Щоб гомогенізувати матеріал, зразки міцелію поміщали в мікропробірки і занурювали в рідкий азот. Після цього додавали невелику кількість карборунду і подрібнювали зразки товкачем. Далі у кожну пробірку вносили 750 мкл екстракційного буфера: 1 % додецилсульфату натрію, 100 мМ NaCl, 10 мМ ЕДТА, 50 мМ Трис-HCl (pH 8,0) та 10 мМ 2-меркаптоетанолу (останній – безпосередньо перед використанням) і ретельно перемішували. Пробірки інкубували при 65 °C протягом 10 хв.

Потім до зразків додавали 200 мкл 3М розчину ацетату натрію і ретельно перемішували. Суміш інкубували в льодовій бані протягом 20 хвилин. Далі, уже при кімнатній температурі, матеріал центрифугували при швидкості 18000 g протягом 10 хвилин. Надосадову рідину переносили в нові пробірки, додавали ізопропанол (1:1 об/об до супернатанту) і ретельно перемішували. Отриману суміш знову центрифугували при 18000 g протягом 2 хвилин. Надосадову рідину видаляли, а до отриманих пелет ДНК додавали 450 мкл 80 % розчину етанолу. Проводили чергове центрифугування при 18000 g протягом 2 хвилин, після чого супернатант зливали, а пробірки висушували до повного випаровування етанолу. Отриману ДНК розчиняли в 50 мкл ТЕ-буфера (10 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 1 мМ ЕДТА). Екстракцію ДНК оцінювали візуально за утворенням пелет на кінцевій стадії. Ефективність екстракції перевіряли за

допомогою електрофорезу та спектрофотометрії на приладі DS-11 FX+ (DeNovix, США).

Для ідентифікації виду гриба визначали маркерну послідовність внутрішнього транскрибованого спейсера ядерної рДНК (ITS) з використанням праймерів ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') та ITS4 (5'-TCSTCCGCTTATTGATATGC-3') [73]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили з використанням безбарвного реакційного буфера MyTaq Reaction Buffer Colorless (Meridian Bioscience Inc., США) та полімерази Pfu-X на ПЛР-термоциклері Techne TC-3000X (Keison Products, Великобританія). Початкову денатурацію ДНК проводили при 98 °С протягом 3 хвилин. Далі здійснено 30 циклів за умов: денатурація при 98 °С протягом 30 секунд, відпал праймера при 55 °С протягом 30 секунд і елонгація при 72 °С протягом 1 хвилини. Фінальну елонгацію проводили при 72 °С протягом 10 хвилин. В кінці процесу ампліфікації температуру знижували до 4 °С. Продукти ПЛР розділяли електрофорезом в 1 % агарозному гелі.

Секвенування здійснено на комерційній основі компанією MacroGen Europe. Потім отримана послідовність була перевірена за допомогою BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) у базі даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) [74] для ідентифікації правильного роду та виду, перевірки наявності контамінації, а також для пошуку найближчих збігів. Отримана нуклеотидна послідовність 5,8S рДНК (разом з фрагментами послідовностей ITS1 та ITS2) була депонована до GenBank і доступна під номером PQ184655.

2.3 Тест-культури макро- та мікроміцетів і бактерій

Для визначення антагоністичної активності (АА) штамів *F. betulina* відносно патогенних та паразитичних видів грибів обрано такі культури:

- штами макроміцетів *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. 361 і *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát 1877 з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України (ІБК) [70];

- штами мікроміцетів *Aspergillus fumigatus* Fresen., *Cladobotryum mycophilum* (Oudem.) W. Gams & Hooz., *Fusarium poae* (Peck) Wollenw., *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallett з робочої колекції мікроорганізмів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України;
- штами *Aspergillus niger* Tiegh. IFBG 134 та *Penicillium polonicum* K. Zaleski IFBG 138 з Колекції мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»;
- штами *Pichia kudriavzevii* Boidin, Pignal & Besson 301 (синоніми: *Candida krusei* (Castell.) Berkhout; *Issatchenkia orientalis* Kudryavtsev) та *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 319 з Музею патогенних для людини мікроорганізмів ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України». Клінічний резистентний штам *C. albicans* 319 ізольовано з біоматеріалу інфікованого пацієнта, який проходив тривалу антибіотикотерапію.

Культури зберігалися при 4 °C у пробірках на скошеному МЕА (для макроміцетів) або на картопляно-декстрозному агарі (КДА) (для мікроміцетів). Назви видів грибів наведено згідно з номенклатурою бази даних MycoBank [75].

Бактеріальні штами (*Bacillus subtilis* Ehrenberg, Cohn; *Escherichia coli* Migula, Castellani & Chalmers; *Klebsiella pneumoniae* Schroeter, Trevisan; *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter, Migula; *Staphylococcus aureus* Rosenbach), які використовувалися для визначення антибактеріальної активності (АБА), надано з робочої колекції мікроорганізмів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України. Культури зберігалися у пробірках на скошеному агарі Мюллера-Хінтона (МХА) при 4 °C.

2.4 Поживні середовища

1) Глюкозо-аспарагінове рідке середовище (ГА): глюкоза – 10,0 г; аспарагін – 0,4 г; KH_2PO_4 – 1,0 г; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г; дистильована вода – 1 л.

При заміні джерел вуглецю (в еквівалентній кількості, з урахуванням відсоткового вмісту елементу С) відповідні сполуки вносилися замість глюкози в кількості: декстроза – 10,0 г; фруктоза – 10,0 г; галактоза – 10,0 г; манітол – 10,1 г; арабіноза – 10,0 г; ксилоза – 10,0 г; сахароза – 9,5 г; лактоза – 9,5 г; мальтоза – 9,5 г; крохмаль – 9,0 г; целюлоза – 9,0 г.

При заміні джерел азоту (в еквівалентній кількості, з урахуванням відсоткового вмісту елементу N) відповідні речовини вносилися замість аспарагіну в кількості: пептон – 0,61 г; дріжджовий екстракт – 0,85 г; сечовина – 0,18 г; NH_4NO_3 – 0,24 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,4 г; KNO_3 – 0,61 г; NaNO_3 – 0,51 г; NaNO_2 – 0,42 г.

2) Глюкозо-пептон-дріжджове рідке середовище (ГПД): глюкоза – 25,0 г; пептон – 3,0 г; дріжджовий екстракт – 2,0 г; KH_2PO_4 – 1,0 г; K_2HPO_4 – 1,0 г; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25 г; дистильована вода – 1 л.

3) Глюкозо-пептон-дріжджовий агар (ГПДА): глюкоза – 25,0 г; пептон – 3,0 г; дріжджовий екстракт – 2,0 г; KH_2PO_4 – 1,0 г; K_2HPO_4 – 1,0 г; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25 г; агар-агар – 10,0 г; дистильована вода – 1 л.

4) Картопляно-декстрозне рідке середовище (КД, Difco, США): декстроза – 20,0 г; картопляний крохмаль – 4,0 г; дистильована вода – 1 л.

5) Картопляно-декстрозний агар (КДА, Difco, США): декстроза – 20,0 г; картопляний крохмаль – 4,0 г; агар-агар – 10,0 г; дистильована вода – 1 л.

6) Рідке середовище мальт-екстракт (МЕ, Thermo Fisher Scientific, США): мальт-екстракт – 30,0 г; пептон – 5,0 г; дистильована вода – 1 л.

7) Мальт-екстракт агар (МЕА, Thermo Fisher Scientific, США): мальт-екстракт – 30,0 г; пептон – 5,0 г; агар-агар – 10,0 г; дистильована вода – 1 л.

8) Агар Мюллера-Хінтона (МХА, Sanimed-M, Україна).

9) Сабуро-декстрозне рідке середовище (СД, HiMedia Pvt limited, Mumbai, Індія): декстроза – 40,0 г; пептон – 10,0 г; дистильована вода – 1 л.

10) Сабуро-декстрозний агар (СДА, HiMedia Pvt limited, Mumbai, Індія): декстроза – 40,0 г; пептон – 10,0 г; агар-агар – 10,0 г; дистильована вода – 1 л.

Після приготування середовища автоклавували при 121 °С протягом 15 хв (1,0 атм). Рідкі середовища стерилізувалися одразу в колбах Ерленмейєра об'ємом 250 мл у кількості 50 мл. Середовища з агар-агаром автоклавувалися у колбах об'ємом 500 або 1000 мл, потім розливалися по стерильних чашках Петрі або пробірках.

2.5 Визначення показників росту і морфології

Для вимірювання радіальної швидкості росту штамів *F. betulina* та оцінки морфології їх колоній використовували чотири агаризовані середовища: ГПДА, КДА, МЕА та СДА. Для отримання початкового інокуляту фрагмент міцелію кожного штаму *F. betulina* пересівали з пробірки зі скошеним МЕА на чашки Петрі з ГПДА, а потім інкубували у термостаті при 25±2 °С протягом 10 днів. Інокулят (1 міцеліальний диск діаметром 8 мм з 10-денних культур штамів *F. betulina*) засівали на чашки із середовищами та інкубували при 25±2 °С до повного покриття поверхні агару міцелієм штаму. Радіус кожної з колоній фіксували щодня. Особливості морфології оцінювали візуально (колір колонії та реверзumu, структура поверхні та країв колоній, візуальні особливості гіф, наявність зональності, присутність вкраплень на міцелії, термін формування примордіїв). Після повного заростання чашок їх виставляли на денне світло для подальшого спостереження. Морфологічні зміни моніторили раз на 3 дні протягом місяця.

Радіальну швидкість росту (RGR) штамів *F. betulina* розраховували за формулою [76]:

$$RGR = \frac{R_2 - R_1}{t_2 - t_1}, \quad (2.1)$$

де RGR – радіальна швидкість росту, мм/добу;

R_2 – радіус колонії в кінці фази лінійного росту, мм;

R_1 – радіус колонії на початку фази лінійного росту, мм;

$t_2 - t_1$ – тривалість фази лінійного росту, діб.

Для встановлення рівня накопичення біомаси використовували ті ж середовища, але без агару: ГПД, КД, МЕ і СД. Інокулят кожного штаму (3 міцеліальні диски діаметром 8 мм з 10-денних культур) окремо вносили в колби Ерленмеєра з 50 мл кожного середовища та інкубували у стаціонарних умовах при 25 ± 2 °C протягом 14 діб. Ріст на рідких середовищах оцінювали шляхом зважування кількості біомаси і виражали в грамах сухої маси на літр культуральної рідини (г/л). Вирослий міцелій відокремлювали від культуральної рідини, використовуючи фільтрувальний папір Ватман № 4, двічі промивали дистильованою водою і висушували при 85 °C до постійної маси.

2.6 Визначення кількості екзополісахаридів

Після відділення біомаси, культуральну рідину аналізували на вміст екзополісахаридів (ЕПС). ЕПС отримували осадженням 95 % етанолом у співвідношенні 1:4 (об/об) культуральної рідини до етанолу. Суміш лишали на ніч при 4 °C. Далі її розділяли центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 10 хв. Потім осад збирали, діалізували проти води та висушували при 60 °C. Вміст сирих ЕПС в осаді досліджували фенол-сірчанокислим методом [77], використовуючи глюкозу як еталон. Вимірювання здійснювали на спектрофотометрі (UV-1800 PC, Шанхай, Китай) при довжині хвилі 490 нм в кюветі 10 мм. Контролем був розчин, що містив 1 мл дистильованої води, 1 мл 5 % водного розчину фенолу та 5 мл концентрованої сірчаної кислоти. Кількість ЕПС виражали в грамах на літр культуральної рідини (г/л).

2.7 Оцінка антагоністичної активності

Антагоністичну активність (АА) штамів *F. betulina* вивчали відносно культур *A. fumigatus*, *A. niger* IFBG 134, *C. albicans* 319, *C. mycophilum*, *F. poae*, *H. annosum* IBK 361, *I. obliquus* IBK 1877, *M. nivale*, *P. polonicum* IFBG 138, *P. kudriavzevii* 301. Дослідження проводили за методикою Бадалян зі співавторами [78,79].

Визначення АА проводили у подвійній культурі. На чашку Петрі із середовищем висівали на відстані 3 см один від одного (і від країв чашок) по 2 міцеліальних диски (діаметром 8 мм): перший – з інокулятом кожного штаму *F. betulina*, а другий – з інокулятом гриба-антагоніста. Експеримент з усіма культурами проводили на чашках Петрі з КДА, а також здійснювали додаткові досліді на СДА (для *C. albicans* та *P. kudriavzevii*) і МЕА (для *A. niger*). Засіяні чашки інкубували у термостаті за температури 25 ± 2 °С. Ріст грибів при спільному культивуванні моніторили щодня протягом місяця, відстежуючи морфологічні зміни у взаємодіючих колоніях (забарвлення міцелію та реверзumu, візуалізацію лінії контакту, формування зон міцелію різного характеру, виділення ексудату, утворення примордіїв). На 28 добу культивування визначали остаточний тип взаємодії штамів *F. betulina* з грибами-антагоністами.

Для оцінки взаємодій грибів використовувалася шкала для трьох основних типів реакцій (А і В – взаємне гальмування росту колоній при контакті та на дистанції, відповідно; С – спокійне наростання одного гриба без затримки росту іншого) і чотирьох підтипів (часткове та повне наростання після взаємного гальмування росту контактуючих колоній при контакті – типи C_{A1} , C_{A2} , відповідно, та після гальмування росту на дистанції – типи C_{B1} , C_{B2}). АА міцелію взаємодіючих культур оцінювали за індексом антагонізму (AI), який розраховувався для кожного штаму окремо за формулою [78]:

$$AI = A(n \times 1) + B(n \times 2) + C(n \times 3) + C_{A1}(n \times 3,5) + C_{B1}(n \times 4) + C_{A2}(n \times 4,5) + C_{B2}(n \times 5) , \quad (2.2)$$

де n – частота кожного типу або підтипу реакції штаму *F. betulina* з грибами-антагоністами.

Для взаємодії штамів *F. betulina* з макроміцетом *H. annosum* додатково обчислювали відсоток пригнічення росту контактуючих культур за формулою Singh & Tripathi [80]:

$$PI = \frac{d_c - d_t}{d_c} \times 100\%, \quad (2.3)$$

де PI – відсоток інгібування росту гриба, %;

d_c – ріст гриба на контрольній чашці, мм;

d_t – ріст гриба в подвійній культурі, мм.

2.8 Екстракція міцеліальної маси та культуральної рідини

Для подальшого аналізу біологічної активності штамів *F. betulina* готували етилацетатні екстракти міцеліальної маси (ММ) та культуральної рідини (КР).

Зразки КР та ММ отримували після стаціонарного культивування: з міцеліальні диски діаметром 8 мм з 10-денних культур штамів *F. betulina* пересівали на колби з ГПД та інкубували при 25 ± 2 °C протягом 14 діб. Міцелій та КР кожного штаму відокремлювали за допомогою фільтрувального паперу Ватман № 4. Міцелій двічі промивали дистильованою водою і висушували при 60 °C до постійної маси.

Сухий та ретельно подрібнений у ступці міцелій кожного штаму *F. betulina* екстрагували з додаванням етилацетату у пропорції 1:10 (м/об). Отримані суміші струшували на шейкері протягом 2 днів при 100 об/хв та 30 °C. Екстракти відокремлювали від осаду центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 10 хв і подальшою фільтрацією з фільтрувальним папером Ватман № 4.

КР кожного штаму екстрагували додаванням етилацетату у пропорції 2:1 (об/об). Суміші витримували при 8 °C протягом 2 діб, а потім розділяли за допомогою ділильної лійки. Етилацетатні фракції концентрували до сухої маси на роторному випаровувачі (RVO-64, Чехословаччина) при 40 °C і зважували сухий залишок, який потім розчиняли в 5 мл етилацетату.

2.9 Визначення антибактеріальної активності

Антибактеріальну активність (АБА) штамів *F. betulina* встановлювали відносно бактеріальних культур *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* та *S. aureus*. Мікроорганізми активували на МХА при 37 °С протягом 24 годин у термостаті. Кожну культуру окремо суспендували в стерильному фізіологічному розчині та розводили до 10^6 колонієутворювальних одиниць (КУО) на мл. Після цього на чашки Петрі з МХА вносили по 0,5 мл бактеріальних суспензій та рівномірно розподіляли по поверхні середовища. Чашки лишали на 1,5–2 год при кімнатній температурі для всотування та підсушування решток рідини.

АБА визначали методом дифузії в агар за допомогою лунок. В агаровому шарі попередньо засіяних чашок Петрі асептично вирізали лунки діаметром 7 мм стерильним свердлом. У лунки вносили по 120 мкл екстрактів ММ та КР кожного з 22 штамів *F. betulina* окремо. Підготовлені таким чином чашки інкубували при 37 °С протягом 24 годин.

АБА встановлювали шляхом вимірювання діаметра зони інгібування (в мм), що має вигляд чітких прозорих зон, які утворюються навколо кожної лунки. АБА детермінували у випадках, коли зона інгібування була більшою за 7 мм (враховуючи діаметр лунки). Як негативний контроль використовували етилацетат, який застосовувався для екстракції.

2.10 Оцінка антиоксидантної активності

Вимірювання АОА екстрактів *F. betulina* здійснювали з використанням вільного стабільного радикалу 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозилу (DPPH) за методикою [81]. Розчини DPPH мають інтенсивне фіолетове забарвлення ($\lambda_{\text{max}} = 517$ нм), і при взаємодії зі сполуками, які здатні знешкоджувати вільні радикали, спричиняє появу жовтого кольору.

По 100 мкл етилацетатних екстрактів змішували з 2900 мкл розчину DPPH (120 мкМ) у метанолі. Суміш витримували у шафі в темряві протягом 30 хв за температури 37 °С. Як негативний контроль використовували суміш

100 мкл етилацетату та 2900 мкл 120 мкМ DPPH у метанолі, а в якості позитивного контролю – суміш 100 мкл розчину 0,3 мг/мл аскорбінової кислоти в метанолі з 2900 мкл того ж реагенту DPPH. Вимірювання оптичної густини реакційних сумішей проводили спектрофотометрично при $\lambda = 517$ нм. Як нульовий розчин при вимірах використовували метанол.

АОА розраховували як відсоток активності поглинання радикалів для кожного екстракту за формулою:

$$AOA = \frac{A_{DPPH} - A_{зразка}}{A_{DPPH}} \times 100\%, \quad (2.4)$$

де АОА – антиоксидантна активність, %;

A_{DPPH} – оптична густина негативного контролю;

$A_{зразка}$ – оптична густина реакційної суміші з екстрактом.

2.11 Визначення вмісту фенольних сполук

Кількість фенольних сполук в приготованих екстрактах визначали спектрофотометрично за допомогою реактиву Фоліна-Чокальтеу [82]. По 0,5 мл кожного екстракту міцелію та КР вносили у мірні колби на 25 мл. Потім додавали по 2,0 мл 10 % водного розчину Фоліна-Чокальтеу. Через кілька хвилин у колби вносили по 10,0 мл 7,5 % водного розчину Na_2CO_3 , і всі реакційні суміші доводили водою до мітки. Після 40 хв експозиції у темряві при кімнатній температурі приготовані розчини вимірювали за довжини хвилі 750 нм. Суміш, що містила 2,0 мл розчину Фоліна-Чокальтеу, 10,0 мл 7,5 % розчину Na_2CO_3 і доведена водою до об'єму 25 мл, використовувалася як нульовий розчин.

Вміст фенольних сполук (ВФС) розраховували за калібрувальною кривою з використанням галової кислоти як стандарту (рівняння кривої: $y = 0,0758x + 0,0583$; $R^2 = 0,9685$). Для калібрування використовували концентрації галової кислоти в діапазоні від 2 до 40 мкг/мл (водні розчини). Визначені рівні ВФС виражені в міліграмах еквівалента галової кислоти (ЕГК) на грам сухого зразка (суха ММ або сухий екстракт КР).

2.12 Встановлення впливу умов культивування

Для визначення оптимальних умов отримання біомаси та для підвищення рівня АОА та ВФС міцелію обрано штам *F. betulina* IBK 2777. Як базові умови культивування прийнято такі:

- 1) вирощування на ГПД глибинним культивуванням за статичних умов;
- 2) тривалість – 14 діб;
- 3) температура – 25 ± 2 °C;
- 4) pH 6,0.

Дані параметри змінювали по черзі окремо при кожному культивуванні.

Перед оптимізацією умов культивування також необхідно обрати розчинник для екстракції висушеного міцелію. Для цього після культивування за обраних вище параметрів отримали ММ, яку сепарували від КР і висушили при 60 °C. Для вибору оптимального екстрагента обрали дистильовану воду, етанол 96 % та 70 %, метанол, хлороформ та етилацетат. Екстракцію ММ цими розчинниками проводили згідно з протоколом у підрозділі 2.8. Оскільки за результатами визначення АОА та ВФС в екстрактах оптимальним виявився 70 % етанол, то надалі при вивченні впливу умов культивування на штам *F. betulina* 2777 послуговувалися саме цим екстрагентом.

Температура інкубації. Колби з ГПД засівали трьома міцеліальними дисками (діаметром 8 мм) та інкубували протягом 14 днів статичним способом в різних термостатах за температури 20 ± 1 °C, 25 ± 2 °C та 30 ± 1 °C.

Тривалість та спосіб культивування. Досліджували вирощування глибинним культивуванням за статичних та динамічних умов, водночас проводячи моніторинг тривалості культивування. Для статичного культивування у кожну колбу з ГПД вносили по три міцеліальні диски, і далі інкубацію проводили при 25 ± 2 °C від 7 до 35 днів з інтервалом у 7 діб. Для динамічного культивування підготовлювали 10-денний міцелій *F. betulina* на чашці Петрі з ГПДА, а потім його подрібнювали за допомогою гомогенізатора MPW-120 (Mechanika Precyzyjna, Варшава, Польща) разом з 250 мл ГПД в асептичних умовах для приготування інокуляту. 5 мл аліквоти отриманої

суспензії переносили в стерильні колби Ерленмейера з 50 мл ГПД. Колби поміщали на орбітальний шейкер (120 об/хв) й інкубували у темряві при 25 ± 2 °C. Культивування проводили від 3 до 15 діб з інтервалом 2 доби.

Рівень рН. Колби з ГПД засівали трьома міцеліальними дисками і культивували статично при 25 ± 2 °C протягом 14 днів за різних рівнів рН (від 2,5 до 8,0, з інтервалом 0,5). Середовище ГПД попередньо доводили до цільового значення рН за допомогою 1М HCl або 1М NaOH і контролювали отриману кислотність до та після автоклавування, використовуючи рН-метр.

Джерела вуглецю та азоту. Для вивчення впливу джерел живлення використовували базове середовище ГА. Глюкозу в ньому замінювали на еквівалентний вміст вуглецю відповідною речовиною (декстроза, фруктоза, галактоза, маніт, арабіноза, ксилоза, сахароза, лактоза, мальтоза, розчинний крохмаль або целюлоза). Аспарагін також замінювали еквівалентним вмістом відповідного джерела азоту (пептон, дріжджовий екстракт, сечовина, нітрат амонію, сульфат амонію, нітрат калію, нітрат натрію або нітрит натрію). Склад вихідного ГА та модифікованих середовищ наведено в підрозділі 2.4. Підготовлені колби засівали трьома міцеліальними дисками та інкубували протягом 28 діб за статичних умов при 25 ± 2 °C.

Для встановлення оптимальних показників за кожним параметром оцінювали рівень накопичення біомаси *F. betulina* 2777, а також АОА та ВФС в екстрактах міцелію, отриманих за допомогою 70 % етанолу. Визначення проводили згідно з протоколами у підрозділах 2.5, 2.10, 2.11.

2.13 Статистична обробка результатів

Усі експерименти проводили в трьох повторностях для кожного варіанту. Значення виражалися як середнє $\pm$ стандартне відхилення. Рисунки, представлені в дисертації, є репрезентативними для щонайменше трьох проб.

Статистичну обробку даних проводили у програмі Microsoft Excel. Достовірними вважали відмінності при $p \leq 0,05$. Для перевірки значущості між

змінними проводили дисперсійний однофакторний аналіз (ANOVA). Статистичний аналіз проводили з використанням LSD-тесту Фішера.

Коефіцієнти кореляції Пірсона (r) розраховували за допомогою статистичного програмного забезпечення Statistics Kingdom [17] між:

- значеннями накопичення біомаси та ЕПС при скринінгу на різних поживних середовищах;
- значеннями АБА, АОА, ВФС при скринінгу, а також додатково для біомаси та продукування ЕПС, визначених у попередньому досліді;
- значеннями накопичення біомаси, рівнів АОА та ВФС при вивченні впливу умов культивування на ріст та розвиток відібраного штаму *F. betulina* 2777.

РОЗДІЛ 3

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА КУЛЬТУРАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ШТАМІВ *FOMITOPSIS BETULINA*

Культивування грибів є важливою промисловою та біотехнологічною галуззю, яка проявляє високий темп розвитку і займає значні позиції на світовому ринку. Серед базидіоміцетів бурої гнилі здавна відомий поліпоровий гриб *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai (березова губка), плодові тіла якого використовували в народній медицині [1,2,25,26,83,84]. Біологічну активність цього трутовика здебільшого пов'язують із тритерпенами [2,3,45,46,85-87], зокрема поліпореновими кислотами [2,3,24,85,88]. Вчені також приділяють увагу фенольним сполукам [2,3,8,9,41,42]. Незважаючи на визнану роль полісахаридів як ключових компонентів терапевтичної активності багатьох грибів, дослідження глюканів *F. betulina* досі проводилися лише епізодично [36, 45,89,90].

Останніми десятиліттями спостерігається зростання інтересу до вивчення плодових тіл *F. betulina* з метою пошуку нового джерела цінних біологічно активних метаболітів із широким спектром терапевтичної дії. Однак у науковій літературі бракує інформації про ріст та фізіологічні особливості штамів *F. betulina*. Більшість досліджень проведено на плодових тілах *F. betulina*, натомість міцелію та культуральній рідині уваги приділялося значно менше [8]. Аналогічно, у науковій літературі представлена лише фрагментарна інформація щодо сприятливого впливу різних за складом поживних середовищ на накопичення біомаси *F. betulina* [11,13,16]. Важливо підкреслити, що ріст міцелію та утворення метаболітів суттєво залежать від штамів гриба [11,16,47,91-97].

3.1 Виділення нових штамів *Fomitopsis betulina*

Актуальним завданням сучасної біотехнології є виділення чистих культур грибів із природних плодових тіл, що створює передумови для порівняння

існуючих колекційних культур із новими ізолятами та відбору перспективних штамів з унікальними біологічними властивостями, які можуть бути відсутні в наявних колекційних культурах. Крім того, нові ізоляти потенційно можуть не мати такої кількості мутацій, які можливі при тривалому зберіганні штамів в колекціях і музеях [98].

Хоча *F. betulina* природно асоціюється з видами роду *Betula* і пристосований до росту на деревині, зазначимо, що досліджений вид гриба досить легко вводився в культуру зі свіжозібраних плодових тіл. Середовище ГПД було придатним для інтродукції та росту всіх ізолятів. Також відомо, що для ізолятів плодових тіл *F. betulina* сприятливими були поживне середовище за Одду [8], солодовий агар [45] та MEA [47,99].

Загалом зібрано 16 плодових тіл, виявлених на *Betula pubescens* Ehrh. Із зібраних зразків плодових тіл (приклад представлено на рис. 3.1) ізольовано 11 штамів гриба *F. betulina*. З них один штам походив з м. Суми (південна лісосмуга), а десять штамів – з двох локалітетів Національного природного парку «Голосіївський» (Святошинсько-Біличанський масив).



Рис. 3.1. Плодове тіло *F. betulina* у природному середовищі (НПП «Голосіївський», листопад 2021 р.)

Верифікація ізольованих культур включала мікроскопічне вивчення вегетативного міцелію для ідентифікації притаманних йому мікроструктур. Всі ізольовані гриби мали пряжки – характерні структури, що є визначальними для

базидіоміцетів (рис 3.2 А). Наявність великої кількості пряжок на міцелії є таксономічною ознакою березової губки у вегетативній стадії розвитку [42].

Верифікацію та ідентифікацію виділених чистих культур також підтверджено утворенням примордіїв на колонії міцелію після 3 тижнів росту (рис 3.2 Б) [100]. Це узгоджується з даними іншого дослідження [11], в якому спостерігалось формування зачатків плодових тіл після 20 діб культивування.

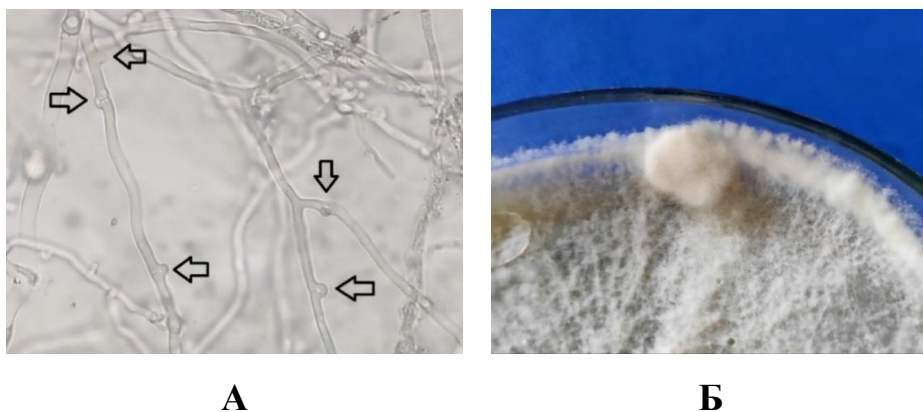


Рис. 3.2. Верифікація культур: **А** – мікроскопія вегетативного міцелію штаму *F. betulina* 2772 з пряжками (збільшення $\times 100$); **Б** – примордій на колонії штаму *F. betulina* 2777, вирощеного на ГПДА

Отримані чисті культури (рис. 3.3) передано до Колекції культур шапинкових грибів Національної Академії наук України Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного (ІВК) [70], яка є Національним надбанням України.

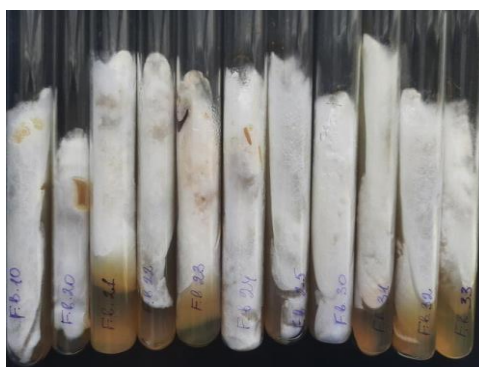


Рис. 3.3. Чисті культури *F. betulina*, які зберігаються у пробірках на скошеному МЕА

Нові штами отримали номери 2770, 2771, 2772, 2773, 2774, 2775, 2776, 2777, 2778, 2785, 2786.

За допомогою молекулярно-генетичних методів підтверджено видову приналежність перспективного штаму *F. betulina* 2777. Отримані нуклеотидні послідовності ITS-регіону рибосомальної ДНК цього штаму депоновано до міжнародної бази даних GenBank під реєстраційним номером PQ184655.

Таким чином, отримані нові 11 штамів *F. betulina* є цінним доповненням до колекційного фонду цього виду в Колекції культур шапинкових грибів Національної Академії наук України Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного (ІВК).

3.2 Макроморфологічні особливості колоній

Морфологія культур є важливою ознакою для їх ідентифікації. Крім того, фенотипові зміни можуть свідчити про фізіологічні відмінності між штамми-продуцентами. Різниця у морфології також зумовлюється використанням різних живильних компонентів у процесі культивування.

Встановлено певні морфологічні особливості росту штамів залежно від використаного поживного середовища (ПС). На МЕА усі досліджені штами *F. betulina* у фазі активного росту мали рівномірний повітряний білий міцелій, краї колоній притиснуті і рівні. Характер міцелію здебільшого шерстистий (рис. 3.4 А), рідше шерстисто-повстяний (рис. 3.4 Б), гіфи доволі чітко окреслені. Однак на КДА та СДА колонії відрізнялися – спостерігали появу зональності (рис. 3.4 В) у вигляді концентричних кіл (інтенсивність відрізнялася залежно від штаму). Міцелій так само білий, шерстисто-повстяний, краї колоній рівні і притиснуті, однак гіфи менш чіткі і більш переплетені. На ГПДА міцелій має також повстяний характер, зональність формувалася не завжди. Інколи на КДА траплялися борошнисті вкраплення міцелію. Реверзум колоній на усіх середовищах лишався без змін. Однак після 10-ї доби культивування, уже на денному світлі, у більшості з досліджених штамів спостерігали формування ватних скупчень на периферії колонії, які поступово, по мірі розвитку,

проявлялися практично у всіх культур *F. betulina* (залежно від швидкості росту кожного окремого штаму).

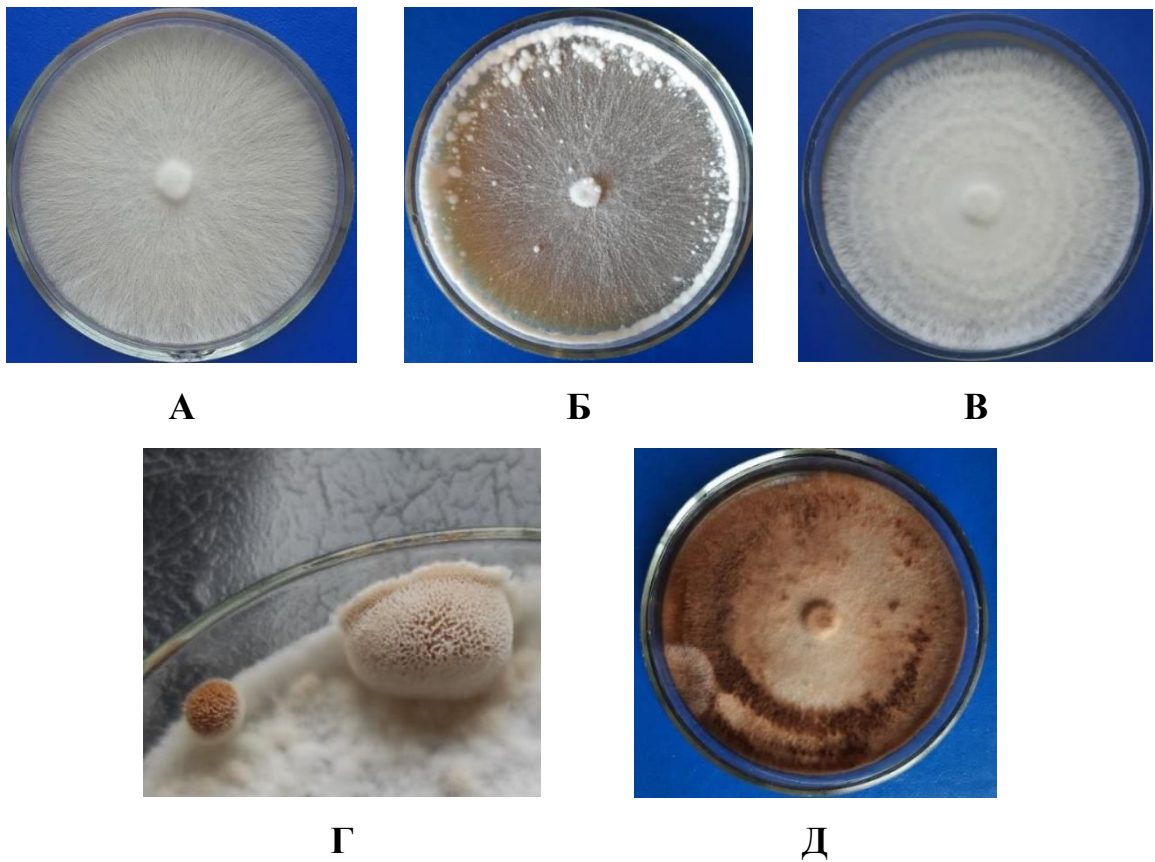


Рис. 3.4. Морфологія колоній штамів *F. betulina*: **А** – шерстиста колонія штаму 2290 на МЕА, 8-ма доба; **Б** – шерстисто-повстяна колонія штаму 2770 на МЕА, 24-та доба; **В** – виражена зональність колонії штаму 2776 на КДА, 10-та доба; **Г** – примордії на колонії штаму 327 на ГПДА, 8-й тиждень; **Д** – пігментація колонії штаму 2773 на КДА, 28-ма доба

Починаючи з 21-ї доби, у *F. betulina* починають формуватися примордії (рис. 3.4 Г). На МЕА зачатки плодових тіл формувалися частіше, ніж на інших середовищах: КДА, ГПДА і СДА. На початку свого формування примордії пухнасті, кулясті, білого кольору, ближче до 28-ї доби культивування вони збільшуються, в окремих штамів пігментуються. Світло-коричнева пігментація примордіїв спостерігалася здебільшого на КДА, на інших ПС – рідше. При старінні культур також формувалися міцеліальні тяжі (на ГПДА, КДА).

Пігментація культур на КДА проявлялася не лише у примордіїв, але й у міцелію та на реверзумі чашки, наприклад, у штамів *F. betulina* 2399, 2770, 2773.

Відзначимо окремі найбільш виразні штамоспецифічні ознаки. Так, на середовищі КДА виявили такі особливості: штам *F. betulina* 2773 найбільше схильний до пігментації (рис. 3.4 Д), а у штаму *F. betulina* 2776 виявлена найвиразніша зональність колонії (рис. 3.4 В). Характер формування зачатків плодових тіл у деяких культур теж відрізнявся. Штам *F. betulina* 311 на МЕА має низьку швидкість росту і розвитку, тому за 28 діб культивування мав незначні зміни у морфології, а також не встигав сформувати примордії на колонії; однак на СДА та інших ПС спостерігалась інша ситуація – примордії поступово формувалися. А на середовищі ГПДА відзначається штам *F. betulina* 327, який формує доволі крупні примордії (0,5–2 см) найшвидше [101].

Схожі результати по морфології штамів *F. betulina* відображені у роботах О.Б. Михайлової [11,42]. Березова губка в культурі так само має колонії з білого повітряного міцелію, сплутаного повстяного характеру, з незмінним реверзумом. На світлі після 20-ї доби культивування формувалися зачатки плодових тіл. Badalyan & Gharibyan [68] при рості *F. betulina* спостерігали білі ватні колонії, з незмінним кольором агару, причому досліджені культури також мали здатність до утворення плодових тіл *in vitro*. На КДА інші штами березової губки [64] мали білий пухнастий, шерстистий та фетроподібний (повстяний) міцелій з напівпрозорими зонами ближче до краю колоній, хоча подекуди на краях спостерігалися міцеліальні скупчення, які слугували зачатками для примордіїв (подібно до наших результатів на рис. 3.4 Б). Також шерстисто-повстяні та шерстисто-ватні колонії з концентричними зонами різної щільності описані для *F. betulina* при рості на різних середовищах: картопляно-глюкозному агарі (КГА), стандартному ГПДА та ГПДА з додаванням CO₂-шроту амаранту [63]. На інших середовищах, наприклад, сусло-агарі [62], у *F. betulina* так само спостерігається тенденція до утворення повстяного міцелію.

Таким чином, виявлено, що характер росту досліджених культур має відмінності як за рахунок використаного поживного середовища, так і за рахунок штамоспецифічності. Найбільш варіабельними ознаками морфології колоній *F. betulina* є щільність поверхні колонії, наявність чи відсутність пігментації, ексудату, зональність, формування примордіїв, відносно сталими – тип, край і колір колонії, зміна кольору реверзума.

3.3 Швидкість радіального росту міцеліальних колоній

Оцінка біотехнологічного потенціалу культур включала визначення швидкості їхнього росту на найбільш вживаних агаризованих поживних середовищах як ключової характеристики макроміцетів-продуцентів. Ріст міцелію можна визначити як швидкість росту міцелію (GR – growth rate), середню швидкість росту (GR_{avr} – growth rate average) [96,97,102] або як радіальну швидкість росту (RGR або Vr) [76,102,104].

Протестовано стандартні середовища, які використовуються для культивування базидіоміцетів, включаючи MEA та КДА [11,105], середовище ГПДА, яке застосовували в попередньому дослідженні росту штамів *F. betulina* [11] та відоме середовище Сабуро (СДА). Досліджені штами *F. betulina* були здатні до росту на усіх поживних середовищах зі швидкістю радіального росту від $3,50 \pm 0,33$ до $8,75 \pm 0,50$ мм/добу (рис. 3.5). Залежно від використаного поживного середовища та штаму, діапазон радіальної швидкості росту дещо різнився: RGR = 3,50–7,25 мм/добу (ГПДА), RGR = 3,69–7,25 мм/добу (СДА), RGR = 3,83–8,06 мм/добу (КДА), RGR = 3,80–8,75 мм/добу (MEA).

Дещо кращі результати росту отримано в іншому дослідженні 11 штамів *F. betulina*, взятих також з IBK [70]. Їхній ріст на 4-х агаризованих середовищах становив: Vr = 4,1–7,2 мм/добу (ГПДА), Vr = 4,6–7,5 мм/добу (сусло-агар), Vr = 5,0–9,5 мм/добу (КДА), Vr = 4,8–7,5 мм/добу (MEA) [11]. В іншій роботі встановлено, що середня швидкість росту (GR_{avr}) для трьох досліджуваних штамів *F. betulina* була в діапазоні 3,6–4,9 мм/добу на сусло-агарі [68]. Однак, деякі дослідники спостерігали навіть вищі швидкості росту міцелію. Badalyan

& Sakeyan [64] протестували 2 штами *F. betulina* на різних середовищах і встановили як помірні швидкості росту ($GR = 2,4\text{--}7,2$ мм/добу на МЕА та глюкозо-пептонному середовищі), так і високі ($GR = 12,0\text{--}14,4$ мм/добу на КДА).

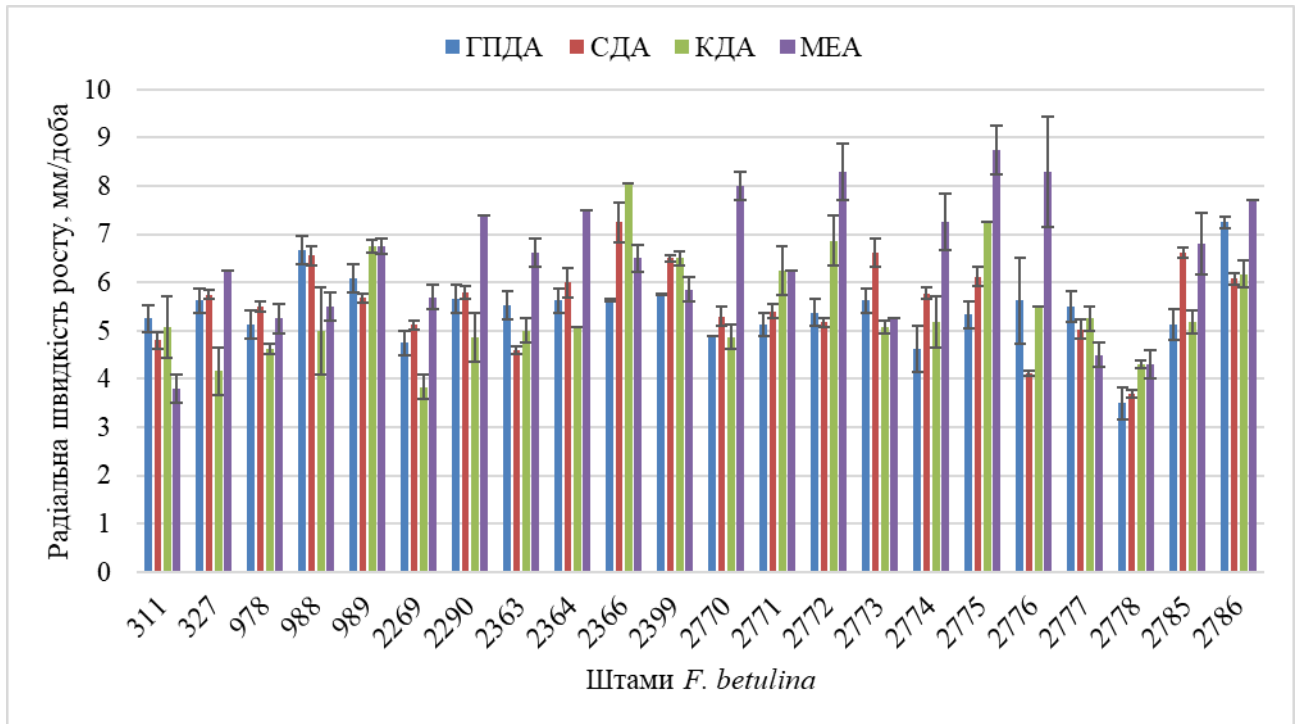


Рисунок 3.5. Вплив поживних середовищ на радіальну швидкість росту штамів *F. betulina*. ГПДА – глюкозо-пептон-дріжджовий агар, КДА – картопляно-декстрозний агар, МЕА – мальт-екстракт агар, СДА – Сабуро-декстрозний агар

На основі запропонованих стратегій росту [62] всі досліджені штами *F. betulina* належать до проміжної групи Р-стратегів зі швидкістю росту (V_r) від 1,3 до 11,9 мм/добу. За іншою класифікацією [42], протестовані штами належать до таких, що ростуть із середньою швидкістю ($V_r = 3,1\text{--}9$ мм/добу).

За результатами експериментів, встановлено вплив поживних середовищ ГПДА, МЕА, КДА та СДА на ріст штамів *F. betulina*. Середовище ГПДА забезпечувало максимальний ріст для штаму *F. betulina* 2786 ($7,25 \pm 0,12$ мм/добу). СДА та КДА сприяли найкращому росту *F. betulina* 2366 ($7,25 \pm 0,41$ мм/добу).

та $8,06 \pm 0,00$ мм/добу, відповідно), тоді як МЕА був оптимальнішим для росту *F. betulina* 2775 ($8,75 \pm 0,50$ мм/добу).

Більшість штамів (59,1 %) проявляли найкращий ріст вибірково на одному із поживних середовищ (рис. 3.6). Зокрема, 11 штамів (50 %) показали оптимальний ріст на МЕА (від $5,70 \pm 0,25$ до $8,75 \pm 0,50$ мм/добу), *F. betulina* 2773 надав перевагу СДА ($6,62 \pm 0,30$ мм/добу), а *F. betulina* 2366 продемонстрував найкращий ріст на КДА ($8,06 \pm 0,00$ мм/добу). Деякі штами (27,3 %) були здатні рости з однаковою швидкістю на двох різних середовищах, а саме: на СДА і МЕА – *F. betulina* 2785, на КДА і МЕА – *F. betulina* 989, 2771 і 2778, на КДА і СДА – *F. betulina* 2399, на ГПДА і СДА – *F. betulina* 988. Слід зазначити, що деякі штами показали однакову швидкість росту і на трьох досліджуваних середовищах: *F. betulina* 311 і 2777 – на ГПДА, СДА і КДА, а *F. betulina* 978 – на ГПДА, СДА і МЕА. Подібну універсальність трьох застосованих середовищ (ГПДА, КГА та ГПДА з додаванням CO_2 -шроту амаранту) для росту однієї культури спостерігали у дослідженні Перегуди та ін. [63].

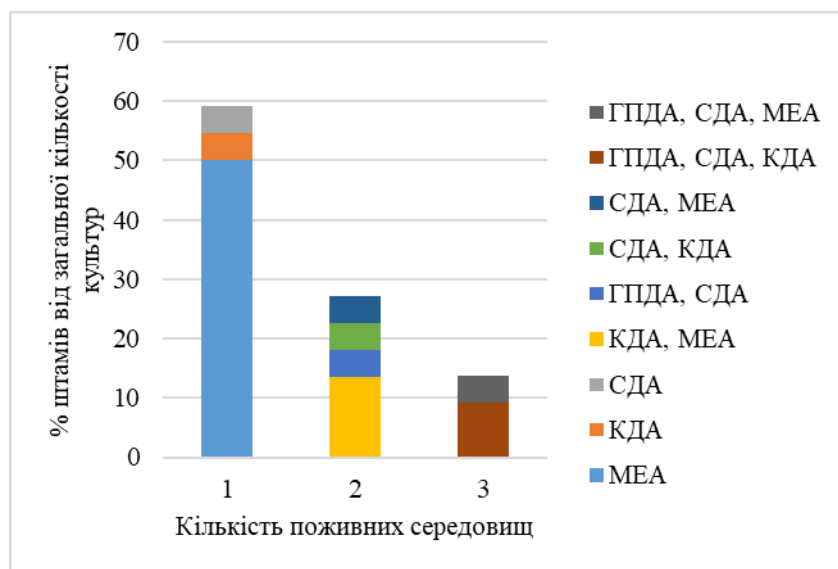


Рис. 3.6. Агаризовані середовища, придатні для максимального росту міцелію штамів *F. betulina*. ГПДА – глюкозо-пептон-дріжджовий агар, КДА – картопляно-декстрозний агар, МЕА – мальт-екстракт агар, СДА – Сабуро-декстрозний агар

На основі вимірювань росту в нашому дослідженні агаризовані середовища можна ранжувати наступним чином: МЕА > СДА > КДА > ГПДА. Натомість середовище КДА було сприятливим для більшості використаних штамів *F. betulina* в інших подібних експериментах [11,64]. Також Ломберг [62] встановила, що досліджені нею культури березової губки надавали перевагу сусло-агару та пшеничному агару.

Аналіз наших результатів свідчить, що мальтоза як джерело вуглецю в МЕА була найбільш придатною для росту більшості досліджених штамів *F. betulina*. Усі використані середовища, окрім КДА, містили пептон як джерело азоту (у різній кількості: від 3 до 10 г/л). В ГПДА також містився дріжджовий екстракт (2 г/л) як джерело азотного живлення.

Отже, отримані дані підтверджують важливість вибору поживного середовища як одного з вирішальних факторів, що впливає на ріст міцелію *in vitro*. За результатами скринінгу 22 штамів *F. betulina* за показником радіальної швидкості росту окреслено штами з найбільшою швидкістю: *F. betulina* 2366 – на середовищах КДА та СДА, *F. betulina* 2775 – на МЕА та *F. betulina* 2786 – на ГПДА.

3.4 Рівень накопичення міцеліальної маси

Оцінка біотехнологічного потенціалу культур включала і визначення продукування міцеліальної біомаси як ще однієї ключової характеристики на найбільш вживаних рідких поживних середовищах. Всі протестовані рідкі середовища (ГПД, СД, МЕ та КД) були придатними для продукування біомаси штамів *F. betulina* (рис. 3.7). Кількість отриманої міцеліальної маси після 14 днів росту суттєво варіювала від $2,28 \pm 0,26$ до $13,72 \pm 0,05$ г/л залежно від середовища та використаного штаму. На середовищах ГПД та СД отримано максимальну масу міцелію для *F. betulina* 311 ($9,06 \pm 0,01$ та $12,44 \pm 0,06$ г/л, відповідно), а КД та МЕ забезпечували максимальний ріст *F. betulina* 2290 ($9,98 \pm 0,02$ та $13,72 \pm 0,05$ г/л, відповідно).

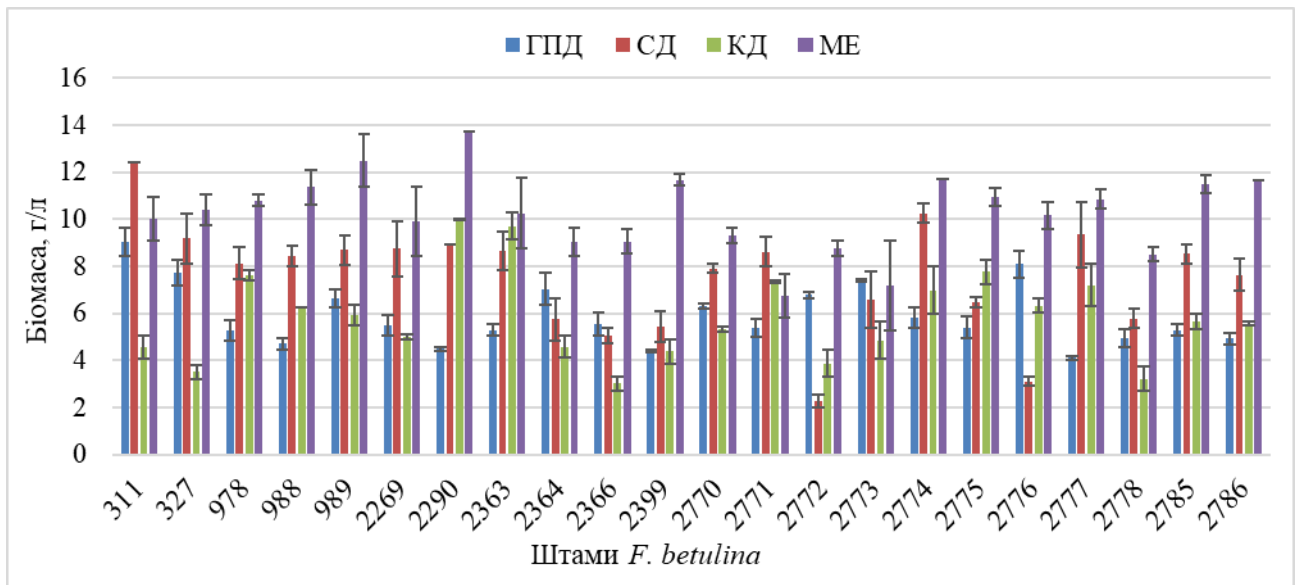


Рис. 3.7. Вплив поживних середовищ на накопичення біомаси штамами *F. betulina*. Середовища: ГПД – глюкозо-пептон-дріжджове, КД – картопляно-декстрозне, МЕ – мальт-екстракт, СД – Сабуро-декстрозне

З чотирьох використаних середовищ МЕ було найкращим для продукування біомаси більшості досліджуваних штамів (68,2 %) (рис. 3.8), тоді як СД було сприятливим для штамів 311 і 2771. Деякі штами *F. betulina* адаптувалися для росту на різних середовищах, утворюючи на них практично однакову кількість біомаси: штами 327, 2269 і 2777 на МЕ і СД; штам 2363 на СД, КД, МЕ; штам 2773 на ГПД, СД, МЕ.

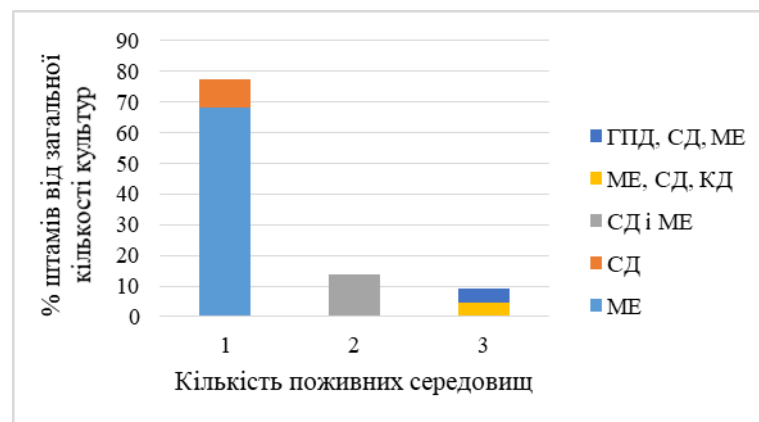


Рис. 3.8. Рідкі середовища, придатні для максимального росту біомаси штамів *F. betulina*. Середовища: ГПД – глюкозо-пептон-дріжджове, КД – картопляно-декстрозне, МЕ – мальт-екстракт, СД – Сабуро-декстрозне

Продуктування біомаси протестованих штамів *F. betulina* було вищим, ніж у штамів *F. betulina* з іншого дослідження [16], вирощених на синтетичному середовищі: 0,9–4,7 г/л (залежно від застосованих джерел вуглецю) та 1,1–4,7 г/л, залежно від досліджуваних джерел азоту. Однак, при підвищенні концентрації глюкози до 30 г/л, накопичена кількість біомаси (до 14 г/л) була аналогічною із отриманими результатами.

Варто зазначити штам *F. betulina* IBK 327, який вивчався раніше [13,15]. Отримано дещо меншу кількість біомаси (7,74 г/л) на ГПД, порівняно з дослідженням [13], де вихід біомаси становив 8,1 г/л на тому ж середовищі. Також встановлено, що УФ-опромінення штаму *F. betulina* 327 знижувало продуктування біомаси (2,6–3,7 г/л) при вирощуванні на середовищі ГПД [15].

Результати порівняльного аналізу росту культур на агаризованих та рідких поживних середовищах показали, що сприяння кожного рідкого середовища утворенню біомаси *F. betulina* демонструє аналогічну закономірність, що й при культивуванні на агаризованих середовищах. Аналіз рівнів продуктування біомаси вказує на те, що найвищий приріст через 14 діб, залежно від оптимального рідкого середовища, можна ранжувати наступним чином: МЕ > СД > КД ≥ ГПД. Згідно з цими даними, використання мальтози як джерела вуглецю в поживному середовищі приводить до більшого виходу міцеліальної біомаси. Для вирощування *F. betulina* в інших дослідженнях також використовували солодовий агар та середовище Хагема (з мальт-екстрактом), що містять мальтозу [45] і середовище за Одду [8].

Більшість використаних поживних середовищ, а саме: ГПД, МЕ та СД, містили пептон як джерело азоту (у різній кількості: від 3 до 10 г/л). Середовище ГПД також містило дріжджовий екстракт (2 г/л) як джерело азоту. На додачу, слід враховувати, що придатність поживного середовища для вирощування штамів *F. betulina* також визначається різним співвідношенням джерел вуглецю та азоту, необхідних для кожної культури.

Загалом, агаризовані та рідкі середовища, що містять мальт-екстракт, сприяли максимальному росту завдяки своєму багатому та поживному

природному складу. Відмінності в рості досліджуваних штамів залежно від використаних середовищ зумовлені наявністю доступних живильних компонентів у поживному середовищі, включаючи неорганічні або органічні речовини, вуглеводи, сполуки азоту та їх співвідношення, а також специфічними потребами кожного штаму в живильних речовинах.

3.5 Рівень накопичення екзополісахаридів

Іншою важливою біотехнологічною характеристикою будь-якої культури є продукування біологічно активних сполук під час росту. Грибні екзополісахариди (ЕПС) є важливими позаклітинними метаболітами, які еволюційно відіграють вирішальну роль в адаптації та функціональності [106,107]. В останні роки значна увага приділяється ЕПС, які визнані високоцінними сполуками з численними застосуваннями [108-110]. Ми зосередили свою увагу на аналізуванні здатності штамів *F. betulina* продукувати ЕПС на різних поживних середовищах, оскільки до наших досліджень цього не вивчали.

Отримані результати демонструють, що досліджені штами *F. betulina* здатні продукувати ЕПС, і їхній вміст на 14 добу культивування варіював від $0,02 \pm 0,00$ до $2,20 \pm 0,31$ г/л залежно від використаного ПС та штаму (рис. 3.9). Середовище ГПД було найбільш придатним для досягнення максимального накопичення ЕПС у *F. betulina* 2399 ($0,23 \pm 0,11$ г/л). Для *F. betulina* 311 було оптимальним середовище СД ($2,20 \pm 0,31$ г/л). КД забезпечувало найвищий рівень утворення ЕПС у *F. betulina* 2269 ($1,68 \pm 0,42$ г/л), а МЕ – у штаму 2770 ($1,28 \pm 0,40$ г/л).

З чотирьох досліджених середовищ найнижчий вміст ЕПС спостерігався при культивуванні на ГПД. У більшості штамів (54,5 %) одне конкретне ПС виявилось більш сприятливим для продукування ЕПС (рис. 3.10): МЕ ефективним для штамів 978, 2770 і 2775; КД – для штамів 988, 989, 2269, 2366, 2399, 2774 і 2777; СД – для штамів 311 і 2290. Деякі штами (36,4 %) були здатні утворювати однаковий вміст ЕПС на двох різних середовищах. Ця тенденція

спостерігалася для штамів 2363, 2772, 2773 і 2778 на СД і КД; для штамів 2776 і 2785 – на СД і МЕ; для штамів 2771 і 2786 – на КД і МЕ. Рівні ЕПС у *F. betulina* 327 і 2364 не мали статистично значущих відмінностей одночасно на трьох ПС (СД, КД і МЕ).

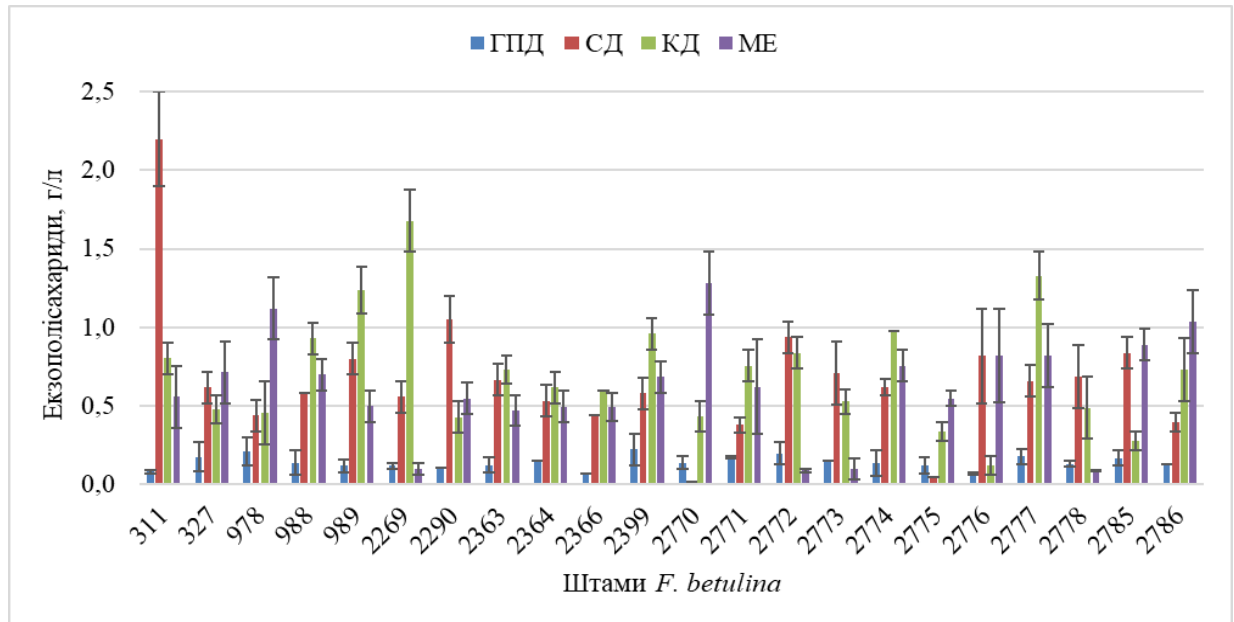


Рис. 3.9. Вплив поживних середовищ на накопичення екзополісахаридів штамми *Fomitopsis betulina*. Середовища: ГПД – глюкозо-пептон-дріжджове, КД – картопляно-декстрозне, МЕ – мальт-екстракт, СД – Сабуро-декстрозне

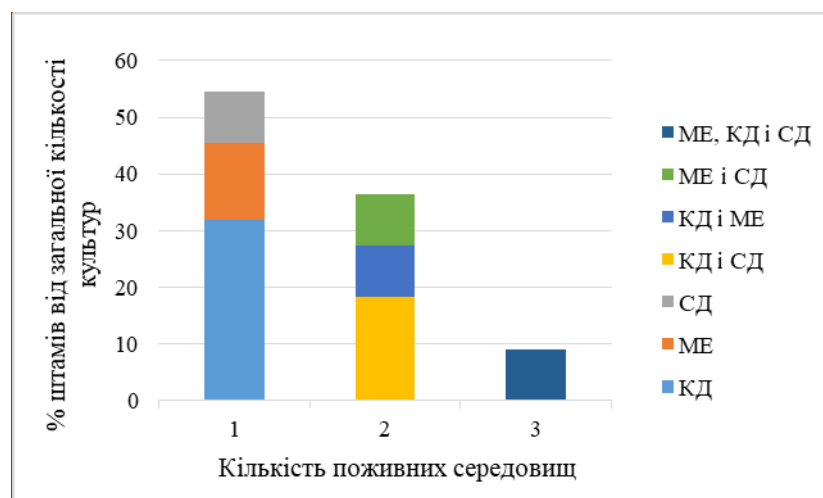


Рис. 3.10. Рідкі середовища, що сприяють утворенню екзополісахаридів штамми *F. betulina*. Середовища: ГПД – глюкозо-пептон-дріжджове, КД – картопляно-декстрозне, МЕ – мальт-екстракт, СД – Сабуро-декстрозне

Результати скринінгу 22 штамів за рівнем накопичення ЕПС дали можливість відібрати найперспективніший штам *F. betulina* 311 та визначити середовище СД придатним для його культивування. Здатність *F. betulina* 311 до біосинтезу позаклітинного біополімеру у відносно великих кількостях може бути генетично детермінована як адаптивна властивість для виживання в більш холодних кліматичних умовах, оскільки цей штам виділено з плодового тіла, зібраного в бореальному середовищі існування.

Середовища, що сприяли продукуванню ЕПС штамми *F. betulina*, можна ранжувати як: КД > СД > МЕ > ГПД. Ймовірно, що декстроза і крохмаль як джерела вуглецю та пептон як джерело азоту у використаних середовищах були сприятливими для утворення ЕПС штамми *F. betulina*. Середовище КД також придатним для продукування ЕПС іншими видами макроміцетів, наприклад, *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray [111], *Clavariadelphus truncatus* (Quél.) Donk, *Cerrena unicolor* (Bull.) Murrill, *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers., *Ganoderma carnosum* Pat., *Lenzites betulina* (L.) Fr., *Lentinus strigosus* Fr. та *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill [108].

Отримані результати узгоджуються з даними досліджень, які показали, що склад середовища може суттєво впливати на накопичення ЕПС [108,112,113]. У різних дослідженнях встановлено суттєві відмінності в кількості утворених полісахаридів: 0,34–16,68 г/л [114] та 3,4–6,8 г/л [115] залежно від виду гриба та періоду інкубації; 0,1–1,1 г/л залежно від виду гриба, періоду інкубації та умов динамічного чи статичного культивування [116]; 0,12–10,90 г/л [108] залежно від конкретного виду базидіоміцета й умов їх культивування (включаючи склад середовища); 1,95–20,97 мг/л [117] залежно від виду гриба.

Рівні продукування ЕПС штамми *F. betulina* можна порівняти із результатами по інших видах базидієвих видів, таких як *Antrodia camphorata* (M. Zang & C.H. Su) Sheng H. Wu, Ryvarden & T.T. Chang, *A. cinnamomea* T.T. Chang & W.N. Chou, *Phellinus igniarius* (L.) Quél., *Pleurotus dryinus* (Pers.) P. Kumm., *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. [108]; *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.,

G. lucidum (Fr.) P. Karst. [108,118]; *Grifola frondosa*, *Schizophyllum commune* Fr. [116,118]; *Polyporus* sp. P. Micheli ex Adans., *P. florida* Berk. [116]; *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer [116,108]; *Auricularia delicata* (Mont. ex Fr.) Henn., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Рисноporus sanguineus* (L.) Murrill, *Trametes trogii* Berk. [118]. Продукування ЕПС штамами *F. betulina* було вищим, ніж при культивуванні *Agaricus subrufescens* Peck, *P. ostreatus*, *P. eryngii* (DC.) Qué. та *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler [117], і нижчим порівняно з *Agaricus nevoii* Wasser, *Auricularia auricula* (L.) Underw., *Fomes fomentarius* (L.) Fr., *Grifola frondosa*, *Inonotus levis* P. Karst., *L. edodes*, *Phellinus* sp. Qué., *P. gilvus* (Schwein.) Pat., *Trametes versicolor* (L.) Lloyd [108]. Слід зазначити, що кількість ЕПС у *F. betulina* може бути додатково підвищена шляхом оптимізації умов культивування, як це показано в дослідженнях з іншими базидієвими грибами, такими як *Ganoderma lucidum* [119], *Hericium coralloides* (Scop.) Pers. [120], *Pleurotus citrinopileatus* Singer [121] та *T. versicolor* [122].

З метою виявлення взаємозв'язку між інтенсивністю росту та здатністю до синтезу екзополісахаридів розраховано потенційну кореляцію між рівнями продукування біомаси та ЕПС досліджуваних штамів, вирощених на різних середовищах. Значення коефіцієнта кореляції Пірсона наведено в таблиці 3.1. Отримані результати продемонстрували наявність позитивної кореляції між біомасою та ЕПС на 2 середовищах: СД та МЕ. Ця кореляція є слабкою ($r = 0,32$ та $0,38$, відповідно) згідно зі шкалою Еванса [123], але може розглядатися як середня за класифікацією Коена [17,124].

Таблиця 3.1

Коефіцієнт кореляції Пірсона (r) між накопиченням біомаси та екзополісахаридів штамами *Fomitopsis betulina*

Середовища	Біомаса			
	ГПД	СД	КД	МЕ
Екзополісахариди	-0,27754	0,324725	-0,05111	0,381848

Примітка: ГПД – глюкозо-пептон-дріжджове, КД – картопляно-декстрозне, МЕ – мальт-екстракт, СД – Сабуро-декстрозне середовище

В іншому дослідженні [125] також відзначається наявність кореляції між накопиченням біомаси та продукуванням ЕПС. Однак максимальний ріст міцелію та найвищий вихід біологічно активних позаклітинних метаболітів часто досягається за різних умов культивування [13,15,126-129]. Відсутність кореляції між утворенням біомаси і ЕПС при культивуванні 51 виду базидіоміцетів встановлено на середовищі ГПД [114]. Крім того, різні штами *S. commune*, *Руспорус sanguineus* (L.) Murrill і *Trametes villosa* показали різні результати продукування біомаси та ЕПС. Подібна тенденція також була виявлена для інших штамів грибів *Agaricus subrufescens*, *P. ostreatus* та *L. edodes* [117].

Отже, усі досліджені штами *F. betulina* можуть рости і продукувати ЕПС на різних рівнях залежно від використаного середовища. Наскільки нам відомо, накопичення ЕПС *F. betulina in vitro* досліджено вперше. За результатами скринінгу, штам *F. betulina* 311 є перспективним продуцентом позаклітинних полісахаридів.

Висновки до розділу 3. Відсутність універсального протоколу умов культивування, придатних для всіх макроміцетів, підкреслює необхідність проведення скринінгових досліджень, щоб забезпечити вихід бажаного рівня біомаси та метаболітів, в т.ч. ЕПС. Отримані результати вказують на штамоспецифічні особливості макроміцетів та важливість підбору оптимального середовища для біосинтетичної активності. Встановлено вплив поживних середовищ на морфологію колоній, швидкість росту, продукування міцеліальної біомаси та ЕПС. Зазначимо, що мальтоза як джерело вуглецю в МЕА та МЕ була найбільш сприятливою для росту міцелію більшості досліджуваних штамів *F. betulina*, тоді як рідке середовище на основі картоплі та декстрази більш придатним для продукування ЕПС.

Оскільки ріст і розвиток грибів мають специфічні характеристики залежно від виду і штаму, існує потреба у розробленні протоколів культивування для конкретної культури. Кожен етап культивування має бути

спрямований на отримання оптимального рівня продуктів штаму-продуцента з мінімальними витратами. З економічної точки зору, значною перевагою є можливість використання одного поживного середовища як для росту біомаси грибів, так і для продукування біологічно активних метаболітів.

За результатами експериментів, штам *F. betulina* 311 проявив біотехнологічний потенціал завдяки високим показникам продукування біомаси та ЕПС. Щоб підвищити вихід ЕПС цього штаму, з'ясувати їх склад та структуру, а також вивчити їх біологічні властивості, необхідні подальші ґрунтовні дослідження, які дозволять оптимізувати умови культивування та оцінити потенціал отриманих полімерів для практичного використання.

Результати експериментальних досліджень даного розділу висвітлено в публікаціях:

Kizitska T, Barshteyn V, Sevindik M, Krupodorova T. Evaluation of *Fomitopsis betulina* strains for growth on different media and exopolysaccharide production. Arch Biol Sci. 2024 July 2;76(3):257-65. DOI: [10.2298/ABS240523018K](https://doi.org/10.2298/ABS240523018K) (Scopus Q3).

Кізіцька ТО, Круподьорова ТА, Ратушняк ВВ, Барштейн ВЮ. Особливості морфології штамів *Fomitopsis betulina* на агаризованих поживних середовищах. В: «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XVIII Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених, 2024 Трав 17; Київ. Київ: КПП ім. Ігоря Сікорського, 2024, с. 102-4.

Kizitska TO, Barshteyn VYu, Ratuchnuak VV, Krupodorova TA. Isolation of macromycete *Fomitopsis betulina* strains – potential producer of biologically active substances. In: Mankovska O, Papuga O, Nesterenko Ye, Sobolevskiy M, Antonenko S, editors. The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology; 2022 June 15-17; Kyiv, Ukraine. Kyiv: IMBG of NAS of Ukraine; 2022. p. 39.

РОЗДІЛ 4

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *FOMITOPSIS BETULINA* ВІДНОСНО ДЕЯКИХ МІКРО- ТА МАКРОМІЦЕТІВ

Представники царства Fungi, які населяють різноманітні екологічні ніші у довкіллі, здатні по-різному впливати на життєдіяльність людини. Наприклад, частина мікроскопічних грибів є нешкідливими сапротрофами чи симбіонтами, також деякі корисні види і штами застосовуються у харчовій, фармацевтичній, сільськогосподарській, біотехнологічній та інших промисловостях. Та все ж значна кількість мікроміцетів здатна до паразитичних взаємодій з рослинами, тваринами та людьми, чим спричиняє велику кількість захворювань та різного ступеня шкоду. Незважаючи на наявність синтетичних антимікотичних препаратів, консервантів та антисептиків, проблема боротьби з паразитичними та патогенними грибами не втрачає своєї актуальності.

Не менш диверсифіковану роль у людському житті відіграють і макроміцети. В той час як велика кількість шапинкових аскомікотових та базидієвих грибів використовуються як їстівні, лікарські, а також як джерела міцеліальних композитних матеріалів, все ж деякі види макроскопічних грибів несуть певну шкоду – є отруйними, паразитичними (як на живій, так і відмерлій деревині тощо).

Через інвазійність деяких видів грибів, а також через виникнення у них резистентності до деяких протигрибкових препаратів, необхідність розширення спектру боротьби з грибовими інфекціями людей та тварин, фітопатогенами, шкідниками харчової, деревообробної та інших промисловостей, передбачає використання біологічних агентів. Живі організми можуть використовуватися як джерела антибіотиків та антимікотичних сполук, або ж як прямі антагоністи та засоби біоконтролю.

Одним із методів дослідження конкурентних взаємодій між грибами є сумісне культивування на агаризованому поживному середовищі [78,79,99,130]. Широковживаним є метод оцінки антагоністичної активності макроміцетів,

запропонований Бадалян та співавторами [78,79], із можливими модифікаціями [131,132]. Даний підхід придатний для первинного скринінгу культур грибів з метою визначення та моделювання *in vitro* потенційних взаємодій між грибами-антагоністами. Це дає можливість відібрати перспективні види і штами, які в подальшому можуть застосовуватися як агенти біоконтролю та джерела біологічно активних сполук з фунгістатичною та фунгіцидною активністю. Антагоністичні взаємодії можуть впливати на морфологію грибів, способи адаптації та закономірності розвитку, тим самим стимулюючи їх здатність до продукування позаклітинних метаболітів, які можна виділяти і вивчати в перспективі [133].

Зазначимо, трутовик *Fomitopsis betulina* є водночас і сапротрофним, і паразитичним, і лікарським грибом. Враховуючи усі властивості цього макроміцета, дослідники використовують його для вивчення багатьох біологічних активностей, в т.ч. антимікотичної [5,45,47,48] та антагоністичної [49,50,99,134]. Через обмежену кількість інформації щодо протигрибкових властивостей березової губки, дослідження її антагоністичної активності лишається актуальним.

4.1 Штамоспецифічні реакції взаємодій *Fomitopsis betulina* і *Cladobotryum mycophilum*

Мікопатогенний гриб *Cladobotryum mycophilum* (анаморфа гриба *Hypomyces odoratus* G.R.W. Arnold), або ж павутинна цвіль, становить загрозу для господарств з вирощування їстівних грибів, здебільшого таких, як *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, і рідше – *Pleurotus eryngii* та *P. ostreatus* [135]. Цей мікопатоген також був виявлений як збудник інфекції у таких видів грибів, як *Ganoderma lucidum* [136], *Coprinus comatus* [137], *Lentinula edodes* [138], *Morchella sextelata* M. Kuo [139], *Lyophyllum decastes* (Fr.) Singer [140]. Даний патоген також виявляли у спеціалізованих господарствах України з вирощування печериць [132], що призводило до серйозних втрат врожаю та економічних збитків. З огляду на виявлені випадки інфікування як їстівних, так

і лікарських макроміцетів, існує нагальна потреба в розробці високоефективних антимікотичних препаратів проти цього патогена.

При спільному культивуванні 22 штамів *F. betulina* та *C. mycophilum* у 100 % випадків спостерігався односторонній антагонізм по підтипу взаємодії S_{A2} – наростання відбувалося з боку патогену на досліджені штами макроміцету. Тобто *C. mycophilum* виявився досить інвазивним і патогенним, як і відносно їстівних макроміцетів, які цей вид вражає, а *F. betulina* не проявив антагоністичних властивостей відносно цього гриба. Відповідно, в іншому дослідженні [132] *C. mycophilum* так само очікувано пригнічував ріст штамів *A. bisporus* IBK 2198, 2440 і 5422. При застосуванні у подвійній культурі ще одного мікофільного гриба – *Trichoderma harzianum* Rifai – штам *C. mycophilum* все ще виявляв більшу АА (частове наростання на *T. harzianum*). Однак даний штам *T. harzianum* був здатний пригнічувати ріст культури *Cladobotryum* sp. Nees (спокійне наростання по типу С). Тому можна припустити, що для біологічного контролю павутинної цвілі, спричиненої грибами роду *Cladobotryum*, мікроміцети мають більшу перспективу, ніж базидієві гриби, які є мішенню цього паразита.

Таким чином, дослідження взаємодій між штамми *F. betulina* та *C. mycophilum* продемонстрували відсутність штамоспецифічних реакцій. Цей результат свідчить про універсальну, недиференційовану реакцію штамів *F. betulina* на присутність *C. mycophilum* або ж про відсутність у них ефективних захисних механізмів. Висока агресивність *C. mycophilum* потребує подальших пошуків дієвих проти нього біологічних агентів. Зважаючи на високу інвазивність *C. mycophilum*, підтверджену в цьому дослідженні, виникає нагальна необхідність у подальшому пошуку та розробці ефективних біологічних агентів або альтернативних стратегій контролю для мінімізації його потенційного негативного впливу. Ці дані підкреслюють важливість комплексного підходу до вивчення міжвидових мікробних взаємодій для розробки цілеспрямованих методів біоконтролю.

4.2 Штамоспецифічні реакції взаємодій *Fomitopsis betulina* і *Aspergillus* spp.

Гриби роду *Aspergillus* належать до умовно-патогенних мікроміцетів, які є поширеними контамінантами навколишнього середовища, продуктів харчування та лікарняних приміщень [141]. Серед них особливу клінічну й епідеміологічну значущість становлять *Aspergillus fumigatus* [142] і *A. niger* [143]. Ці мікроміцети характеризуються високою екологічною пластичністю, здатністю до утворення великої кількості спор та швидким ростом за різних умов.

Такий цвілевий гриб як *A. fumigatus* здатний викликати інвазивну легеневу інфекцію у людей з пониженим імунітетом, які перенесли трансплантацію органів, лікуються від онкологічних хвороб або ж страждають на ВІЛ/СНІД. Тож доцільність пошуку сировини для створення нових високоефективних антимікотичних препаратів проти цього патогена не викликає сумнівів [144].

Антагоністичну активність щодо *A. fumigatus* продемонстрували лише 27,3 % штамів *Fomitopsis betulina*, тоді як у переважній більшості випадків (72,7 %) спостерігалось домінування *A. fumigatus*, яке проявлялося у вигляді інтенсивного наростання його колоній на культурах березової губки (рис. 4.1).

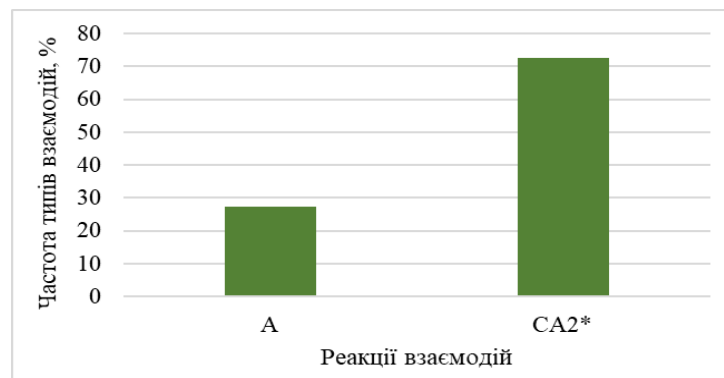


Рис. 4.1. Частота взаємодій у подвійній культурі між колоніями досліджених штамів *F. betulina* і *A. fumigatus*

Примітка: А – двостороннє гальмування росту колоній при контакті; CA2* – повне наростання колонії *A. fumigatus* на *F. betulina* після взаємного гальмування росту при контакті

Антагоністична взаємодія між *F. betulina* та *A. fumigatus* характеризувалася варіабельністю реакцій, залежно від тривалості культивування. Так, після 7 доби більшість досліджуваних штамів *F. betulina* (90,9 %) проявляли тип взаємодії А. Проте, 2 штами – *F. betulina* 2290 і 2770 – проявили незначну антимікотичну активність невеликим наростанням на *A. fumigatus* (підтип C_{A1}). Однак, наприкінці культивування (28 діб) *A. fumigatus* проявив сильнішу АА відносно усіх досліджених штамів *F. betulina*. 16 штамів березової губки мали тип взаємодії C_{A2}, де *A. fumigatus* наростав на культури *F. betulina*. Інші 6 штамів (*F. betulina* 327, 978, 2399, 2774, 2777, 2785) мали тип взаємодії А зі значним переважанням діаметру колонії антагоніста. Тобто, хоч *A. fumigatus* в даному випадку також мав переважаючу АА, однак ці штами березової губки все ж незначною мірою стримували ріст цього мікроміцета.

Тенденцію до невираженої антимікотичної активності березової губки відносно *A. fumigatus* спостерігали й інші дослідники. Метанольні екстракти культуральної рідини двох штамів *F. betulina* проявили слабку антимікотичну дію відносно *A. fumigatus* із незначними зонами інгібування росту [48]. В свою чергу, етанольні екстракти плодових тіл *F. betulina* не пригнічували ріст *A. fumigatus*, однак змінювали морфологію його росту (спричиняли розгалуження гіф), що свідчить про наявність у цих екстрактах певних активних компонентів [47].

Мікроскопічний гриб *Aspergillus niger* є як і корисним організмом (відомий як продуцент лимонної та глюконової кислот у промисловості), так і шкідливим (бере участь у псуванні продуктів харчування, пошкодженні матеріалів, також є фітопатогеном та опортуністичним збудником захворювань людини). Відповідно, вивчено дію 22 штамів березової губки на *A. niger* IFBG 134. Дане дослідження проведене на двох поживних середовищах: КДА та МЕА, щоб оцінити вплив на ріст та опірність аспергіла.

Важливо зазначити, що залежно від мінливості морфології *A. niger* на середовищі КДА (щільності міцелію, забарвлення, інтенсивності спороношення і т.д.), реакції взаємодій в різних повторностях варіювали. За підрахунками

максимальної активності *F. betulina* встановлено три основні типи: взаємне гальмування росту при контакті колоній, наростання березової губки на колонії аспергіла та навпаки (рис. 4.2).

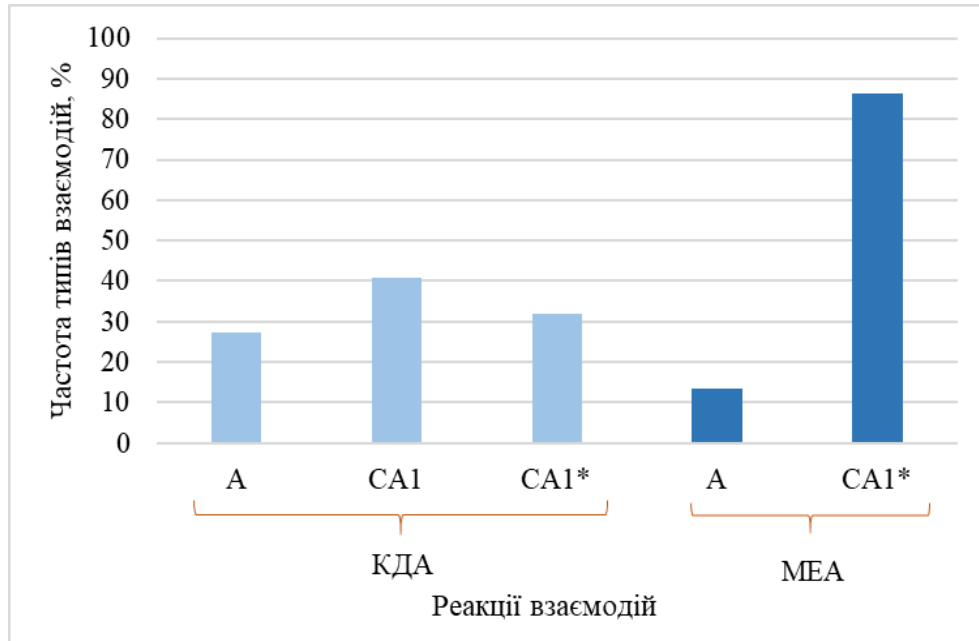


Рис. 4.2. Частота взаємодій у подвійній культурі між колоніями досліджених штамів *F. betulina* і *A. niger*

Примітка: А – взаємне гальмування росту колоній при контакті; CA_1 – часткове наростання колонії *F. betulina* на *A. niger* після взаємного гальмування росту при контакті. CA_1^* – часткове наростання *A. niger* на *F. betulina* після взаємного гальмування росту при контакті

Через те, що середовище МЕА було більш сприятливим для росту *A. niger*, культури березової губки в цьому досліді практично не проявляли антагоністичної активності (міцелій *A. niger* у 86,4 % випадків наростав на колонії *F. betulina*). Також колонії мікроміцета мали більшу площу і були щільнішими за консистенцією, ніж на КДА (рис. 4.3).

Відповідно, через нестабільність взаємодій між грибами-антагоністами, один зі штамів, а саме *F. betulina* 327, проявив різні реакції з *A. niger* на КДА: у проведеному досліді відбувався двосторонній антагонізм по типу А, а в іншій роботі [50] – часткове пригнічення *A. niger* по підтипу CA_1 .

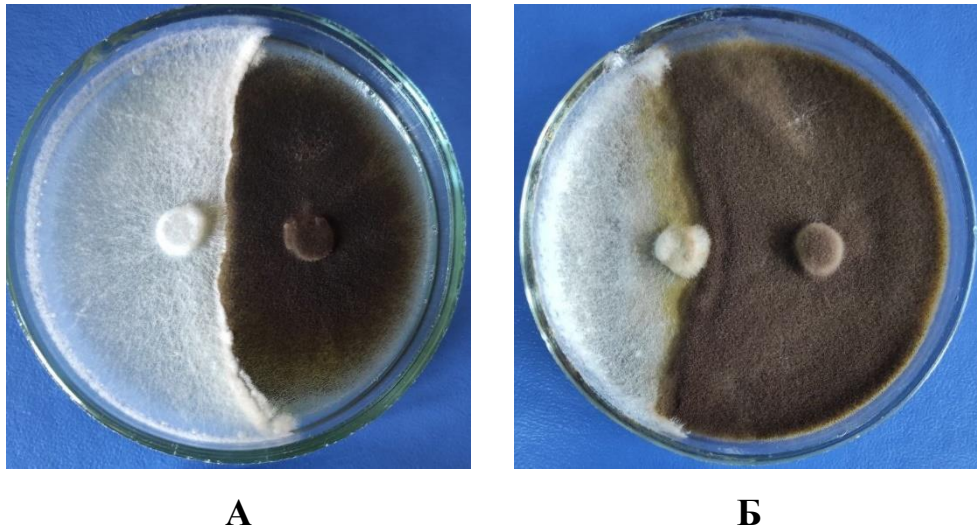


Рис. 4.3. Реакції взаємодії штаму *F. betulina* 2772 (на чашках знаходиться зліва) з *A. niger* (на чашках справа). **А** – взаємодія підтипу C_{A1} з боку *F. betulina* на КДА; **Б** – взаємодія підтипу C_{A1} з боку *A. niger*

Інші макроміцети здатні пригнічувати ріст *A. niger* на рівні з *F. betulina*: тупикові колонії при контакті утворювали *Coprinus comatus*, *Cordyceps militaris* (L.) Fr. 1862, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Grifola frondosa*, *Hericius erinaceus* (Bull.) Pers., *Morchella esculenta* (L.) Pers., *Mensularia radiata* (Sowerby) Lázaro Ibiza, *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G.H. Sung, *Phellinus igniarius*, *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn, *P. eryngii*, *Pseudospongipellis litschaueri* (Lohwag) Y.C. Dai et Chao G. Wang, *Schizophyllum commune* [50] та *Xylaria longipes* Nitschke [131]. Однак, деякі гриби здатні призупиняти ріст аспергіла на відстані, наприклад, *X. polymorpha* (Pers.) Grev [131]. Часткове пригнічення шляхом наростання на *A. niger* здатні здійснювати *Auriporia aurea* (Peck) Ryvarden, *Cyclocybe aegerita* (V. Brig.) Vizzini, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst., *Ganoderma applanatum*, *G. lucidum*, *Lentinula edodes*, *Oxyporus obducens* (Pers.) Donk, *P. ostreatus* [50], *X. polymorpha* та *X. longipes* [131]. Існують також і більш сильні антагоністи з можливістю повного пригнічення росту чорного аспергіла: *Crinipellis schevczenkoi* Bukhalo, *Ganoderma lucidum*, *Hohenbuehelia myxotricha* (Lév.) Singer, *Laetiporus sulphureus* [50], *P. ostreatus* [91] і *Trametes versicolor* [50].

Враховуючи усі труднощі роботи з пліснявими грибами, зокрема *A. niger*, пошук ефективних засобів їх пригнічення потребує більш глибоких досліджень, які враховують швидку мінливість даного виду. Серед штамів березової губки перспективними є ті, які мали здатність до прояву часткового наростання на аспергіл, а саме *F. betulina* 311, 978, 989, 2770, 2771, 2772, 2775, 2776 та 2778.

4.3 Штамоспецифічні реакції взаємодій *Fomitopsis betulina* і *Penicillium polonicum*

Психротолерантний ксерофільний гриб *Penicillium polonicum* спричиняє псування різних продуктів харчування, таких як цибуля, крупи, в'ялене м'ясо, арахіс, цитрусові, бульби батату та імбиру. Крім того, присутність *P. polonicum* може наражати кінцевих споживачів на можливі ризики для здоров'я, оскільки цей гриб зазвичай пов'язаний з продукуванням мікотоксинів, цитриніну, пеніцилінової кислоти, нефротоксичних глікопептидів, верукозидину [145]. При вивченні взаємодій культур березової губки із *P. polonicum* IFBG 138 виявлено, що більшість штамів *F. betulina* (72,7 %) мали тип взаємодії А зі значним переважанням діаметру колоній *P. polonicum*. Це свідчить про пригнічення штамів *F. betulina* даним умовно-патогенним мікроорганізмом (рис. 4.4).

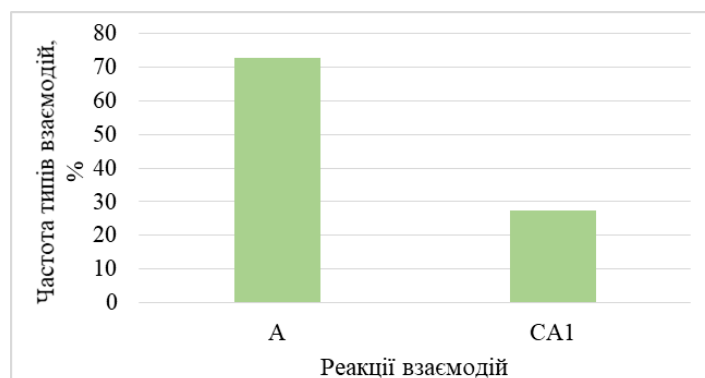


Рис. 4.4. Частота взаємодій у подвійній культурі між колоніями досліджених штамів *F. betulina* і *P. polonicum*

Примітка: А – двостороннє гальмування росту колоній при контакті; CA₁ – часткове наростання колонії *F. betulina* на *P. polonicum* після взаємного гальмування росту при контакті

Решта штамів *F. betulina* (27,3 %) виявили антагоністичну активність, що проявлялася у вигляді підтипу взаємодії C_{A1} – спостерігалось часткове наростання колоній *F. betulina* на колонії *P. polonicum*. Ймовірно, антагоністичний ефект березової губки щодо цвілевих грибів зумовлений виділенням певних вторинних метаболітів. Встановлено, що антибіотик піптамін, ізольований зі штаму *F. betulina* Lu 9-1 мав мінімальну інгібувальну концентрацію >50 мкг/мл щодо *Penicillium chrysogenum* Thom (синонім *Penicillium notatum*) [5].

Здебільшого, міцелій штамів *F. betulina* мав рівномірний повстятий характер росту (з вищою чи нижчою щільністю, залежно від штаму), а *P. polonicum* не формував суцільну колонію, а розсівався спорами. Як і багато представників роду *Penicillium*, *P. polonicum* проявляв здатність до утворення пігментів, які дифундували в агар (рис. 4.5).



Рис. 4.5. Подвійна культура *F. betulina* 2363 (зліва) та *P. polonicum* (справа) з типом взаємодії В

Примітка: навколо колоній *P. polonicum* спостерігається дифузія пігментів в агаризоване середовище

Отримані результати узгоджуються з попередніми дослідженнями, в яких спостерігалось аналогічне виділення жовтого пігменту в агар культурами *P. polonicum* при їх спільному культивуванні зі штамми макроміцета *Xylaria polymorpha* [108]. Ймовірно, ці вторинні метаболіти виділялися у якості захисного механізму проти міцелію березової губки, оскільки пігменти можуть вироблятися в цитоплазмі грибів або в результаті стресових умов

навколишнього середовища (температура, зневоднення, зміна осмотичного тиску або рН), або через подразнення подразника від інших конкурентних організмів [146].

Однак, у деяких повторностях спостерігалася варіабельність характеру взаємодій між досліджуваними грибами, що може бути зумовлено біологічною мінливістю мікроміцета, чутливістю до умов культивування, а також додатковим розсіюванням спор, що гальмувало ріст *F. betulina*. Зокрема, у штамів, які переважно демонстрували підтип взаємодії C_{A1} , у поодиноких випадках фіксувалися відхилення у напрямку типів взаємодії А або В (рис. 4.6), коли зростання колоній припинялося або безпосередньо при контакті, або на відстані 1–3 мм одна від одної. Водночас зберігалася домінування активності *F. betulina*, оскільки діаметр її колоній не поступався розмірам колоній *P. polonicum*.

У зв'язку з описаною мінливістю, в окремих повторностях відбувалися зміни морфології як міцелію *F. betulina*, так і *P. polonicum*, що спостерігалось при сумісному культивуванні зі штамом *F. betulina* 2777. В зоні контакту спостерігалися концентричні півкільця, які виходили з колонії *P. polonicum*, і, відповідно, деформували краї колонії *F. betulina* 2777 (рис. 4.6 А).

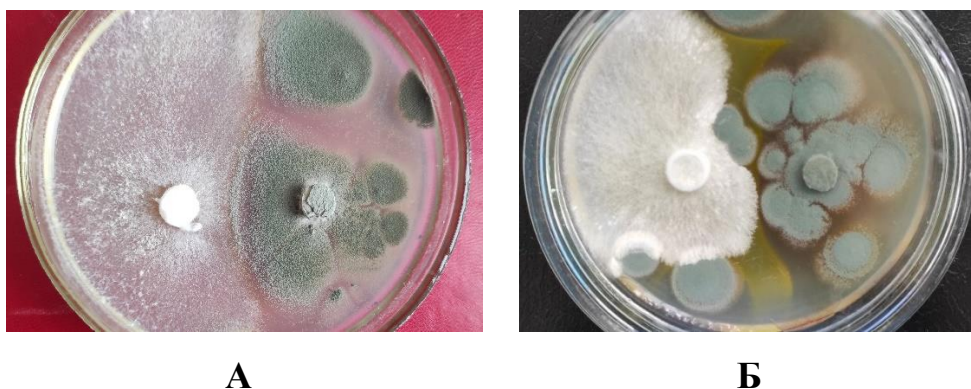


Рис. 4.6. Варіанти антагоністичної взаємодії штаму *F. betulina* 2777 (на чашках знаходиться зліва) з *P. polonicum* (на чашках колонії справа). **А** – взаємодія типу А зі зміною морфології обох колоній в зоні контакту. **Б** – взаємодія підтипу C_{A1} (з вираженою дифузією пігментів *P. polonicum*)

Крім того, зазначений штам березової губки був здатен змінювати тип взаємодії А на підтип С_{A1} (рис. 4.6 Б), що може свідчити про його адаптивну реакцію на змінні умови спільного культивування або про наявність механізмів регуляції антагоністичної активності.

Варіабельність як макроміцетів, так і мікроміцетів під час зберігання у колекціях культур [98], а також через стресові умови довкілля, може спричиняти значні відмінності у результатах досліджень. Так, штам *F. betulina* 327 у здійсненому дослідженні взаємодіяв з *P. polonicum*, утворюючи тупикову колонію по типу А, проте в одній з попередніх робіт встановлено повне інгібування *P. polonicum* даним штамом березової губки (підтип С_{A2}) [50]. У цій же роботі при використанні інших макроміцетів у подвійній культурі з *P. polonicum* частина з них проявляли подібні до встановлених реакцій. Наприклад, до антагонізму по типу А були схильні культури *Coprinus comatus*, *Flammulina velutipes*, *Fomitopsis pinicola*, *Grifola frondosa*, *Hypsizygus marmoreus* (Peck) H.E. Bigelow, *Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo, *Mensularia radiata*, *Ophiocordyceps sinensis* та *Phellinus igniarius*. Часткове наростання (підтип С_{A1}) на *P. polonicum* проявили *Cordyceps militaris*, *Crinipellis schevczenkoii*, *Cyclocybe aegerita*, *Hohenbuehelia myxotricha*, *Laetiporus sulphureus*, *Pleurotus djamor*, *P. eryngii*, *Pseudospongipellis litschaueri* та *Schizophyllum commune*. Інгібування росту на відстані (тип В) із *P. polonicum* проявив макроміцет *Hericium erinaceus*.

Подібний рівень АА, як і у досліджених штамів березової губки, мали такі макроміцети роду *Xylaria*, як *X. polymorpha* та *X. longipes* [131]. Згідно з літературними даними, міжштамова варіабельність взаємодії з *P. polonicum* була чітко вираженою. Так, п'ять штамів *X. longipes* утворювали тупикові колонії за типом А, тоді як п'ять штамів *X. polymorpha* виявляли реакцію типу В (зупинку росту міцелію на певній відстані від колоній *P. polonicum*). Водночас інші п'ять штамів *X. longipes* та чотири культури *X. polymorpha* проявляли антагоністичну взаємодію за підтипом С_{A1}. Показовим прикладом штамоспецифічної реакції був *X. polymorpha* 2382, для якого зафіксовано

унікальний тип взаємодії C_{B1} , коли часткове наростання відбувалося уже після взаємної зупинки росту на дистанції.

Штами макроміцетів, використані в іншому дослідженні [147], також мали схожі патерни реакцій із *Penicillium* sp. Тупикові колонії утворювали культури *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr. 2510 і 2511, а також *Sparassis nemecii* Pilát & Veselý 2327. Часткове наростання на колонії пеніцила здійснили штами *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bondartsev & Singer 2497, 2498, 5004 і *S. laminosa* Fr. 2211.

На основі всіх проведених спостережень, виявлено, що реакція *P. polonicum* на метаболіти *F. betulina* була не універсальною, а залежала від конкретного штаму гриба-антагоніста. Зокрема, штами *F. betulina* 2364, 2399, 2770, 2773, 2776 та 2777 виявили виражену антимікотичну активність щодо *P. polonicum*. Виявлені штами *F. betulina* становлять значний інтерес для подальших досліджень з метою ідентифікації та характеристики антимікотичних метаболітів, які можуть бути використані в біотехнології та медицині для боротьби з патогенними грибами, зокрема *P. polonicum*.

4.4 Штамоспецифічні реакції взаємодій *Fomitopsis betulina* і фітопатогенних видів

Мікроскопічні фітопатогенні гриби завдають значної шкоди сільському господарству, знижуючи якість і кількість врожаю та спричиняючи цим вагомі економічні збитки. За рахунок накопичення мікотоксинів у рослинах вони також загрожують здоров'ю людей та тварин. Хімічні засоби боротьби з фітопатогенами не є універсальними, оскільки деякі мікроміцети набули резистентності до часто використовуваних препаратів, а також мають певний негативний вплив на довкілля. Через це, біологічний контроль захворювань рослин стає все більш актуальним. Найбільш поширеним у цьому плані є застосування мікроміцетів, наприклад, аскомікотових грибів роду *Trichoderma*. Щодо макроміцетів з цього питання існують лише диверсифіковані літературні дані. За рахунок фізичних та хімічних механізмів поширення у довкіллі та

виживання шапинкові гриби так само мають потенціал для дослідження їх активності [148].

Microdochium nivale та *Fusarium poae* – це мікроміцети, відомі як патогени ячменю, пшениці та інших зернових культур. *M. nivale* спричиняє цвіль проростків, кореневу гниль, хвороби листя та колосків. *F. poae* є причиною фузаріозу зернових, і також становить особливу небезпеку через виділення мікотоксинів [149].

В результаті експериментів у подвійній культурі з'ясовано, що усі штами *F. betulina* проявили 100 % антагоністичну активність по підтипу реакції C_{A2} відносно *M. nivale*, тобто міцелій березової губки повністю наростав на колонії патогена. Аналогічну тенденцію до повного пригнічення *M. nivale* з реакцією C_{A2} мали також штами *P. ostreatus*, які за рахунок високої швидкості росту уже за 14 днів культивування повністю заростали колонії патогена [91].

Відносно мікроміцета *F. poae* штами *F. betulina* проявляли різні антагоністичні взаємодії: $C_{A1} + A$ – часткове наростання *F. betulina* на *F. poae* і навпаки, плюс часткове взаємне гальмування росту; взаємний антагонізм C_{A1} – наростання колоній одна на одну в різних точках контакту; C_{A1} – часткове наростання *F. betulina* на колонії *F. poae*. Варіабельність взаємодій, ймовірно, відбувалася за рахунок штамоспецифічності *F. betulina* та мінливості *F. poae* (рис. 4.7). В той час як міцелій *F. betulina* у подвійній культурі формував у своїй більшості ватно-повстяні колонії, морфологія *F. poae* мала високий рівень варіабельності: гладенькі жовті колонії з пухнастими вкрапленнями в зоні інокулюму (рис. 4.7 В), пухнасті рожеві колонії (рис. 4.7 Г), а також суміш цих проявів (рис. 4.7 А, Б). Залежно від кольору, в агар дифундували відповідні пігменти (рис. 4.7 Б).

Зазначимо, що наявність взаємного антагонізму по типу C_{A1} у гриба *F. betulina* була описана в літературі [99]. Таку взаємодію березова губка мала із *Trametes versicolor* (синонім *Coriolus versicolor* (L.) Quel.). Міцелій *T. versicolor* наростав на колонію *F. betulina* по боках лінії контакту, тоді як

F. betulina наростає на *T. versicolor* по центру (подібно до реакції з *F. roae* на рис. 4.7 А).

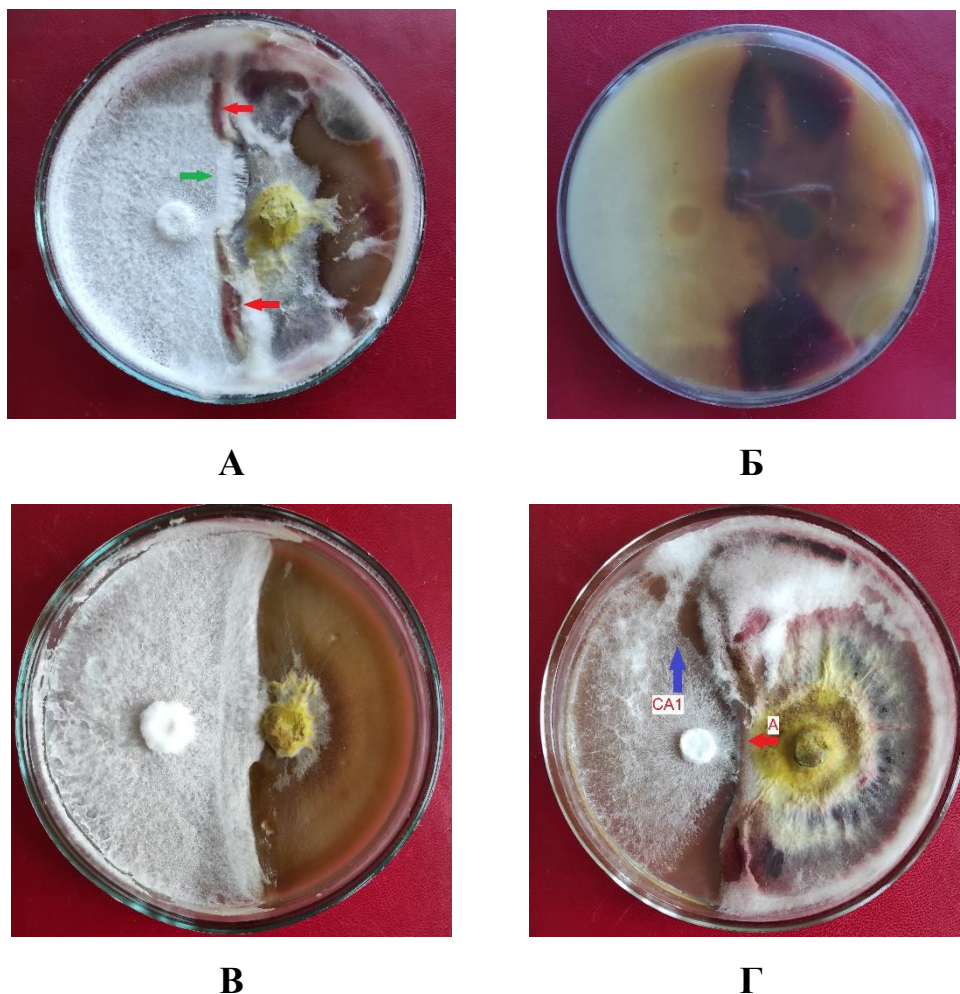


Рис. 4.7. Антагоністична взаємодія штамів *F. betulina* (на чашках зліва) з *F. roae* (колонії справа). А – взаємна реакція C_{A1} з *F. betulina* 978, точки взаємодій вказані стрілками; Б – взаємна реакція C_{A1} з *F. betulina* 978 (реверзум) із вираженою дифузією в агар пігментів *F. roae*; В – реакція C_{A1} з боку *F. betulina* 2364; Г – часткове наростання *F. roae* на *F. betulina* 311 (C_{A1}) і часткове взаємне гальмування росту (А), точки взаємодій вказані стрілками

Розподіл частоти реакцій відбувався наступним чином: часткове наростання *F. betulina* на *F. roae* і часткове взаємне гальмування росту – у 4,5 % випадків (рис. 4.8), часткове наростання *F. roae* на *F. betulina* і часткове взаємне гальмування росту – 9,1 % випадків, а також взаємний антагонізм по

підтипу C_{A1} , тобто взаємне наростання колоній одна на одну – у 27,3 % випадків. Однак у більшості випадків (59,1 %) штами березової губки частково наростали на колонії *F. poae* (реакція C_{A1}), тож проявляли вищу АА.

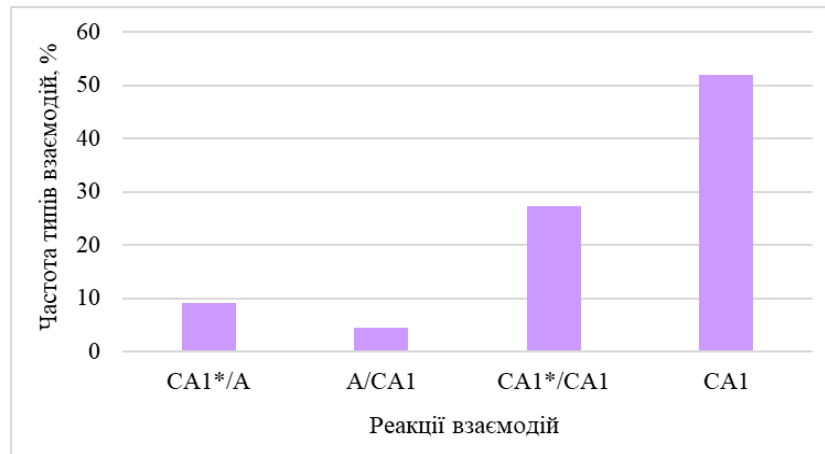


Рис. 4.8. Частота взаємодій у подвійній культурі між колоніями досліджених штамів *F. betulina* і *F. poae*

Примітка: $CA1^*/A$ – часткове наростання *F. poae* на *F. betulina* і часткове взаємне гальмування росту; $A/CA1$ – часткове взаємне гальмування росту і часткове наростання *F. betulina* на *F. poae*; $CA1^*/CA1$ – наростання колоній одна на одну в різних точках контакту; $CA1$ – часткове наростання колонії *F. betulina* на *F. poae* після взаємного гальмування росту при контакті

Взаємодії макроміцетів із мікроскопічними фітопатогенами, в т.ч. роду *Fusarium*, досліджувалися і раніше. Бадалян зі співавторами [78] визначили рівні АА 17 видів макроміцетів щодо паразитів зернових культур *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.) Shoem., *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Von Arx & Olivier var. *tritici* Walker та *Rhizoctonia cerealis* Van der Hoeven. За величиною розрахованого антагоністичного індексу (AI) >15 встановлено найбільш активні види: *P. ostreatus*, *Hypholoma fasciculare* (Fr.) Kumm., *Ganoderma lucidum*, *Lentinus tigrinus* (Bull.: Fr.) Sing. та *Schizophyllum commune*, які повністю (C , C_{A2} , C_{B2}) або частково (C_{A1}) наростали на колонії досліджених патогенів рослин. Штами *P. ostreatus* [91] також були здатні до повного пригнічення росту *F. poae*, тобто проявили більшу АА за досліджені культури *F. betulina*.

Вивчено АА 10 штамів *X. polymorpha* і 10 штамів *X. longipes* відносно *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (фітопатоген, який також спричиняє оніхомікози та системні інфекції у людей). Всі штами *X. polymorpha* проявили інгібували *F. solani* (по типу C_{A1} та C_{A2}). Натомість лише 5 штамів *X. longipes* реагували з *F. solani* за типом C_{A1} , тоді як решта утворювали тупикові колонії (по типу А і В) [131].

Таким чином встановлено, що всі штами *F. betulina* проявили 100 % антагоністичну активність за типом реакції C_{A2} щодо *Microdochium nivale*, що характеризувалося повним наростанням міцелію антагоніста на колонії патогена. Це свідчить про високий антагоністичний потенціал *F. betulina* проти *M. nivale*. Крім того, 59,1 % досліджених штамів продемонстрували перспективу застосування проти *Fusarium poae*, що підтверджує доцільність подальшого вивчення їх біологічної активності у системах захисту рослин.

4.5 Штамоспецифічні реакції взаємодій *Fomitopsis betulina* і *Sacharomycetaceae*

Серед мікроміцетів вирізняються своєю розповсюдженістю та небезпекою опортуністичні патогени *Candida albicans* та *Pichia kudriavzevii* (синоніми: *Candida krusei*, *Issatchenkia orientalis*). І якщо мікроорганізм *C. albicans* часто присутній в мікробіомі людини та спричиняє кандидозні інфекції лише за певних умов, то *P. kudriavzevii* більш відомий як один із збудників внутрішньолікарняних інфекцій [49,150].

Про антимікотичну активність березової губки відносно грибів роду *Candida* уже відомо з даних літератури. Наприклад, піптамін, який утворювався штамом *F. betulina* Lu 9-1, мав мінімальну інгібувальну концентрацію 6,25 мкг/мл відносно *C. albicans* [5]. Також етилацетатний екстракт культуральної рідини *F. betulina* проявив антимікотичну активність відносно *C. maltosa* (зона інгібування 8 мм), в той час як водні, метанольні та гексанові екстракти міцелію і плодових тіл не мали такої активності [45].

При спільному культивуванні клінічного резистентного штаму *C. albicans* 319 із 22 штамами *F. betulina* на КДА здебільшого спостерігалася тенденція до часткового або повного пригнічення мікроміцета (рис. 4.9).

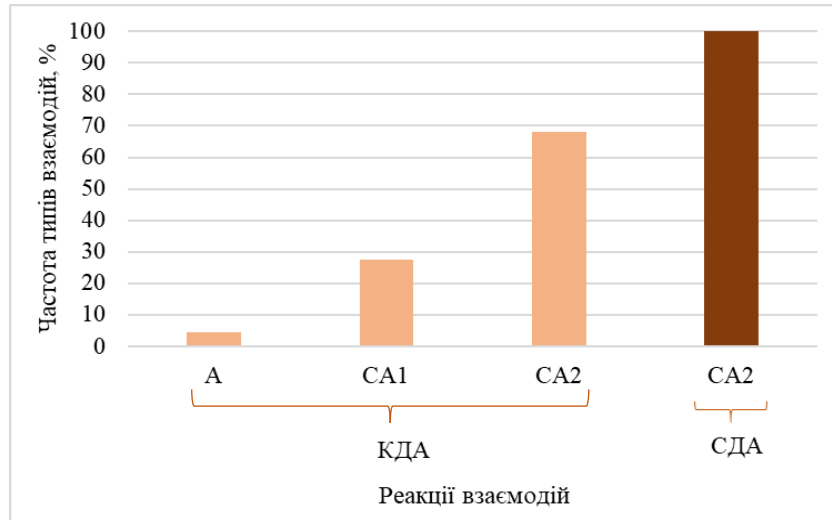


Рис. 4.9. Частота взаємодій у подвійній культурі між колоніями досліджених штамів *F. betulina* і *C. albicans*

Примітка: А – двостороннє гальмування росту колоній при контакті; С_{А1} – часткове наростання колонії *F. betulina* на *C. albicans* після взаємного гальмування росту при контакті; С_{А2} – повне наростання колонії *F. betulina* на *C. albicans* після взаємного гальмування росту при контакті; КДА – картопляно-декстрозний агар; СДА – Сабуро-декстрозний агар

Лише штам *F. betulina* 2786 формувал тупикові колонії (тип реакції А). Додатково до здійсненого експерименту на поживному середовищі КДА, проведено інкубування в подвійній культурі штамів *F. betulina* із *C. albicans* 319 та *P. kudriavzevii* 301 на СДА, оскільки середовище Сабуро є спеціалізованим для культивування дріжджів та дріжджоподібних мікроорганізмів і потенційно може сприяти прояву сильнішої АА у досліджених мікроміцетів. Натомість виявилось, що це середовище сприяє також і розвитку штамів *F. betulina*, через що вони проявили навіть кращу АА, ніж на КДА, та повністю наростали на колонії *C. albicans*.

Залежно від використаного середовища, колонії *F. betulina* відрізнялися. На КДА спостерігався напівпрозорий борошнисто-повстятий міцелій (рис. 4.10 А, Б, В), тоді як на СДА березова губка росла інтенсивніше, формуючи пухнасті

ватяні колонії більшої щільності (рис. 4.10 Г). Як і у випадку з *P. polonicum*, взаємодії *F. betulina* з *C. albicans* можуть зазнавати варіацій. Наприклад, досліджені штами *F. betulina* 327 та *C. albicans* 319 мали взаємодію по підтипу C_{A2} (рис. 4.10 В), тоді як у роботі [49] ці ж штами взаємно зупиняли ріст одне одного (тип А), при цьому *C. albicans* 319 демонстрував поліморфізм колонії. Однак, щодо інших штамів *C. albicans*, штаму *F. betulina* 327 демонстрував реакцію, аналогічну до спостереженої, що проявлялася у повному наростанні на патоген.



А



Б



В



Г

Рис. 4.10. Варіанти антагоністичної взаємодії штамів *F. betulina* (на чашках зліва) з *C. albicans* (колонії справа). А – реакція типу А з *F. betulina* 2786 на КДА; Б – реакція C_{A1} з боку *F. betulina* 311 на КДА; В – реакція C_{A2} з боку *F. betulina* 327 на КДА; Г – реакція C_{A2} з боку *F. betulina* 2786 на СДА

Не лише березова губка, а й інші макроміцети мають здатність частково чи повністю пригнічувати ріст *C. albicans*. Таку властивість відносно окремих патогенних штамів мали наступні види: *Auriporia aurea*, *Coprinus comatus*, *Cordyceps militaris*, *Crinipellis schevczenkoi*, *Cyclocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma applanatum*, *G. lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Hypsizygus marmoreus*, *Inonotus obliquus*, *Irpiciporus litschaueri* (Lohwag) Zmitr., *Laetiporus sulphureus*, *Lentinula edodes*, *Lyophyllum shimeji*, *Ophiocordyceps sinensis*, *Oxyporus obducens*, *Phellinus igniarius*, *Pleurotus djamor*, *P. eryngii* [49], *P. ostreatus* [49,91], *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor* [49], *X. polymorpha* та *X. longipes* [131].

При сумісному культивуванні мікроміцета *P. kudriavzevii* 301 зі штамми *F. betulina* на КДА більшість (72,8 %) культур березової губки повністю наростали на колонії патогена, тоді як часткове наростання і тупикові колонії спостерігалися рідше (рис. 4.11). Як у і випадку з *C. albicans*, середовище СДА підвищувало рівень АА штамів *F. betulina* відносно *P. kudriavzevii*. Практично усі штами повністю інгібували ріст патогена (окрім *F. betulina* 311). Що стосується штаму *F. betulina* 327, то його тип взаємодії із *P. kudriavzevii* 301 теж відрізняється з часом. Так, якщо при проведенні експерименту ця культура лише частково пригнічувала ріст мікроміцета (C_{A1}), то в попередній роботі [49] *F. betulina* 327 пригнічував *P. kudriavzevii* 301 повністю (C_{A2}).

Схильність до часткового чи повного пригнічення росту *P. kudriavzevii* є спільною для багатьох видів макроміцетів: *A. aurea*, *Coprinus comatus*, *Cordyceps militaris*, *Crinipellis schevczenkoi*, *Cyclocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma applanatum*, *G. lucidum*, *H. marmoreus*, *Inonotus obliquus*, *Irpiciporus litschaueri*, *Laetiporus sulphureus*, *Lentinula edodes*, *Lyophyllum shimeji*, *Ophiocordyceps sinensis*, *Oxyporus obducens*, *Pleurotus eryngii* [49], *P. ostreatus* [49,91], *S. commune* та *T. versicolor* [49].

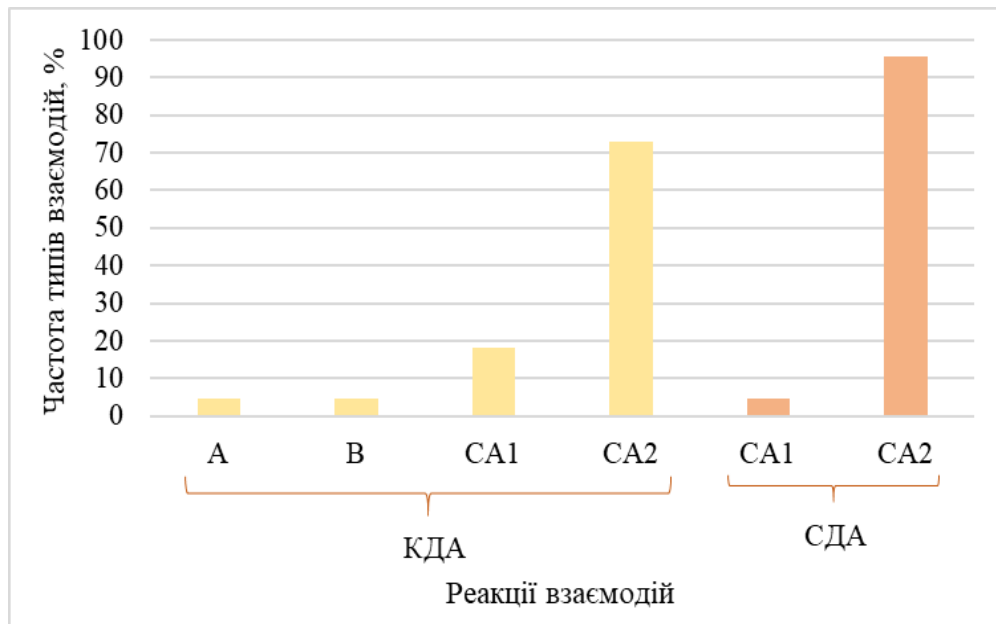


Рис. 4.11. Частота взаємодій у подвійній культурі між колоніями досліджених штамів *F. betulina* і *P. kudriavzevii*

Примітка: А – двостороннє гальмування росту колоній при контакті; В – двостороннє гальмування росту колоній на відстані; С_{А1} – часткове наростання колонії *F. betulina* на *P. kudriavzevii* після взаємного гальмування росту при контакті; С_{А2} – повне наростання колонії *F. betulina* на *P. kudriavzevii* після взаємного гальмування росту при контакті; КДА – картопляно-декстрозний агар; СДА – Сабуро-декстрозний агар

Досліджений штам *F. betulina* 311 на обох поживних середовищах проявляв антагоністичні реакції, відмінні від інших протестованих культур. На СДА його міцелій лише частково наростав на колонію *P. kudriavzevii*, а на КДА обидві колонії гальмували ріст одна одної на дистанції. Саме при взаємодії з цим штамом березової губки дріжджоподібний мікроміцет проявив здатність до поліморфізму, формуючи псевдоміцелій (рис. 4.12 А).

Гіфи *F. betulina* 311 навпроти колонії-антагоніста також мали видозмінену морфологію. На додачу, при реакції А зі штамом *F. betulina* 2776 (рис. 4.12 Б) теж спостерігався як і поліморфізм *P. kudriavzevii*, так і зміни міцелію березової губки на контакті (формувалися точкові скупчення). У більшості (68,2 %) випадків при взаємодії грибів-антагоністів спостерігалися також і дифузні зміни в агарі навколо колоній *P. kudriavzevii* (рис. 4.12 В, Г).

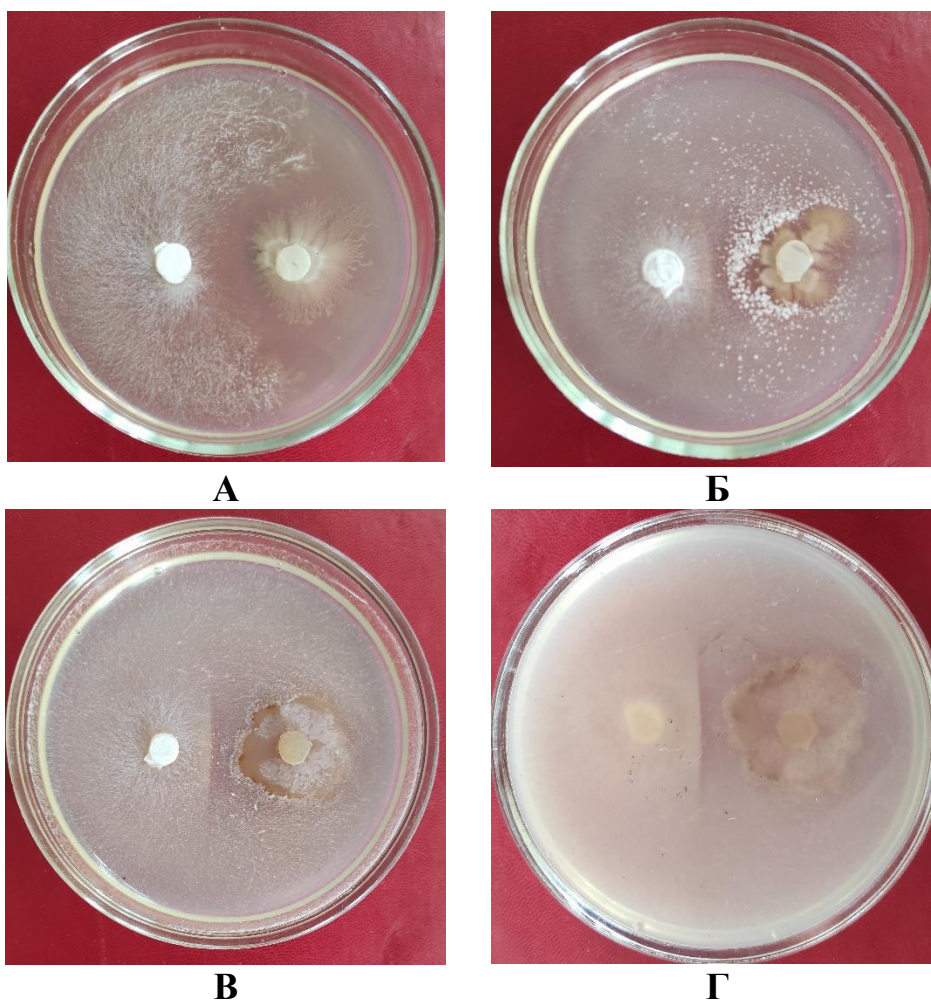


Рис. 4.12. Антагоністична взаємодія штамів *F. betulina* (на чашках зліва) з *P. kudriavzevii* (колонії справа). **А** – реакція типу В з *F. betulina* 311 на КДА; **Б** – реакція А з *F. betulina* 2776 на КДА; **В** – реакція C_{A1} з боку *F. betulina* 327 на КДА; **Г** – реакція C_{A1} з боку *F. betulina* 327 на КДА (реверзум) з вираженими дифузними змінами в агарі навколо *P. kudriavzevii* та між колоніями грибів-антагоністів

Таким чином, при з'ясуванні антагоністичних взаємодій між штамми патогенів *Candida albicans* та *Pichia kudriavzevii* виявлено домінування наростання колоній *F. betulina* на тест-представниках *Saccharomycetales*, що свідчить про виражену антагоністичну активність штамів *F. betulina* та їх потенційну здатність пригнічувати розвиток умовно-патогенних дріжджових мікроорганізмів. Також встановлено, що склад поживного середовища може істотно впливати на рівень антагоністичної активності досліджених грибів, що необхідно враховувати при оцінці їх потенціалу як біоконтролю.

4.6 Антагоністична активність *Fomitopsis betulina* відносно макроміцетів

Антагоністичні взаємодії між організмами важливо вивчати не лише з метою пошуку таргетних видів, які здатні боротися з мікроміцетами, але також і для визначення конкурентних взаємодій між грибами в екологічних нішах. Ця інформація може знадобитися як для фундаментальних досліджень у галузях біології, екології, географії тощо, так і для прикладної мети – біоконтролю шкочинних макроскопічних грибів. Конкурентні взаємодії можуть відбуватися між ксилотрофними базидіоміцетами локально у деревині, при цьому взаємодії здійснюються і на відстані, і після фізичного контакту міцелію, а також через мікопаразитизм. В результаті антагоністичних процесів один вид може витіснити інший, або ж грибниці різних видів вступають у тупикову взаємодію і не рухаються далі. При цьому, якщо розглядати саме дереворуйнівні трутовики білої та бурої гнилі, які розкладають різні види полімерних сполук, то під час процесу паразитування гриби в попередній екологічній ніші – цілісній деревині – генерують матеріал, більш сприйнятливий для макроміцетів іншого типу гнилі, тим самим створюючи нову екологічну нішу [151].

Конкуренцію між дереворуйнівними макроміцетами можна моделювати також *in vitro* з метою отримання спостережень за взаємодіями міцелію, а також для потенційного виділення антимікотичних сполук. Відповідно, досліджено АА штамів *F. betulina* із культурами макроміцетів *Heterobasidion annosum* 361 й *Inonotus obliquus* 1877 з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України (ІБК) [70].

Inonotus obliquus, відомий як гриб чага, здебільшого паразитує на видах беріз, як і досліджена березова губка *F. betulina*, і значно рідше заражає інші види дерев. У зв'язку з цим доцільно оцінити їхній конкурентний потенціал і спрогнозувати, як ці два види грибів можуть себе поводити локально, і наскільки ці патогенні для дерев організми можуть витіснити одне одного.

Встановлено, що усі 22 штами *F. betulina* були здатні до часткового (40,9 %) чи повного (59,1 %) наростання на колонії *I. obliquus* (рис. 4.13).

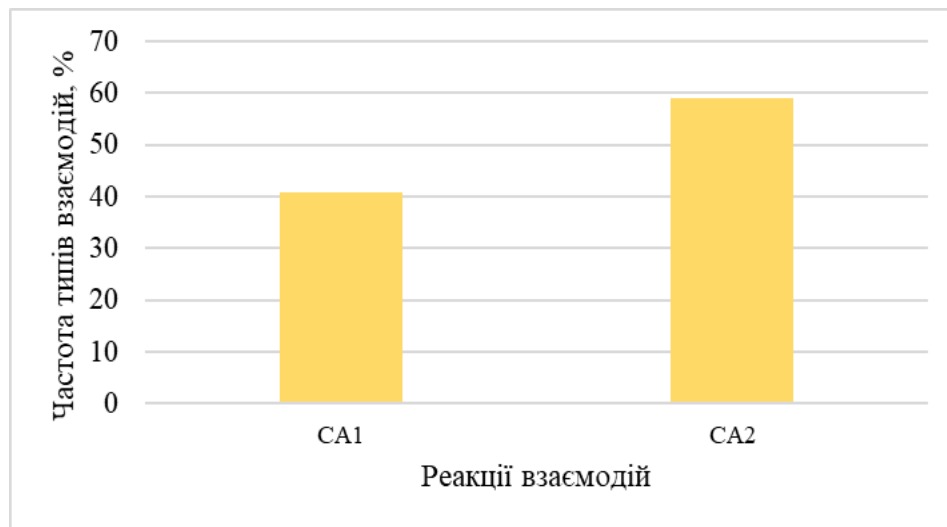


Рис. 4.13. Частота взаємодій у подвійній культурі між колоніями досліджених штамів *F. betulina* і *I. obliquus*

Примітка: CA₁ – часткове наростання колонії *F. betulina* на *I. obliquus* після взаємного гальмування росту при контакті; CA₂ – повне наростання колонії *F. betulina* на *I. obliquus* після взаємного гальмування росту при контакті

Це може пояснюватися як різною швидкістю росту грибів, відмінною здатністю до конверсії компонентів використаного середовища КДА, а також взаємодіями між гіфами культур. Причому переважало саме повне пригнічення колоній чаги (у 59,1 % випадків).

Отримані дані корелюють з результатами іншого дослідження по спільному культивуванню паразитів березових дерев, де міцелій *F. betulina* також мав високий вплив на колонії *I. obliquus* за вимірюванням індивідуального біотичного ефекту (individual biotic effect), який залежить від конкурентних взаємодій грибів [51]. Чага також проявляла антагоністичну активність різного рівня відносно інших базидіоміцетів, яку можна визначити не лише культивуванням на поживних середовищах. У роботі [152] по визначенню захисних властивостей *I. obliquus* відносно інших грибів проводили сумісну інокуляцію соснових та березових деревних брусків *in vitro* міцелієм чаги разом з кількома іншими ксилотрофами. Присутність посівного матеріалу

чаги сприяла розкладанню деревини макроміцетами білої гнилі *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst., *Hericium ramosum* (Bull.) Letell., *Trametes versicolor* та макроміцетом бурої гнилі *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murr. Ймовірно, конверсія деревини міцелієм *I. obliquus* підвищувала біодоступність поживних компонентів, що, своєю чергою, забезпечувало умови для одночасного розвитку інших трутовиків.

Чага також інгібується цими та схожими видами в природі, що з'ясовано після інокуляції живих дерев та відмерлих колод у лісовій ділянці [51]. Через 3 роки після початку експерименту у деревині не знайдено міцелію *I. obliquus*, а на колодах виявлено плодові тіла *B. adusta*, *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. та *T. versicolor*. Однак, *I. obliquus* проявив здатність до конкуренції з грибами бурої гнилі *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns та *Rhodonina placenta* (Fr.) Niemelä, K.H. Larss. & Schigel, перешкоджаючи їм розкласти бруски деревини [152].

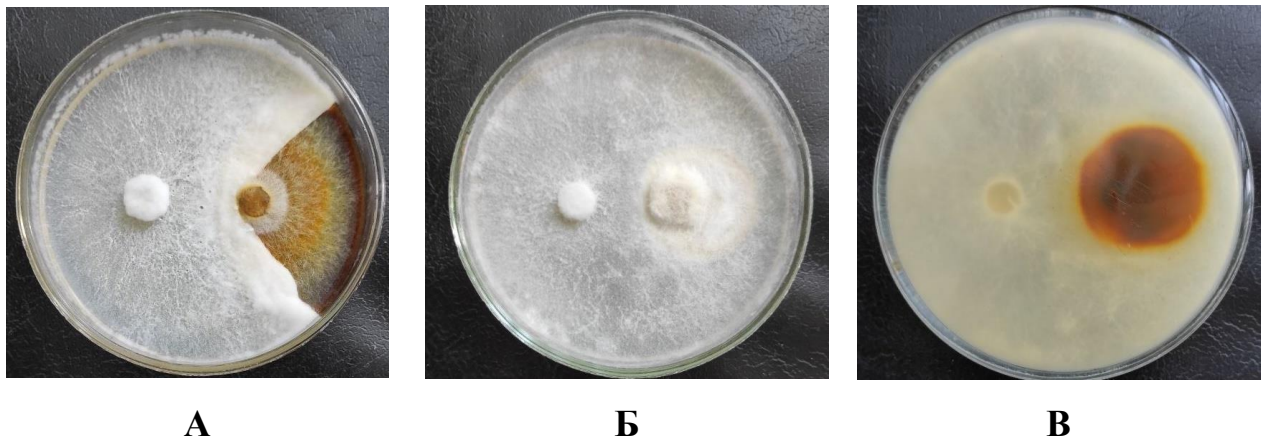


Рис. 4.14. Антагоністична взаємодія штамів *F. betulina* (на чашках зліва) з *I. obliquus* (колонії справа). **А** – реакція C_{A1} з боку *F. betulina* 2778; **Б** – реакція C_{A2} з боку *F. betulina* 2363; **В** – реакція C_{A2} з боку *F. betulina* 2363, реверзум, у місці колонії *I. obliquus* спостерігається пігментація

Колонії березової губки здебільшого мали повстятий характер, однак зі сплутаними густими гіфами і схильністю до формування ватних скупчень та міцеліальних тяжів (вираженість морфології відрізнялася залежно від штаму).

Наростаючи на колонії чаги, міцелій ставав більш пухнастий та щільний (рис. 4.14 А, Б). В свою чергу, колонії *I. obliquus* мали характерне для свого виду забарвлення, а також формували концентричні кола (рис. 4.14 А). Враховуючи природне виділення пігментів, спостерігалось забарвлення агару на реверзумі у відповідних місцях (рис. 4.14 В).

До патогенних базидіоміцетів належить і коренева губка (*Heterobasidion annosum*) – факультативний паразит, який є одним із найбільш небезпечних збудників хвороб у соснових деревах [153]. Хоча *F. betulina* здатний до конверсії лише березової деревини і, відповідно, не може конкурувати з *H. annosum* у місці його паразитування, однак дослідження взаємодії даних грибів *in vitro* може сприяти пошуку способів біологічного захисту соснових насаджень. У зв'язку з цим, вивчено здатність до пригнічення росту даного патогену культурами березової губки *F. betulina*.

При дослідженні АА штамів *F. betulina* відносно *H. annosum* IBK 361 встановлено, що 90,9 % культур березової губки мали двосторонній антагонізм із патогеном (по типу А) (рис. 4.15). Два штами березової губки (311 і 2785) не проявили вираженої АА відносно *H. annosum*, колонії якого частково наростали на *F. betulina* (по підтипу С_{А1}).



Рис. 4.15. Частота взаємодій у подвійній культурі між колоніями досліджених штамів *F. betulina* і *H. annosum*

Примітка: А – двостороннє гальмування росту колоній при контакті; С_{А1}* – часткове наростання колонії *H. annosum* на *F. betulina* після взаємного гальмування росту при контакті

Оскільки більшість штамів *F. betulina* проявили однаковий тип реакції відносно *H. annosum*, для порівняння їхньої дії розраховали відсотки інгібування росту колоній кореневої губки (рис. 4.16), які варіювали у межах від $41,1 \pm 0,6$ % до $58,9 \pm 0,0$ %. Найвищий ступінь пригнічення росту *H. annosum* проявив штам *F. betulina* 2777. Доволі активними штамми, з відсотками інгібування росту >50 %, були також *F. betulina* 978, 2269, 2770, 2775 і 2776. Також встановлено штами *F. betulina* 2290 і 2772, які мали однакову АА із *H. annosum* на рівні 50 %.

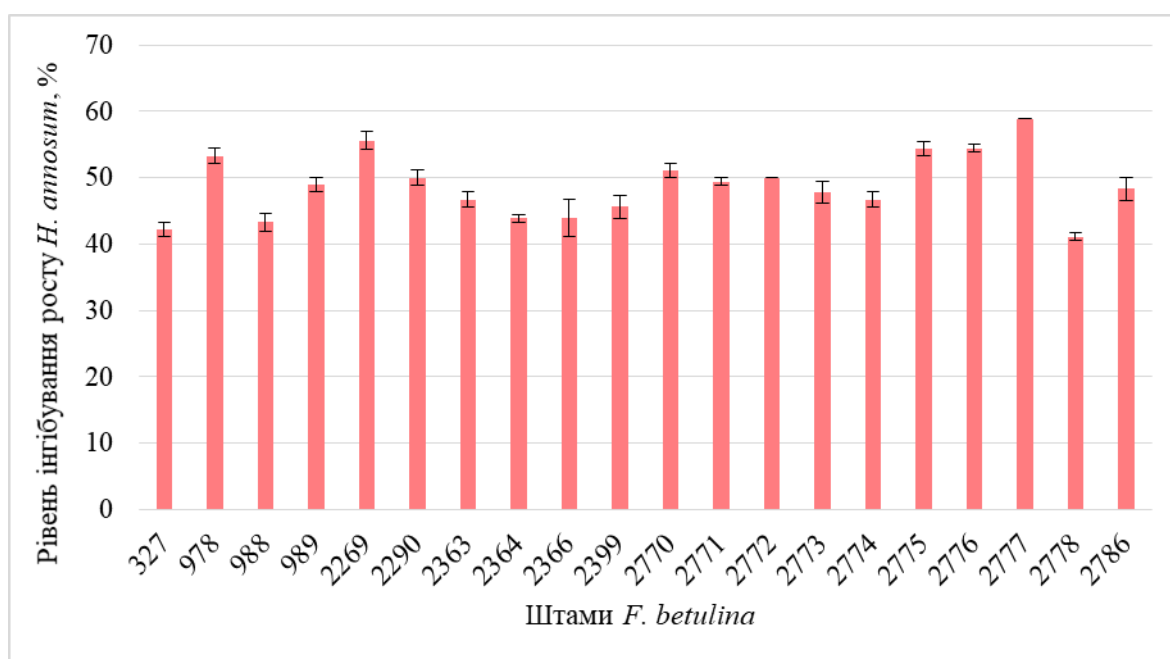


Рис. 4.16. Відсотки інгібування росту *H. annosum* міцелієм штамів *F. betulina*, які взаємодіяли з *H. annosum* по типу реакції А (двостороннє гальмування росту колоній при контакті)

Інші макроміцети також мали здатність до інгібування росту *H. annosum*. Подібно до більшості (54,5 %) досліджених культур *F. betulina*, які пригнічували ріст кореневої губки у діапазоні 41,1–49,4 %, деякі штами шапинкових грибів проявляли активність на рівні 25–49 %, наприклад: *Amanita citrina* Pers., *A. muscaria* (L.) Lam., *Cenococcum* sp. Moug. & Fr., *Hygrophoropsis aurantiaca* (Wulfen) Maire, *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke, *Paxillus involutus*

(Batsch) Fr., *Phallus impudicus* L., *Suillus bovinus* (L.) Roussel, *S. luteus* (L.) Roussel, *S. variegatus* (Sw.) Kuntze, *Xerocomus badius* (Fr.) E.-J. Gilbert, *X. subtomentosus* (L.) Quél. Також встановлено штами макроміцетів із здатністю до інгібування на рівні 50–74 % (подібно до досліджених штамів *F. betulina* з активністю 50,0–58,9 %): *H. aurantiaca*, *P. impudicus*, *X. subtomentosus* [154].

Однак, відомо, що такий базидіоміцет, як *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr. був здатний до повного інгібування росту *H. annosum* у подвійній культурі [155]. До часткового пригнічення росту кореневої губки шляхом наростання на її колонію були здатні гриби *Cyathus olla* (Batsch) Pers., *Phallus hadriani* Vent.; повного наростання – *C. striatus* (Huds.) Willd.; до утворення зон інгібування між колоніями – *Calvatia candida* (Rostk.) Hollós, *Crucibulum crucibuliforme* (Scop.) V.S. White, *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. та *Vascellum pratense* (Pers.) Kreisel [156].

Спостерігаючи за змінами морфології при сумісному культивуванні, встановлено низьку схильність до мінливості росту *H. annosum*, колонії якого у переважній більшості випадків (95,5 %) формували повстятий міцелій середньої щільності. У зоні контакту з колоніями березової губки *H. annosum* формував міцеліальний валик товщиною 3–7 мм (рис. 4.17 А), і в цьому місці на реверзумі помічалася виділення пігменту в агар (рис. 4.17 Б).

Однак, культури *F. betulina* мали штамоспецифічний характер росту і розвитку. У дуальній культурі на КДА спостерігалися колонії з низькою щільністю, які мали здебільшого борошнисто-повстятий характер (40,9 % культур), рідше – повстяні з ватними включеннями (36,4 %), а також з поєднанням повстяного, ватного та борошнистого міцелію (13,6 %). Зрідка (22,7 %) міцелій *F. betulina* був слабо пігментований. У 59,1 % випадків у колоній березової губки спостерігалася незначне ущільнення міцелію вздовж лінії контакту з кореневою губкою, однак штами *F. betulina* 2364, 2785 і 2786 навпаки мали розріджений міцелій поруч з колоніями *H. annosum*.



А

Б

Рис. 4.17. Подвійна культура *F. betulina* 2269 (з лівого боку чашок) та *H. annosum* (з правого боку чашок) з типом взаємодії А. А – лицева сторона з ущільненням міцелію в зоні контакту; Б – реверзум з пігментацією в ділянці контакту

Вирізняється штам *F. betulina* 2399, який мав напівпрозору борошнисту колонію з формуванням виражених міцеліальних тяжів (рис. 4.18 А). Слабку тенденцію до формування тяжів з міцелію проявляв і штам *F. betulina* 2772. Також у культури *F. betulina* 2366 спостерігалася схильність до формування примордіїв біля стінки чашки (рис. 4.18 Б).

Варто відмітити видозміни у морфології росту *H. annosum* при спільному культивуванні з *F. betulina* 2785 (рис. 4.18 В). У кореневої губки замість звичайного повстяного міцелію виросла пухнаста і значно щільніша колонія, а міцеліальний валик у зоні контакту теж сформувався відносно грубший (9–15 мм). По периметру чашки колонія *H. annosum* ущільнюється і пігментується. У той же час, *F. betulina* 2785 формувал повстяно-ватну колонію (більш густу, порівняно з рештою штамів). Привертає увагу те, що пігментація на реверзумі чашки спостерігалася не лише у зоні формування валика, але й по площі колонії березової губки, яка на лицьовій стороні має повністю білий міцелій (рис. 4.18 Г).

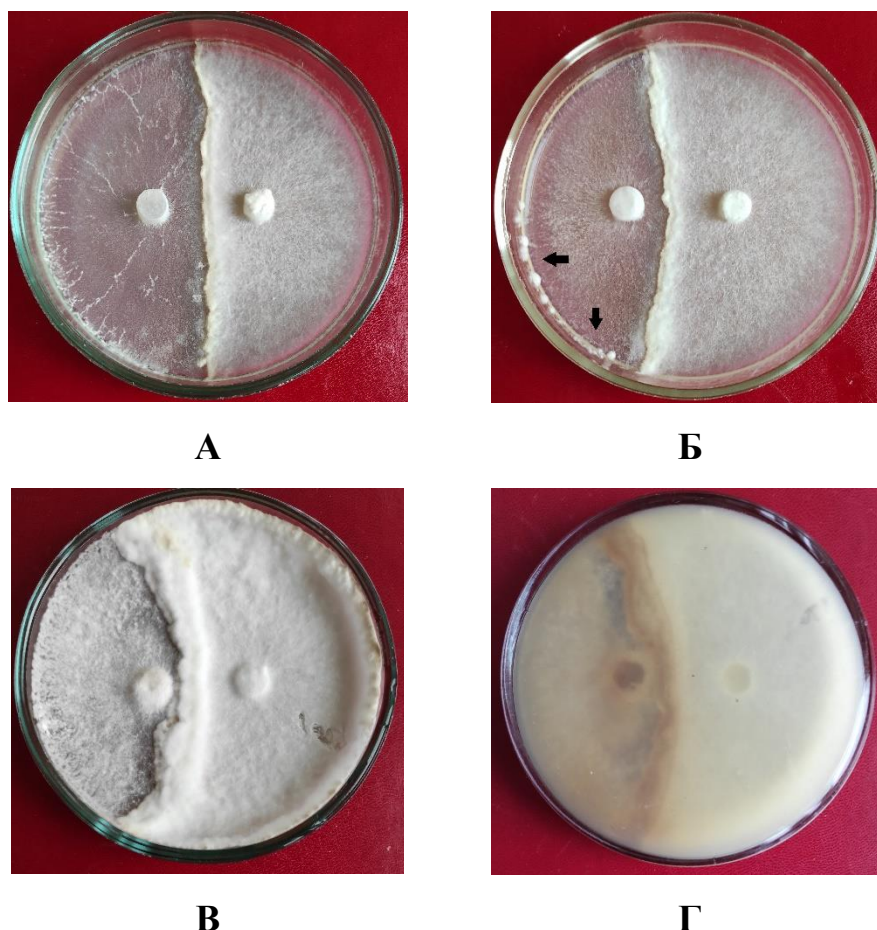


Рис. 4.18. Подвійні культури *F. betulina* та *H. annosum*, взаємодії по типу А (А і Б) і підтипу С_{А1}. А – штам *F. betulina* 2399 (зліва) з міцеліальними тяжами; Б – штам *F. betulina* 2366 (зліва) з примордіями (вказані стрілками); В – повстяно-ватна колонія *F. betulina* 2785 (зліва) і пухнаста колонія *H. annosum* (справа) з грубим валиком у зоні контакту; Г – реверзум культури *F. betulina* 2785 (зліва), яка виділяє пігмент в агар, і *H. annosum* (справа)

Незважаючи на підтип взаємодії С_{А1}, при спільному рості *F. betulina* 311 та *H. annosum* морфологічні зміни обох культур не були виражені. Обидва гриба сформували звичайні характерні для цих штамів повстяні колонії (у *F. betulina* 311 колонія була низької щільності і напівпрозора). У зоні контакту спостерігався стандартний валик з міцелію *H. annosum* (4–6 мм).

Таким чином, усі 22 досліджені штами *Fomitopsis betulina* проявили здатність до часткового або повного пригнічення росту колоній *Inonotus obliquus*, що, ймовірно, зумовлено конкурентною взаємодією за спільний

субстрат – деревину берези. Це свідчить про потенціал *F. betulina* як біоантагоніста, зокрема у контексті конкурентного витіснення *I. obliquus* у природних або штучних фітоценозах. Аналіз реакцій взаємодії між культурами *Fomitopsis betulina* та *Heterobasidion annosum* засвідчив наявність штамоспецифічності у прояві антагоністичної активності. Враховуючи, що на сьогодні для практичного біоконтролю кореневої губки соснових використовується лише гриб *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jül, пошук альтернативних ефективних антагоністів залишається актуальним завданням. Серед досліджених штамів *F. betulina* виявлено перспективні культури, зокрема штами 978, 2269, 2770, 2290, 2772, 2775, 2776 і 2777, які інгібували ріст міцелію *H. annosum* на рівні ≥ 50 %, що свідчить про їхній потенціал у якості біоконтролю.

4.7 Оцінка загальної антагоністичної активності *F. betulina*

Сумісне культивування організмів вважається цінним інструментом для попереднього скринінгу грибів з метою потенційного біоконтролю і біотехнологічним потенціалом, а також для моделювання екологічних взаємодій у біоценозах.

При аналізі розподілу реакцій взаємодій між усіма дослідженими культурами грибів виявлено, що при сумісному культивуванні найчастіше зустрічалися типи та підтипи реакцій A, C_{A1} та C_{A2} (рис. 4.19). Тип A свідчить про відсутність видимої взаємодії між культурами, тобто толерантність або нейтральне співіснування, тоді як реакції C_{A1} та C_{A2} характеризуються частковим або повним наростанням одного гриба на колонію іншого, що вказує на прояв конкурентної переваги та антагоністичної активності окремих штамів.

Зазначимо, що реакції взаємодій у подвійній культурі дають змогу оцінити ступінь пригнічення росту патогенів, виявити тип міжвидових відносин (антагонізм, толерантність або домінування), а також встановити наявність біоактивних метаболітів, що продукуються досліджуваними штамми. Проте цей метод має переважно описовий характер і не передбачає кількісної оцінки

антагоністичної дії, що обмежує можливість точного порівняння ефективності різних ізолятів. Тому з метою оцінки потенційної антимікотичної активності 22 культур *F. betulina* проведено розрахунок антагоністичного індексу (АІ) відповідно до шкали, запропонованої Бадалян та співавторами [78,79].

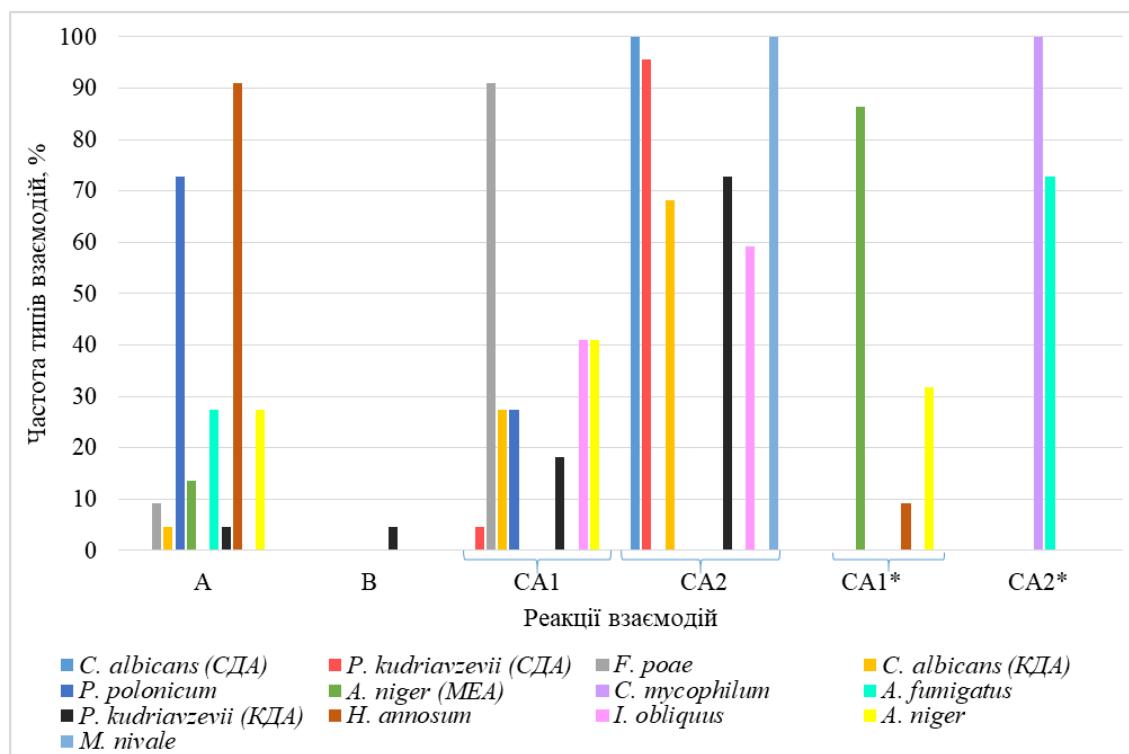


Рис. 4.19. Розподіл частоти взаємодій у подвійній культурі між колоніями досліджених штамів *F. betulina* і грибів-антагоністів

Примітка: А – двостороннє гальмування росту колоній при контакті; В – двостороннє гальмування росту колоній на дистанції; CA₁ – часткове наростання колонії *F. betulina* на патоген після взаємного гальмування росту при контакті; CA₂ – повне наростання колонії *F. betulina* на патоген після взаємного гальмування росту при контакті; CA₁* – часткове наростання патогена на колонію *F. betulina* після взаємного гальмування росту при контакті; CA₂* – повне наростання патогена на колонію *F. betulina* після взаємного гальмування росту при контакті. При наявності варіабельності взаємодій між культурами вказано максимальне значення антагоністичної активності *F. betulina*

Штами *F. betulina* мали значні показники АІ: від 28,0 до 37,5 (табл. 4.1). Найкращу антагоністичну активність з максимальним АІ на рівні 37,5 встановлено для штаму *F. betulina* 2771, високий рівень АА (АІ >35,0) проявили також *F. betulina* 978, 989, 2364, 2770 та 2772, що підкреслює їхній потенціал до прояву антимікотичної активності широкого спектру дії.

Таблиця 4.1

**Реакції взаємодії штамів *F. betulina* із дослідженими видами грибів
та їхній антагоністичний індекс (AI)**

Штами <i>F. betulina</i>	<i>C. musophilum</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>P. polonicum</i>	<i>A. niger</i> (КДА)	<i>A. niger</i> (МЕА)	<i>M. nivale</i>	<i>F. poae</i>	<i>C. albicans</i> (КДА)	<i>C. albicans</i> (СДА)	<i>P. kudriavzevii</i> (КЛА)	<i>P. kudriavzevii</i> (СЛА)	<i>I. obliquus</i>	<i>H. annosum</i>	AI
311	CA ₂ *	CA ₂ *	A	CA ₁	A	CA ₂	A	CA ₁	CA ₂	B	CA ₁	CA ₁	CA ₁ *	28,0
327	CA ₂ *	A	A	A	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₁	A	32,5
978	CA ₂ *	A	A	CA ₁	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	A	37,0
988	CA ₂ *	CA ₂ *	A	CA ₁ *	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	A	32,5
989	CA ₂ *	CA ₂ *	A	CA ₁	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	A	36,0
2269	CA ₂ *	CA ₂ *	A	A	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₁	A	32,5
2290	CA ₂ *	CA ₂ *	A	CA ₁ *	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	A	32,5
2363	CA ₂ *	CA ₂ *	A	A	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	A	33,5
2364	CA ₂ *	CA ₂ *	CA ₁	A	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	A	36,0
2366	CA ₂ *	CA ₂ *	A	CA ₁ *	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₁	A	31,5
2399	CA ₂ *	A	CA ₁	CA ₁ *	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₁	A	35,0
2770	CA ₂ *	CA ₂ *	CA ₁	CA ₁	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₁	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	A	36,5
2771	CA ₂ *	CA ₂ *	CA ₁	CA ₁	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	A	37,5
2772	CA ₂ *	CA ₂ *	A	CA ₁	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	A	36,0
2773	CA ₂ *	CA ₂ *	A	CA ₁ *	A	CA ₂	CA ₁	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₁	A	31,5
2774	CA ₂ *	A	A	A	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	A	33,5
2775	CA ₂ *	CA ₂ *	A	CA ₁	CA ₁ *	CA ₂	A	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	A	32,5
2776	CA ₂ *	CA ₂ *	CA ₁	CA ₁	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	A	CA ₂	CA ₂	A	35,0
2777	CA ₂ *	A	CA ₁	CA ₁ *	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₁	A	34,0
2778	CA ₂ *	CA ₂ *	A	CA ₁	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₁	A	35,0
2785	CA ₂ *	A	A	CA ₁ *	CA ₁ *	CA ₂	CA ₁	CA ₁	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₁	CA ₁ *	30,5
2786	CA ₂ *	CA ₂ *	A	A	A	CA ₂	CA ₁	A	CA ₂	CA ₂	CA ₂	CA ₂	A	31,0

Примітка: AI – антагоністичний індекс; A – двостороннє гальмування росту колоній при контакті; B – двостороннє гальмування росту колоній на дистанції; CA₁ – часткове наростання колонії *F. betulina* на патоген після взаємного гальмування росту при контакті; CA₂ – повне наростання колонії *F. betulina* на патоген після взаємного гальмування росту при контакті; CA₁* – часткове наростання патогена на колонію *F. betulina* після взаємного гальмування росту при контакті; CA₂* – повне наростання патогена на колонію *F. betulina* після взаємного гальмування росту при контакті. При наявності варіабельності взаємодій між культурами вказано максимальне значення антагоністичної активності *F. betulina*

Зазначимо, що AI є відносним показником, який розраховується залежно від кількості патогенів. Однак він дозволяє кількісно порівняти AA усіх досліджених культур. У проведеному дослідженні діапазон AI 22 культур

проявляв певну штамоспецифічність, однак був вужчим (різниця між крайніми значеннями у межах 9,5 балів), ніж у роботі Круподьорової [157], де AI варіював у діапазоні від 5,0 до 31,5 для 30 видів макроміцетів, тобто коливання у межах 26,5 балів. Такий розбіг може бути пояснений різною активністю досліджених аскомікотових та базидієвих видів грибів, тоді як у проведених розрахунках фігурували лише штами березової губки. У зазначеному дослідженні культура *F. betulina* IBK 327 проявляла AA різного ступеня проти 87,5 % патогенів, що близько до отриманих результатів, де *F. betulina* 327 був активним у 84,6 % взаємодій.

Таким чином, проведено оцінку загальної антагоністичної активності досліджених штамів *F. betulina* по відношенню до широкого спектра грибів, які можна умовно поділити на групи: плісняві гриби (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium polonicum*), фітопатогенні гриби (*Fusarium poae*, *Microdochium nivale*), дереворуйнівні базидіоміцети (*Heterobasidion annosum*, *Inonotus obliquus*) та дріжджоподібні гриби (*Pichia kudriavzevii*, *Candida albicans*). Загалом 22 штами березової губки проявляли антагоністичну дію проти більшості грибів (69,2–84,6 %). На основі результатів реакцій у подвійній культурі розраховано високі значення антагоністичного індексу (AI) для досліджених культур, які коливалися в межах від 28,0 до 37,5, що говорить про їхню виражену антагоністичну активність. Отримані результати свідчать про доцільність подальшого вивчення найактивніших штамів *F. betulina* як перспективних агентів біологічного контролю у захисті рослин та біотехнологічних застосуваннях.

Висновки до розділу 4. Пошук ефективних засобів протидії шкочинним і патогенним мікроскопічним грибам залишається актуальним напрямом сучасних мікологічних досліджень. З огляду на це, проведено оцінку антагоністичної активності 22 штамів *Fomitopsis betulina* щодо широкого спектра фітопатогенних та умовно-патогенних грибів, зокрема *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* IFBG 134, *Candida albicans* 319, *Cladobotryum mycophilum*,

Fusarium poae, *Microdochium nivale*, *Penicillium polonicum* IFBG 138, *Pichia kudriavzevii* 301, та макроміцетів: *Inonotus obliquus* IBK 1877 і *Heterobasidion annosum* IBK 361.

Встановлено, що штами *F. betulina* були неактивними лише проти *C. mycophillum*, який швидко наростав повністю на колонії всіх штамів березової губки. Антагоністична активність штамів *F. betulina* щодо тест-грибів зростала у послідовності: *A. fumigatus* < *H. annosum* < *P. polonicum* < *A. niger* < *F. poae* < *I. obliquus* ≤ *P. kudriavzevii* ≤ *C. albicans* < *M. nivale*. Вперше у подвійній культурі досліджено антагоністичну активність *F. betulina* відносно *A. fumigatus*, *C. mycophillum*, *F. poae*, *H. annosum*, *M. nivale*. Найкращу антагоністичну активність з максимальним АІ на рівні 37,5 встановлено для штаму *F. betulina* 2771, високий рівень АА проявили також *F. betulina* 978, 989, 2364, 2770, та 2772.

В окремих випадках спостерігалися варіації даних типів та підтипів антагонізму, що залежало від штам- та видоспецифічності досліджених культур та використаного поживного середовища. Варто відзначити, що характер антагоністичних взаємодій виявляв варіабельність залежно від тривалості експерименту, що підкреслює доцільність проведення довготривалих спостережень у процесі культивування для отримання об'єктивних та репрезентативних результатів.

Основні результати експериментальних досліджень даного розділу апробовано в публікаціях:

Зайченко ТО. Антагоністична активність окремих макроміцетів відносно деяких фітопатогенних грибів у дуальній культурі. В: Біологія рослин та біотехнології: збірка тез V конференції молодих учених; 2025 Трав 15-16; Київ. К.: ДУ «ІХБГ НАНУ», 2025. с. 60.

Кізіцька ТО, Круподьорова ТА. Антагоністична активність штамів *Fomitopsis betulina* відносно рослинних патогенів *Microdochium nivale* та

Fusarium poae. В: Біологія рослин та біотехнології: збірка тез IV конференції молодих учених; 2024 Трав 16-18; Київ. Київ: ДУ «ІХБГ НАНУ»; 2024. с. 59.

Кізіцька ТО, Круподьорова ТА, Барштейн ВЮ, Ратушняк ВВ. Антагоністична активність штамів *Fomitopsis betulina* відносно *Penicillium polonicum*. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Хохленкова НВ, Калюжная ОС, Двінських НВ, редактори. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали III міжнародної наук.-практ. інтернет-конф.; 2023 Берез 24; Харків. Х.: НФаУ, 2023. с. 200-2.

Кізіцька ТО, Круподьорова ТА, Барштейн ВЮ, Сабибін ОВ. Антагоністична активність штамів *Fomitopsis betulina* відносно *Cladobotrium tuscophilum* та *Aspergillus fumigatus*. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Хохленкова НВ, Калюжная ОС, Двінських НВ, редактори. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали II міжнародної наук.-практ. інтернет-конф.; 2022 Трав 20; Харків. Х.: НФаУ, 2022. с. 127-8.

РОЗДІЛ 5

БІОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *FOMOTOPSIS BETULINA*

Гриби потенційно можуть розглядатися як природні аналоги для синтетичних лікарських засобів завдяки здатності синтезувати широкий спектр біологічно активних сполук із терапевтичною активністю. Антимікробна, протипухлинна, протизапальна, антиоксидантна та інші лікувальні властивості макроміцетів, зокрема і березової губки, активно досліджуються й широко висвітлюються в сучасній науковій літературі. Базидієвий гриб *Fomitopsis betulina* привертає увагу дослідників завдяки багатому вмісту біологічно активних сполук, таких як феноли, полісахариди та терпени, які можуть впливати на окислювальний стрес та пригнічувати ріст мікроорганізмів [1-3]. Ідентифікація, виділення та очищення БАР з цього гриба також становлять важливий напрям сучасних наукових досліджень, спрямованих на вивчення його біосинтетичного потенціалу та механізмів дії [1-3,8,35,158,159].

Антибактеріальну (АБА), антиоксидантну (АОА) дію та наявність фенольних сполук у *F. betulina* визначали в численних працях [1-3,5,8,9,12-15, 35-38,41,42,45-48,53,159]. Більшість досліджень цього поліпорового гриба зосереджені на його дикорослих плодових тілах [8,9,36-38,41,45-47,53]. Наразі існує обмежена кількість даних щодо штучного культивування цього гриба *in vitro*, причому переважним методом є глибинне динамічне культивування в рідкому поживному середовищі [5,8,48]. На відміну від цього, у нашому дослідженні застосовано глибинне культивування за статичних умов.

Не лише різні види грибів, а й штами одного виду можуть давати істотно різні результати в дослідженнях. Штамоспецифічні особливості по АБА, АОА та рівню фенолів встановлено зокрема у видів *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola* [47], *Hericium coralloides*, *H. erinaceus* [160], *Laetiporus sulphureus* [161], *Pleurotus ostreatus* [91], *Xylaria polymorpha*, *X. longipes* [162], а також і в самого *F. betulina* [42,47,48]. Тому скринінг культур грибів є початковим етапом

досліджень, спрямованим на відбір перспективних штамів-продуцентів із вираженою біологічною активністю.

5.1 Антибактеріальна активність

Усі досліджені штами *F. betulina* (100 %) продемонстрували наявність АБА в екстрактах міцеліальної маси (ММ) та/або культуральної рідини (КР) (табл. 5.1). Зони затримки росту бактерій варіювали від $8,0 \pm 0,0$ мм до $22,5 \pm 0,5$ мм у діаметрі.

Таблиця 5.1

Рівень антибактеріальної активності етилацетатних екстрактів культуральної рідини та міцеліальної маси штамів *F. betulina*

Штам	Діаметр зон інгібування росту бактерій етилацетатними екстрактами культуральної рідини, мм				
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
311	$10,0 \pm 0,0^c$	$16,5 \pm 0,5^{ab}$	$14,5 \pm 0,5^b$	$14,5 \pm 0,5^c$	$14,5 \pm 0,5^d$
327	—	$14,0 \pm 0,0^d$	—	$13,0 \pm 0,0^c$	—
978	$12,0 \pm 1,0^a$	$15,5 \pm 0,5^{bc}$	$16,0 \pm 1,0^a$	$18,0 \pm 1,0^b$	$17,5 \pm 0,5^c$
988	—	$10,0 \pm 0,0^h$	—	—	$18,0 \pm 0,0^c$
989	—	$10,0 \pm 0,0^h$	—	—	$10,0 \pm 0,0^e$
2269	—	$17,0 \pm 0,0^a$	—	$20,0 \pm 0,0^a$	—
2290	—	$13,0 \pm 0,0^e$	—	—	$22,0 \pm 0,0^b$
2363	—	$11,0 \pm 0,0^g$	—	—	$10,0 \pm 0,0^e$
2364	—	—	$9,0 \pm 0,0^d$	—	—
2366	—	$12,0 \pm 0,0^f$	—	—	—
2399	$9,0 \pm 0,0^d$	—	—	—	$10,0 \pm 0,0^e$
2770	—	—	—	—	—
2771	—	$10,0 \pm 0,0^h$	—	—	—
2772	—	—	—	—	—
2773	—	—	$9,5 \pm 0,5^c$	—	$10,0 \pm 0,0^e$
2774	$11,0 \pm 0,0^{ab}$	—	—	—	$10,0 \pm 0,0^e$
2775	—	—	—	—	$10,0 \pm 0,0^e$
2776	—	—	$9,0 \pm 0,0^d$	—	—
2777	—	$10,0 \pm 0,0^h$	—	—	$10,0 \pm 0,0^e$
2778	$9,0 \pm 0,0^d$	$9,0 \pm 0,0^i$	$9,0 \pm 0,0^d$	$10,0 \pm 0,0^d$	$9,0 \pm 0,0^f$
2785	$12,0 \pm 0,0^a$	—	—	—	$22,5 \pm 0,5^a$
2786	—	$12,0 \pm 0,0^f$	—	—	—

Продовж. табл. 5.1

Штам	Діаметр зон інгібування росту бактерій етилацетатними екстрактами міцеліальної маси, мм				
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
311	17,5±0,2 ^{bd}	—	13,0±0,0 ^f	11,5±0,5 ^e	8,0±0,0 ^{hg}
327	10,0±0,0 ^j	8,5±0,5 ^g	18,0±0,0 ^b	9,5±0,5 ^f	8,5±0,5 ^g
978	18,0±0,4 ^b	15,0±1,0 ^c	15,0±0,0 ^d	15,0±1,0 ^{cd}	18,5±0,5 ^b
988	17,0±0,2 ^{de}	15,5±0,5 ^c	21,5±0,5^a	15,0±1,0 ^{cd}	16,5±0,2 ^c
989	9,0±0,0 ^k	—	9,5±0,5 ⁱ	9,0±0,0 ^g	—
2269	16,0±1,0 ^{ef}	16,0±0,3 ^c	17,0±0,4 ^c	19,0±0,3^a	12,5±0,5 ^f
2290	14,0±0,0 ^h	14,0±0,0 ^d	15,0±1,0 ^{cd}	14,5±0,5 ^d	18,5±0,5 ^b
2363	14,0±0,0 ^h	19,0±1,0^{ab}	15,0±1,0 ^{cd}	17,0±0,2 ^b	20,5±0,5^a
2364	13,5±0,5 ^{hi}	—	13,0±0,0 ^e	—	—
2366	17,5±0,5 ^b	14,0±1,0 ^{cd}	14,0±1,0 ^{de}	16,5±0,5 ^{bc}	14,0±1,0 ^e
2399	21,0±0,4^a	19,0±0,3^b	16,0±1,0 ^c	15,0±0,0 ^d	16,0±0,2 ^d
2770	17,5±0,5 ^b	8,0±1,0 ^{fg}	15,0±0,0 ^d	15,0±1,0 ^{cd}	—
2771	8,5±0,5 ^k	14,0±0,0 ^d	21,0±0,3^a	—	14,5±0,5 ^e
2772	13,0±0,0 ⁱ	—	13,0±1,0 ^e	—	—
2773	14,0±1,0 ^{gh}	12,5±0,5 ^e	12,5±0,5 ^{ef}	14,5±0,5 ^d	15,0±0,5 ^e
2774	16,0±0,4 ^f	10,0±0,0 ^f	11,5±0,5 ^{fg}	—	9,0±0,0 ^g
2775	15,5±0,5 ^{fg}	—	—	—	—
2776	20,0±1,0^a	9,5±0,5 ^f	15,0±0,3 ^d	16,0±1,0 ^{bc}	11,0±1,0 ^f
2777	14,0±0,0 ^h	13,0±0,0 ^e	14,0±1,0 ^{de}	16,0±0,2 ^c	14,5±0,5 ^e
2778	16,0±0,3 ^f	20,5±0,5^a	18,0±0,3 ^b	15,0±0,0 ^d	16,5±0,5 ^c
2785	8,0±1,0 ^k	—	17,0±1,0 ^{bc}	12,5±0,5 ^e	9,0±0,0 ^g
2786	—	—	—	10,0±0,0 ^f	—

Примітка: «—» – відсутність антибактеріальної активності (АБА). Максимальні значення АБА щодо кожної тест-бактерії виділені жирним шрифтом. Різними латинськими літерами позначено вибірки, які достовірно відрізняються одна від одної в межах стовпчика окремо для культуральної рідини та міцеліальної маси ($p \leq 0,05$).

У результаті скринінгу виявлено штами *F. betulina* з найвищою здатністю до пригнічення росту досліджуваних бактерій. Варто відзначити штаму *F. betulina* 978, екстракт КР якого максимально пригнічував три різні культури (*B. subtilis* – на рівні 12,0±1,0 мм; *E. coli* – 15,5±0,5 мм; *K. pneumoniae* – 16,0±1,0 мм) та штаму 2269, який мав високу активність саме проти *P. aeruginosa* (20,0±0,0 мм – екстракт КР; 19,0±0,3 мм – екстракт ММ).

Всі екстракти міцелію (100 %) проявили АБА різного рівня. Натомість із екстрактів КР 90,9 % були активними, за винятком штамів *F. betulina* 2770 і 2772 (рис. 5.1, 5.2).

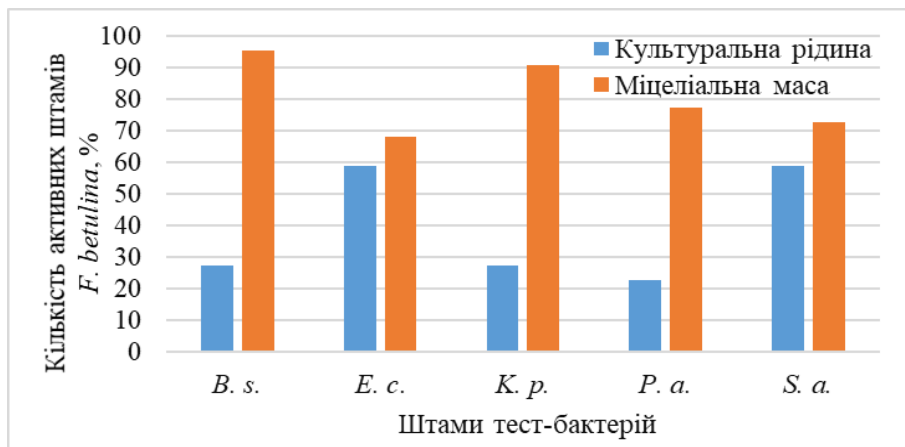


Рис. 5.1. Активність штамів *F. betulina* проти кожної з тест-бактерій

Примітка: *B. s.* – *B. subtilis*, *E. c.* – *E. coli*, *K. p.* – *K. pneumoniae*, *P. a.* – *P. aeruginosa*, *S. a.* – *S. aureus*

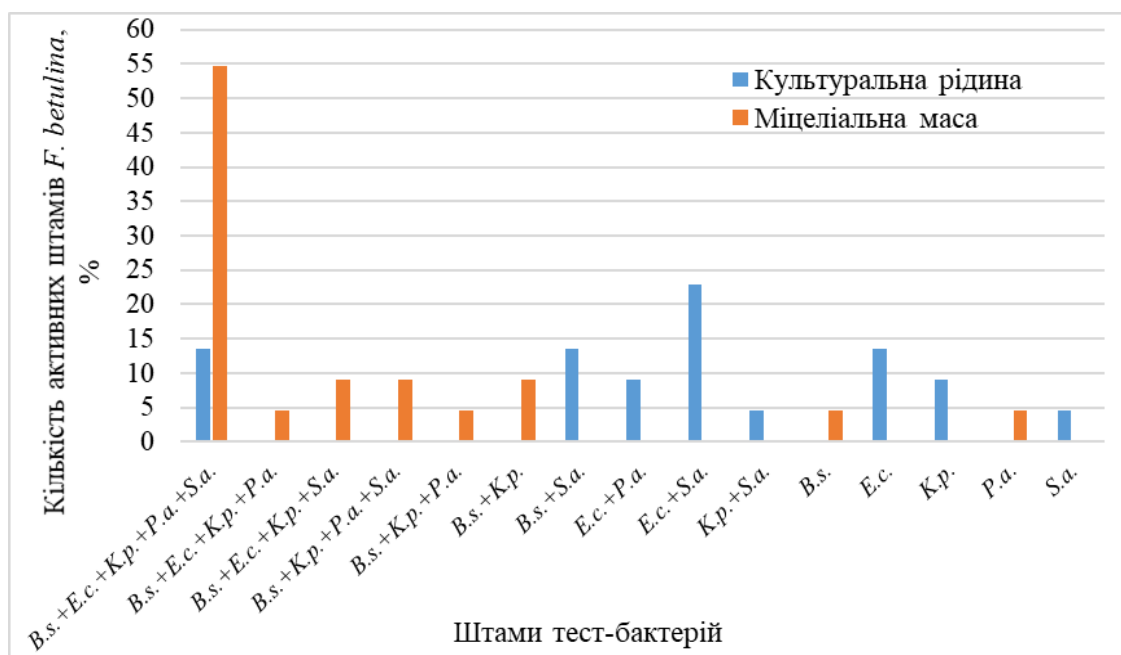


Рис. 5.2. Антибактеріальні спектри штамів *F. betulina*

Примітка: *B.s.+E.c.+K.p.+P.a.+S.a.* – пригнічення росту всіх бактерій (*B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*); *B.s.+E.c.+K.p.+P.a.*, *B.s.+E.c.+K.p.+S.a.*, *B.s.+K.p.+P.a.+S.a.* – пригнічення росту чотирьох відповідних бактерій; *B.s.+K.p.+P.a.* – пригнічення росту трьох відповідних бактерій; *B.s.+K.p.*, *B.s.+S.a.*, *E.c.+P.a.*, *E.c.+S.a.*, *K.p.+S.a.* – пригнічення росту двох відповідних бактерій; *B.s.*, *E.c.*, *K.p.*, *P.a.*, *S.a.* – пригнічення росту однієї відповідної бактерії

З точки зору спектру активності та частоти виявлення, екстракти ММ продукували вищі рівні АБА, ніж КР. Тест-бактерії *B. subtilis* та *K. pneumoniae* виявилися більш чутливими до дії екстрактів міцелію: їх пригнічували 95,5 % та 90,9 % зразків, відповідно (рис. 5.1). *E. coli* та *S. aureus* були досить чутливими як до КР, так і до екстрактів ММ. В цілому, культивованій міцелії розглядається у проведеному скринінгу як більш ефективне джерело антибактеріальних агентів.

Найширший спектр активності проти всіх п'яти досліджуваних бактерій, як в екстрактах ММ, так і в КР, виявили штами *F. betulina* 978 та 2778. Крім того, екстракти міцелію *F. betulina*, як правило, мали ширші спектри активності – проти п'яти, чотирьох або трьох досліджуваних бактерій (81,9 % штамів гриба), рідше – проти двох або одного збудника (18,1 %). Відповідно, екстракти КР здебільшого мали вужчі спектри активності – проти двох або однієї з досліджуваних культур (86,4 % штамів) і проти всіх досліджуваних бактерій (13,6 %).

АБА штаму *F. betulina* 327 з ІВК [70], використаного в наших дослідженнях, вивчали раніше відносно інших штамів бактерій [12-15]. Ці дослідження в основному були зосереджені на сирих зразках міцелію та культуральної рідини, отриманих різними методами, але без екстракції. Круподьорова та ін. [12] досліджували АБА у сирій упареній у 5 разів КР та свіжому подрібненому міцелії, отриманих від культивування на середовищах ГПД та рідкому середовищі з амарантовим борошном (АБ). Зокрема, сира концентрована КР *F. betulina* 327 на основі ГПД та АБ продемонструвала значну АБА проти *B. subtilis* та *S. aureus* (зони пригнічення ≥ 19 мм), а КР на основі АБ показала таку ж активність проти *E. coli*. Натомість, отриманий етилацетатний екстракт з КР цього штаму не мав активності проти *B. subtilis* та *S. aureus*. Порівняння АБА проти *E. coli* показало, що активність екстракту (зона інгібування $14,0 \pm 0,0$ мм) була дещо нижчою, ніж у КР на основі АБ ($20,0 \pm 0,8$ мм), але вищою, ніж у сирій КР на основі ГПД (відсутня активність). Ці результати можна пояснити явищами селективної екстракції сполук

етилацетатом та відмінностями між використаними штамами бактерій. Крім того, неочищена КР має ширший спектр позаклітинних метаболітів з більшим потенціалом біологічної активності, а деякі з цих речовин можуть не екстрагуватися етилацетатом. Відзначається, що сумарні показники біологічної активності речовин, що містяться в сирих грибних зразках, можуть бути вищими, ніж у ізольованих сполук, за рахунок синергічних взаємодій між метаболітами [1].

Порівнюючи АБА міцелію, отриманий етилацетатний екстракт з ММ штаму *F. betulina* 327 мав ширший антибактеріальний спектр (проти 100 % досліджуваних культур), на відміну від активності сирого подрібненого міцелію в іншому дослідженні [12], який був ефективним проти 66,7 % використаних культур. Проте ці рівні АБА були співставні з результатами нашого дослідження. Зони пригнічення *B. subtilis* та *E. coli* становили $10,0 \pm 0$ мм у випадку зразків сирого міцелію, вирощеного на АБ, а з етилацетатними екстрактами – $10,0 \pm 0,0$ мм проти *B. subtilis* та $8,5 \pm 0,5$ мм проти *E. coli*. Незважаючи на схожі рівні АБА, подрібнена суспензія сирого міцелію, ймовірно, потребує додаткових етапів концентрування, тоді як екстракція етилацетатом ефективно акумулює біологічно активні сполуки.

Порівняно з екстрактами, нативний міцелій та КР менш придатні для зберігання через ризик псування та низьку концентрацію метаболітів, що зумовлює необхідність різних методів обробки. Круподьорова та ін. [14] дослідили використання сушеної різними способами КР після культивування *F. betulina* 327 на середовищі ГПД. Мінімальні бактерицидні концентрації (МБК) визначали відносно стандартних штамів бактерій (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 та *P. aeruginosa* ATCC 27853). У той час як МБК зменшувалася зі збільшенням концентрації (від нативної КР до висушеної), *E. coli* ATCC 25922 показала більшу стійкість до висушеної рідини порівняно з ліофілізованою або нативною. Цю варіабельність можна пояснити термолабільністю речовин у КР під час сушіння або ж гігроскопічністю ліофілізованих зразків. Слід зазначити, що як концентрована нативна, так і

висушена КР виявляли бактерицидну дію також проти клінічних ізолятів, резистентних до певних антибіотиків. Для порівняння, етилацетатні екстракти КР дослідженого штаму *F. betulina* 327 продемонстрували активність проти *E. coli* та *P. aeruginosa*, але не мали бактерицидної дії проти *K. pneumoniae* та *S. aureus*. Ці результати підкреслюють необхідність оптимізації методів концентрування та екстракції для посилення АБА окремих культур грибів.

Окрім згаданих вище досліджень АБА нативного подрібненого міцелію, наявні обмежені літературні дані щодо вивчення екстрактів сухої міцеліальної маси *F. betulina*. Метанольні екстракти інтродукованого в культуру міцелію [45] проявляли здатність до пригнічення *B. subtilis*, *P. aeruginosa* та *S. aureus*, а екстракти міцелію колекційних штамів з ІВК [42], приготовані за допомогою 70 % етанолу, інгібували ріст *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* та *E. coli*. У зв'язку з недостатньою кількістю інформації щодо АБА екстрактів біомаси, отриманої в культурі, подальші дослідження з використанням більшої кількості розчинників та ширшого спектру тест-мікроорганізмів можуть поповнити пул даних щодо антимікробних властивостей березової губки.

Для розуміння антибактеріального потенціалу доцільно навести порівняння активності з екстрактами плодових тіл. Dresch et al. [47] провели дослідження з використанням етанольних екстрактів плодових тіл березової губки. Два штами *F. betulina* виявляли АБА проти грампозитивних тест-культур (*B. subtilis*, *S. aureus*), але були низькоефективними проти грамнегативних (*E. coli*, *P. aeruginosa*). Ймовірно, що ці етанольні екстракти містять сполуки з різною здатністю проникати через бактеріальні клітинні стінки різної будови, але вибірка штамів бактерій була надто малою, щоб зробити певний висновок. На відміну від цього дослідження, етилацетатні екстракти досліджених штамів *F. betulina* впливали як на грампозитивні, так і на грамнегативні тест-культури, залежно від штаму гриба та зразку для екстракції.

Keller et al. [53] дослідили дихлорметановий, метанольний та водний екстракти плодових тіл *F. betulina*. У той час як водний екстракт не виявив АБА, дихлорметановий та метанольний екстракти були активними щодо

B. subtilis та *E. coli*. Вірогідно, активність у даному випадку проявляли певні нерозчинні у воді сполуки, тобто продемонстрована ефективність органічних розчинників для екстракції. Сприятливими для екстракції плодових тіл були також гексан і метанол [45]: гексанові екстракти пригнічували ріст *B. subtilis* та *S. aureus*, а метанольні – *B. subtilis*, *S. aureus* та *E. coli*.

Окрім плодових тіл, дослідники також оцінювали КР, отриману при культивуванні березової губки *in vitro*. Suay et al. [48] досліджували метанольні екстракти КР чотирьох штамів *F. betulina*, які культивували глибинним динамічним способом. АБА етилацетатних екстрактів КР досліджених культур певною мірою були співставними з результатами зазначеного дослідження. Штами *F. betulina* 311, 978 та 2269 мали активність проти *P. aeruginosa* (зони пригнічення $14,5 \pm 0,5$ мм, $18,0 \pm 1,0$ мм та $20,0 \pm 0,0$ мм, відповідно), співмірну зі штамми F-048,838, F-051,849 та F-054,152 (зони ≥ 15 мм). *F. betulina* 978, 2774 і 2785 демонстрували помірні рівні АБА проти *B. subtilis* ($12,0 \pm 1,0$ мм, $11,0 \pm 0,0$ мм, $12,0 \pm 0,0$ мм, відповідно), як і штам F-051,849 з дослідження (< 15 мм). Однак штамми *F. betulina* F-048,838, F-054,152 та F-062,745 сильніше пригнічували *B. subtilis* (зони ≥ 15 мм) за отримані зразки. Деякі з досліджених культур виявили сильнішу активність проти *S. aureus*: *F. betulina* 311 ($14,5 \pm 0,5$ мм), 978 ($17,5 \pm 0,5$ мм), 988 ($18,0 \pm 0,0$ мм), 2290 ($22,0 \pm 0,0$ мм) та 2785 ($22,5 \pm 0,5$ мм), порівняно зі штамом F-048,838 (< 15 мм). Слабку активність проти *S. aureus*, подібно до штаму F-054,152, показали *F. betulina* 989, 2363, 2773, 2774, 2775, 2777 та 2778. Отже, збіжність результатів досліджень свідчить про те, що як глибинне динамічне, так і стаціонарне культивування може підтримувати продукування позаклітинних антибактеріальних сполук.

Етилацетатні екстракти вже були предметом вивчення в попередніх дослідженнях. Schlegel et al. [5] ідентифікували антибіотик піптамін з КР штаму *F. betulina* Lu 9-1, отриманої шляхом глибинного динамічного культивування. Піптамін продемонстрував високу ефективність з мінімальною інгібувальною концентрацією (МІК) 0,78–12,5 мкг/мл проти *B. subtilis*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* та *S. aureus*. В інших роботах екстракти КР, які теж приготували за

допомогою етилацетату, пригнічували ріст *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* [42,45] та *P. aeruginosa* [45]. У проведеному дослідженні такі штами, як *F. betulina* 311, 978 та 2778, продемонстрували активність широкого спектру дії, що свідчить про те, що екстракція етилацетатом та селекція штамів можуть сприяти подальшому виявленню антибактеріальних сполук.

Етилацетат також успішно застосовувався для екстракції сполук з плодових тіл [46]. Таким чином виділено тритерпени ланостанової природи, поліпоренові кислоти, бетулінову кислоту, пероксид ергостеролу та фомефіцинову кислоту. Досліджувані сполуки виявляли різний рівень АБА, і це переважно низька або слідова активність. Етилацетатні екстракти міцелію досліджених 22 штамів були більш дієвими, із зонами інгібування від $8,0 \pm 0,0$ до $21,5 \pm 0,5$ мм. Можливо, комплекс речовин в екстрактах може бути більш ефективним, ніж вплив однієї окремої сполуки [1].

Отже, продукти вирощування березової губки *in vitro*, а саме міцелій і культуральна рідина, мають АБА різної інтенсивності на рівні з дикорослими плодовими тілами, часом навіть проявляючи вищу за них активність, залежно від штаму, типу зразка та екстрагенту. Тому виявлення штамоспецифічних ознак досліджених культур і підбір способів виділення антибактеріальних агентів є перспективними кроками до створення нових терапевтичних засобів для боротьби з інфекційними захворюваннями.

5.2 Антиоксидантна активність

АОА штамів *F. betulina* визначали як відсоток інгібування DPPH-радикалів. Здатність до знешкодження вільних радикалів продемонстрували всі (100 %) досліджувані зразки (рис. 5.3). АОА екстрактів КР варіювала від $18,32 \pm 0,50$ % до $96,66 \pm 0,40$ %, тоді як екстракти міцелію мали показники активності від $7,74 \pm 2,40$ % до $90,95 \pm 0,60$ %. Максимальні значення АОА проявляли штами *F. betulina* 2773 у КР та *F. betulina* 988 у ММ. Крім того, вищезгаданий екстракт КР *F. betulina* 2773 мав співмірну активність

(96,66±0,40 %) зі зразком позитивного контролю – аскорбіновою кислотою (95,97±0,30 %).

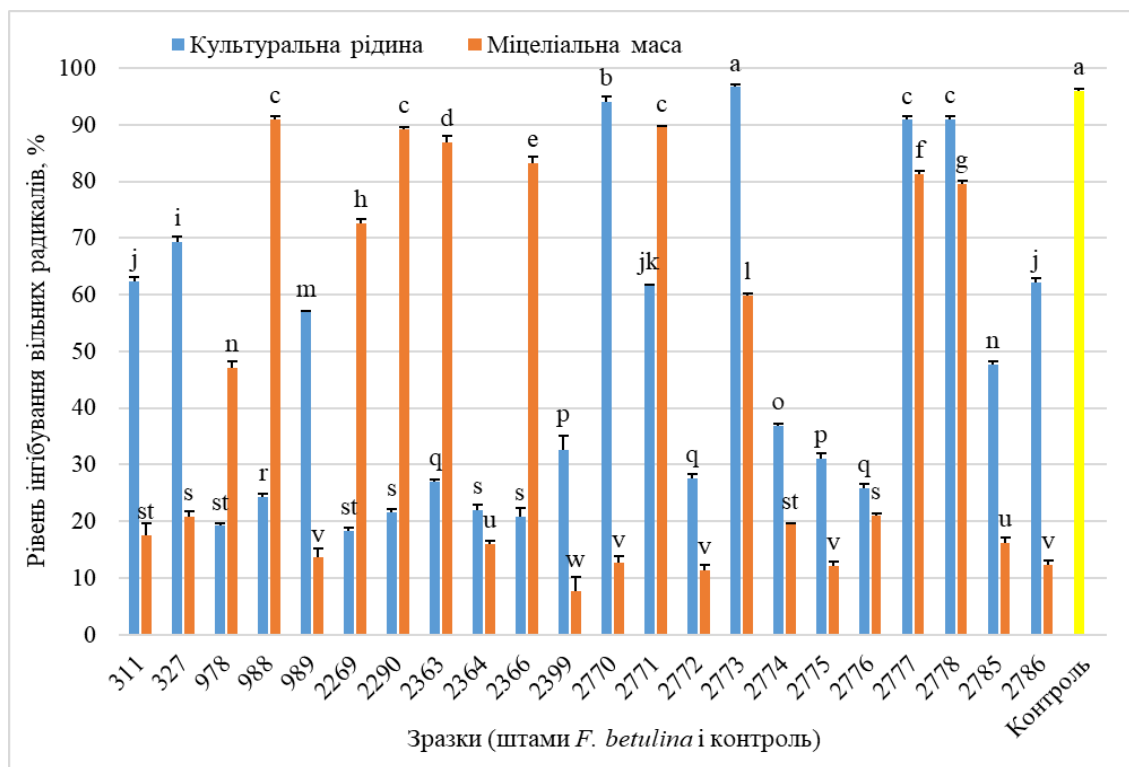


Рис. 5.3. Антиоксидантна активність штамів *F. betulina*

Примітка: контроль – відсоток поглинання вільних радикалів розчином 0,3 мг/мл аскорбінової кислоти в метанолі. Різними латинськими літерами (a–w) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

Серед штамів *F. betulina* 68,2 % з них показали вищу активність у КР, ніж у міцелії, тоді як 31,8 % штамів проявляли АОА навпаки (вища активність у ММ, ніж у КР). Однак, що стосується кількісного ступеня інгібування вільних радикалів, показник АОА ≥ 70 % частіше спостерігався у зразках міцелію (36,6 % всіх штамів гриба) порівняно зі зразками КР (22,7 %). Тому, як і у випадку з АБА, зразки з міцелію частіше себе проявляють як високоефективні.

Крім того, штами *F. betulina* 2777 і 2778 мали відносно схожу активність: 2777 (90,86±0,60 % у КР та 81,37±0,50 % у ММ) порівняно з 2778 (91,02±0,45 % і 79,61±0,50 %, відповідно). Ці значення можна вважати відносно високими як у міцелії, так і в КР, що підкреслює універсальність та перспективність використання цих двох штамів.

В інших дослідженнях для оцінки антиоксидантної активності екстрактів *F. betulina* часто визначають значення IC₅₀ (концентрацію зразків, за якої інгібування вільних радикалів становить 50 %), і в цих працях переважно використовують саме плодові тіла [9,37,38,40]. Окрім DPPH-аналізу, використовують й інші методи, такі як 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонова кислота) (ABTS), відновлювальна здатність (reducing power), залізовідновлювальна антиоксидантна здатність (ferric reducing antioxidant power або FRAP) та відбілювання β-каротину (β-carotene bleaching). Порівняння величин АОА між результатами різних досліджень є доволі утрудненим через відмінності у виконанні дослідів: способах приготування зразків із грибів, розчинниках для екстракції та методах визначення активності.

Kozarski et al. [9] оцінювали АОА за допомогою різних методик, демонструючи, що метанольні екстракти плодових тіл *F. betulina* проявляли низьку АОА, порівняно з іншими видами грибів. Однак, ці екстракти продемонстрували значний рівень інгібування DPPH (94,44 %) при концентрації 5 мг/мл, і подібний рівень активності спостерігався серед досліджених етилацетатних екстрактів (94,04±0,90 % для КР штаму 2770). Крім того, наявність фенолів, вітаміну С, лікопену та β-каротину в метанольних екстрактах плодових тіл ще більше підкреслила антиоксидантний потенціал березової губки [9,38].

Слід зазначити, що, згідно з літературними даними, дикорослі плодові тіла *F. betulina* проявляють низьку [9,40] або помірну [37,38] АОА відносно інших видів грибів. Наскільки нам відомо, АОА культивованого міцелію вивчалася лише фрагментарно [42], а дослідження культуральної рідини практично відсутні. Тому цей напрямок досліджень доповнює базу знань про культивування березової губки *in vitro* та дає можливості для підбору умов інкубації цього гриба і для інтенсифікації продукування його антиоксидантних сполук.

5.3 Вміст фенольних сполук

Наявність фенольних сполук встановлено у всіх (100 %) штамів *F. betulina* (рис. 5.4). Вміст фенольних сполук (ВФС) в екстрактах КР варіював від слідових кількостей ($\leq 0,01$ мг ЕГК/г) до $8,57 \pm 0,18$ мг ЕГК/г сухого екстракту, в екстрактах ММ – від слідових кількостей до $5,48 \pm 0,10$ мг ЕГК/г сухого міцелію. Найвищі значення ВФС виявлено в екстракті міцелію штаму *F. betulina* 2771 та в екстракті КР штаму *F. betulina* 2777. У 72,7 % штамів *F. betulina* кількість фенолів була більшою у міцелії, ніж у КР, тоді як лише 13,6 % штамів мали вищі значення ВФС у КР. Штами *F. betulina* 989, 2772 та 2773 не показали статистично значущих відмінностей у вмісті фенолів між КР та ММ. Крім того, значення ВФС у КР були більш варіабельними і менш збіжними (залежно від штаму), ніж у міцелії.

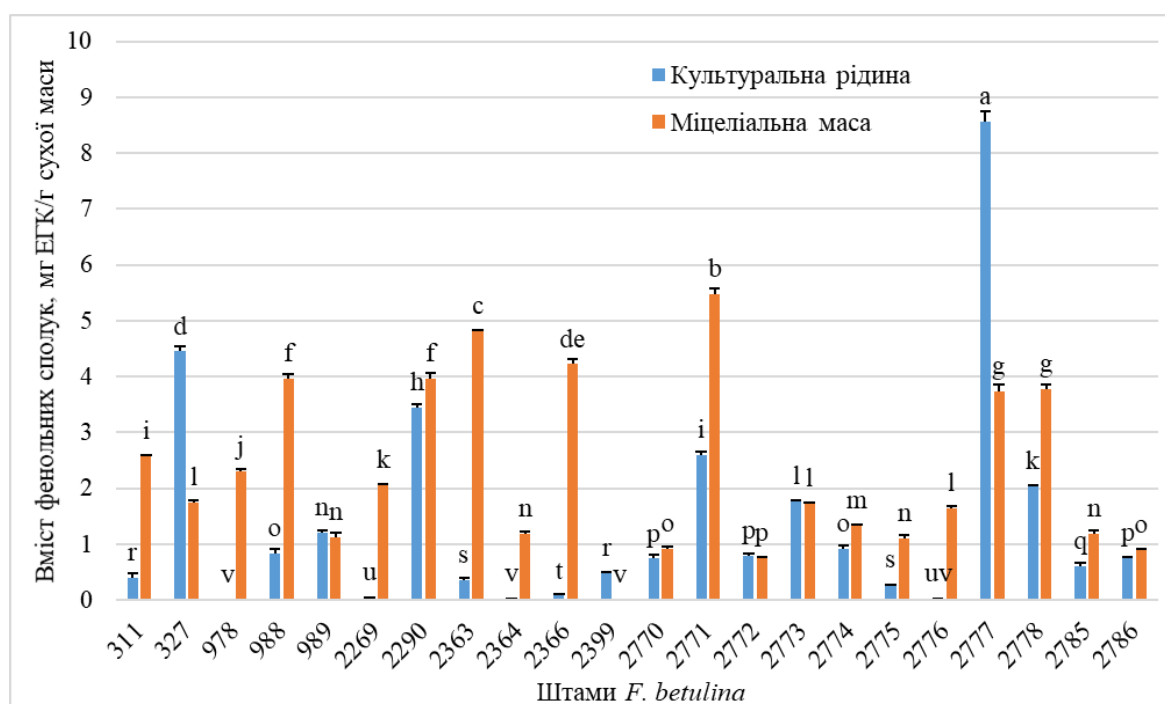


Рис. 5.4. Вміст фенольних сполук штамів *F. betulina*

Примітка: вміст фенолів в екстракті культуральної рідини розраховували на суху масу екстракту, а вміст фенолів в екстракті міцелію – на суху біомасу. Різними латинськими літерами (a–v) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

Порівняно з літературними даними [9,37,38,41], *F. betulina* демонструє нижчий ВФС у водних та метанольних екстрактах плодових тіл, ніж інші види грибів (наприклад, $34,94 \pm 0,01$ мг ЕГК/г у *F. betulina* проти $387,7 \pm 0,10$ мг ЕГК/г у *F. pinicola* [38]). Етилацетатні екстракти досліджених культур мали ще нижчі значення ($\leq 8,57 \pm 0,18$ мг ЕГК/г). Проте, у роботі Михайлової [42] продемонстровано можливість отримати більшу кількість фенольних сполук ($15,9\text{--}25,8$ мг ЕГК/г) з міцелію за допомогою екстракції метанолом та 70 % етанолом, ніж у проведеному дослідженні. Таким чином, вибір розчинника та параметри екстракції суттєво впливають на кінцевий вихід фенолів. Звичайно, слід також брати до уваги можливість продукування фенольних сполук конкретним грибом, умови його вирощування, а також біоматеріал, взятий для екстракції.

Дослідниками встановлено наявність у *F. betulina* специфічних фенольних сполук. Sułkowska-Ziaja et al. [8] ідентифікували сирінгову, галову, 5-гідроксибензойну та 3,4-дигідрофенілоцтову кислоти як у штучно культивованому міцелії *F. betulina*, так і в плодових тілах, зібраних у природі, за допомогою екстракції метанолом. Kozarski et al. [9] також підтвердили наявність у *F. betulina* різних фенольних кислот, включаючи протокатехову та хлорогенову.

Незважаючи на порівняно невисокий загальний вміст фенольних сполук у дикорослих плодових тілах та отриманих *in vitro* міцелії й культуральній рідині *F. betulina*, слід відзначити його здатність до утворення комплексу цінних БАР фенольної природи. Враховуючи цей факт, а також наявність біологічних активностей (антибактеріальної та антиоксидантної), подальші дослідження березової губки (такі як оптимізація культивування) можуть привести до підвищення продукування цільових сполук, в т.ч. і фенолів.

5.4 Кореляція між параметрами біосинтезу

Для виявлення потенційної кореляції між АБА, АОА та ВФС у штамів *F. betulina* обчислено коефіцієнт Пірсона (r) (табл. 5.2). Крім того, досліджено

зв'язок між цими результатами та продукуванням біомаси і екзополісахаридів (ЕПС) штамів *F. betulina* на середовищі ГПД, дані яких наведені в розділі 3 та в роботі [163].

Таблиця 5.2

Коефіцієнт кореляції Пірсона (r) між параметрами біосинтетичної активності штамів *F. betulina*

Кореляція між параметрами		Культуральна рідина	Міцеліальна маса
АБА/АОА	<i>B. subtilis</i> /АОА	-0,01225	0,11440
	<i>E. coli</i> /АОА	-0,06057	0,72470
	<i>K. pneumoniae</i> /АОА	0,06948	0,49270
	<i>P. aeruginosa</i> /АОА	-0,03707	0,41580
	<i>S. aureus</i> /АОА	-0,09897	0,76190
АБА/ВФС	<i>B. subtilis</i> /ВФС	-0,21320	0,03796
	<i>E. coli</i> /ВФС	0,21280	0,56180
	<i>K. pneumoniae</i> /ВФС	-0,23030	0,46800
	<i>P. aeruginosa</i> /ВФС	-0,06924	0,24010
	<i>S. aureus</i> /ВФС	0,07679	0,66500
АБА/ЕПС (для культуральної рідини)	<i>B. subtilis</i> /ЕПС	0,24700	—
	<i>E. coli</i> /ЕПС	-0,22640	—
	<i>K. pneumoniae</i> /ЕПС	-0,09976	—
	<i>P. aeruginosa</i> /ЕПС	0,02700	—
	<i>S. aureus</i> /ЕПС	0,04268	—
АБА/біомаса (для міцелію)	<i>B. subtilis</i> /біомаса	—	0,08667
	<i>E. coli</i> /біомаса	—	-0,47760
	<i>K. pneumoniae</i> /біомаса	—	-0,03541
	<i>P. aeruginosa</i> /біомаса	—	-0,18350
	<i>S. aureus</i> /біомаса	—	-0,37730
АОА/ВФС		0,52030	0,90510
АОА/ЕПС (для культуральної рідини)		0,10150	—
АОА/біомаса (для міцелію)		—	-0,43240
ВФС/ЕПС (для культуральної рідини)		0,23430	—
ВФС/біомаса (для міцелію)		—	0,90510

Примітка: «—» – відсутність розрахунку кореляції, АБА – антибактеріальна активність, АОА – антиоксидантна активність, ВФС – загальний вміст фенольних сполук, ЕПС – рівень продукування екзополісахаридів. Через скісну риску наведені показники, між якими розраховували кореляцію. Опис рівня кореляції: $|r| < 0,1$ – дуже мала, $0,1 \leq |r| < 0,3$ – мала, $0,3 \leq |r| < 0,5$ – середня, $0,5 \leq |r|$ – велика [17]

Аналіз даних проведеного дослідження виявив, що екстракти міцелію штамів *F. betulina* демонструють найбільшу кількість сильних та середніх

кореляцій між досліджуваними параметрами. Показовою є сильна позитивна кореляція між рівнями АОА і ВФС.

Позитивні кореляції різної величини були виявлені між ВФС і АБА. Виходячи з цих розрахунків, можна припустити, що АБА міцелію сильно (проти використаних штамів *E. coli* та *S. aureus*) або помірно (проти *K. pneumoniae*) пов'язана із продукуванням фенолів. Описуючи антимікробні сполуки березової губки, доцільно згадати їхню хімічну природу. Антибіотик піптамін є третинною аміною сполукою, а отже, має інше походження [5]. Часто як антимікробні агенти виступають також поліпоренові кислоти, ланостанові терпени, пероксид ергостеролу [1,2,46]. Ці речовини належать до тритерпенів, які зазвичай не розглядаються як фенольні сполуки [3,164]. Однак вони мають структурні та функціональні особливості, подібні до поліфенолів. Тому ці тритерпени можуть бути виявлені під час визначення ВФС і, таким чином, корелювати з АБА в нашому дослідженні [165].

Крім того, АОА екстрактів ММ штамів *F. betulina* в деяких випадках була пов'язана з АБА (відносно активності проти *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* та *S. aureus*). Не виключено, що механізми цих біологічних ефектів можуть бути зумовлені схожими групами сполук. Наприклад, поліпоренова кислота С володіє як антибактеріальною, так і антиоксидантною активностями [2].

Варто зазначити, що рівні продукування біомаси негативно корелюють із біологічною активністю: із середньою залежністю відносно АОА та відносно АБА проти *E. coli* та *S. aureus* та слабшою залежністю відносно АБА проти *K. pneumoniae* та *P. aeruginosa*. Це може свідчити про те, що ресурси грибів спрямовані на механізми, пов'язані зі стресом (наприклад, антиоксидантні/антибактеріальні реакції), а не на ріст організму та формування біомаси. Тому умови культивування, включаючи джерела живильних речовин, температуру, аерацію та рН середовища, суттєво впливають на ці результати.

Наше дослідження продемонструвало наявність позитивної кореляції між ВФС міцелію та кількістю біомаси відповідних штамів *F. betulina*. Зазвичай,

феноли асоціюються з біологічною активністю і теоретично повинні негативно корелювати з біомасою (оскільки ресурси гриба гіпотетично ідуть на синтез захисних сполук, згідно з попередньо зазначеними кореляціями). Слід зазначити, що позитивна кореляція, виявлена в нашому дослідженні, може бути інтерпретована з урахуванням присутності різноманітних біологічно активних сполук у міцелії *F. betulina*, відмінностей у пропорціях специфічних фенольних сполук у біомасі та їхньої різної здатності до екстракції етилацетатом.

В екстрактах КР не виявлено значущої залежності між більшістю досліджуваних параметрів (табл. 5.2). Винятком є показники АОА і ВФС, між якими виявлено сильну позитивну кореляцію (подібно до екстрактів ММ). Хоча величини АОА і ЕПС не корелювали між собою, однак у літературі є відомості, що полісахариди різних видів грибів можуть мати АОА [166,167]. Отримані результати можуть бути пояснені наявністю різних позаклітинних метаболітів у досліджених культур та вибірковою специфічністю екстракції етилацетатом. Крім того, рідке середовище ГПД, яке використовували для культивування *F. betulina* в нашому дослідженні, може бути не оптимальним для продукування ЕПС відповідно до результатів, наведених у розділі 3 та роботі [163].

Сильна позитивна кореляція, виявлена в нашому дослідженні між АОА та ВФС (як в екстрактах ММ, так і в екстрактах КР), може бути ще одним доказом пов'язаності цих параметрів. Вірогідно, позитивна взаємна залежність між АБА, АОА та ВФС може бути характерною особливістю біологічної активності та метаболізму *F. betulina*. В дослідженні Szymański et al. [37] так само була показана сильна кореляція між ВФС і АОА у макроміцетів *Daedaleopsis confragosa* (Bolton) J. Schröt., *Fomes fomentarius*, *F. betulina*, *Inonotus obliquus*, *Russoporus cinnabarinus* (Jacq.) P. Karst. і *Trametes versicolor*. Подібна кореляція спостерігалася між ВФС та АОА для грибів *F. betulina*, *F. pinicola*, *Ganoderma applanatum*, *G. lucidum* і *T. versicolor* у роботі Kozarski et al. [9]. Те ж саме справедливо і для штаму *F. pinicola* IBK 1523 [168].

Варто звернути увагу на штамоспецифічні відмінності в АБА, АОО та ВФС культур *F. betulina*. Різниця у біологічних властивостях між штамми характерна для багатьох макроміцетів [47,48,91,160-162].

Отже, встановлення статистично значущих кореляцій між біологічною активністю та кількістю БАР може суттєво пришвидшити ідентифікацію потенційних лікарських засобів, надати цінні відомості про механізми їхньої дії та сприяти розвитку персоналізованої медицини.

Висновки до розділу 5. Таким чином, проведене дослідження підтверджує біологічний та терапевтичний потенціал культур *F. betulina*, підкреслюючи штамоспецифічну природу їх антибактеріальної та антиоксидантної активності, а також рівня вмісту фенолів. Отримані результати підкреслюють важливість скринінгових досліджень для виявлення перспективних штамів-продуцентів.

При порівнянні активності культуральної рідини та екстрактів міцелію встановлено перспективні штами *F. betulina* 2777 і 2778. Штам *F. betulina* 2777 продемонстрував найвищий рівень продукування позаклітинних фенольних сполук, а екстракт міцелію *F. betulina* 2778 виявився одним із найефективніших антибактеріальних засобів. Обидва штами виявили значну антиоксидантну активність як у міцелії, так і в культуральній рідині.

На основі отриманих даних для всіх досліджуваних штамів *F. betulina* встановлено, що екстракти міцелію загалом демонстрували вищу ефективність у прояві біологічних активностей. Однак, використання під час екстракції як полярних, так і неполярних розчинників може покращити процес виділення біологічно активних сполук і розширити спектр їх виявлення. Саме тому існує потреба у подальших дослідженнях для ідентифікації та опису біологічно активних сполук *F. betulina*.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в публікації:

Zaichenko T, Barshteyn V, Sevindik M, Krupodorova T. Antibacterial and antioxidant activities of *Fomitopsis betulina* extracts. Open Agric J. 2025 Feb 20;19:e18743315375853. DOI: [10.2174/0118743315375853250213061411](https://doi.org/10.2174/0118743315375853250213061411) (Scopus Q3)

РОЗДІЛ 6

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМУ *FOMITOPSIS* *BETULINA* ІВК 2777 З МЕТОЮ ПІДВИЩЕННЯ РІВНЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ТА ЗАГАЛЬНОГО ВМІСТУ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК

Березова губка – *Fomitopsis betulina* – уже протягом тривалого часу періодично є предметом наукових досліджень багатьох мікологів, біотехнологів та фармакологів завдяки своїм встановленим терапевтичним властивостям. Дослідження *F. betulina* в культурі є обмеженими, причому значна частина наявних робіт зосереджена на вивченні впливу умов культивування на ріст та розвиток цього виду березової губки [11-13,15,16,42,47,62,69]. Варто підкреслити, що експериментальні дослідження з чистими культурами макроміцетів не тільки поглиблюють розуміння їхніх поживних, хімічних та екологічних потреб для росту та метаболізму, але й сприяють подальшому відкриттю та ідентифікації нових сполук і активностей. Практична реалізація мікобіотехнологій вимагає науково обґрунтованого відбору перспективних штамів-продуцентів і розширення знань про їхній ріст та утворення метаболітів. Оскільки речовини продукуються в різних кількостях залежно від умов культивування [163], вивчення цих умов *in vitro* з метою оптимізації процесу отримання сполук є актуальним і має велике практичне значення.

6.1 Вибір штаму для оптимізації процесу культивування

Протягом скринінгових етапів досліджень, результати яких наведено в розділах 3, 4 і 5, з'ясовано штамоспецифічні особливості росту та біосинтезу метаболітів дослідженими культурами *F. betulina*. Виявлено штами з найкращими встановленими показниками:

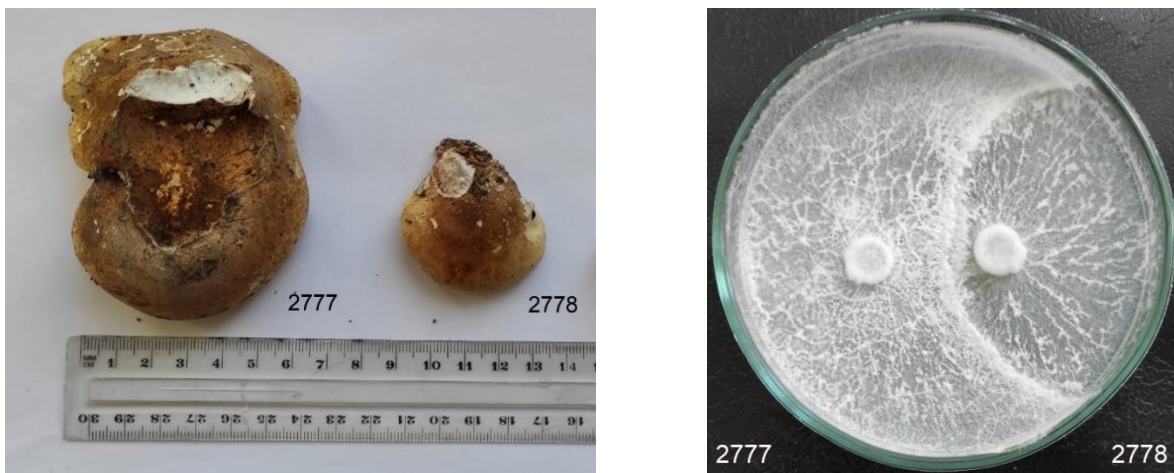
- за швидкістю радіального росту: *F. betulina* 2366 (на середовищах КДА та СДА), 2775 (на МЕА), 2786 (на ГПДА);

- за накопиченням біомаси: штами 311 (на ГПД і СД) та 2290 (на КД та МЕ);
- за утворенням екзополісахаридів: *F. betulina* 2399 (на ГПД), 311 (СД), 2269 (КД), 2770 (МЕ);
- за антагоністичною активністю: *F. betulina* 2771 (AI = 37,5);
- за антибактеріальною активністю:
 - пригнічення *B. subtilis* – етилацетатні екстракти культуральної рідини *F. betulina* 978, 2774, 2785 та міцелію штамів 2399 і 2776;
 - *E. coli* – екстракти культуральної рідини *F. betulina* 311, 978, 2269 і міцелію *F. betulina* 2363, 2399, 2778;
 - *K. pneumoniae* – культуральна рідина штамів 311, 978 та міцелію *F. betulina* 988 і 2771;
 - *P. aeruginosa* – екстракти культуральної рідини та міцелію *F. betulina* 2269;
 - *S. aureus* – екстракти культуральної рідини *F. betulina* 2290, 2785 і міцелію *F. betulina* 2363.
 - активність проти всіх тест-бактерій: під впливом екстрактів культуральної рідини та міцелію *F. betulina* 978 та 2778;
- за антиоксидантною активністю: максимум по екстракту культуральної рідини – штам 2773, максимум по міцелію – 988, 2290, 2771; висока активність як в міцелії, так в культуральній рідині – *F. betulina* 2777 і 2778;
- за вмістом фенольних сполук: *F. betulina* 2777 (у культуральній рідині), 2771 (у міцелії).

Досліджені культури демонструють значні відмінності у своїх біосинтетичних характеристиках. Серед них існують перспективні продуценти антибактеріальних, антимікотичних та антиоксидантних метаболітів. Подальшу нашу увагу вирішено зосередити на антиоксидантній активності (АОА), оскільки вона є ключовою терапевтичною характеристикою, що визначається біосинтетичними процесами продуцентів різноманітних БАР. Наразі АОА

набуває особливої актуальності. Це зумовлено довготривалим стресом та забрудненням довкілля, спричиненими сучасними факторами, зокрема і війною, тому рівень здоров'я населення значно погіршився. Вживання антиоксидантних сполук з продуктами харчування та добавками впливає на оксидативний стрес, сприяє профілактиці багатьох захворювань (включаючи хвороби серця та деякі види раку), сповільнює старіння організму тощо. Аналіз результатів попередніх досліджень виявив перспективність рівнів АОА екстрактів міцелію та культуральної рідини штамів *F. betulina* 2777 та 2778.

Варто зазначити, що в деяких визначеннях (антагоністичний індекс, АОА, кількість фенолів у міцеліальній масі) ці штами проявляли близькі за значеннями результати. Особливість полягала в тому, що плодові тіла, з яких були виділені ці культури, зростали на одному дереві (рис. 6.1 А). Це викликало питання щодо подібності їхніх властивостей та можливої ідентичності отриманих ізолятів. Однак, дослідження по сумісному культивуванню штамів 2777 і 2778 показало їх гетерогенність (вегетативну несумісність), також помічається різниця у щільності колоній та у швидкості росту (рис. 6.1 Б).



А

Б

Рис. 6.1. Плодові тіла (А) та колонії березової губки при сумісному культивуванні штамів *F. betulina* 2777 і 2778 на КДА, 28 доба (Б)

Примітка: позначки 2777 і 2778 відповідають номерам штамів *F. betulina* в ІВК

При порівнянні результатів усіх скринінгових досліджень з'ясовано, що штам *F. betulina* 2778 переважає лише за антибактеріальною активністю. За більшістю інших ознак переважає *F. betulina* 2777 (швидкістю радіального росту, накопиченням екзополісахаридів, біомаси, вмістом фенольних сполук у культуральній рідині).

Отже, за результатами попередніх етапів дослідження обрано штам *F. betulina* IBK 2777 для подальшої оптимізації параметрів культивування сприятливих для накопичення міцеліальної маси, вмісту фенольних сполук, прояву антиоксидантної активності. З технологічної точки зору, для полегшення процесу екстракції та подальших етапів, вирішено працювати саме з міцелієм, а не з культуральною рідиною.

6.2 Вибір розчинника для екстракції міцеліальної маси

Для підвищення ефективності екстракції культивованого міцелію *F. betulina* проведено визначення оптимального розчинника. Досліджували екстракти сухого міцелію, отриманого після культивування штаму *F. betulina* 2777 на середовищі ГПД. Для скринінгу розчинників обрано дистильовану воду, етанол у концентрації 96 % та 70 %, метанол, хлороформ та етилацетат (який використовувався в попередніх експериментах, описаних у розділі 5). Критеріями для оцінки були АОА та вміст фенольних сполук (ВФС) в екстрактах.

При порівнянні екстрагентів для міцелію виявлено, що більшість розчинників (дистильована вода, метанол, етанол 96 % та 70 % та етилацетат) проявили високий рівень інгібування вільних радикалів DPPH ($> 70\%$) (рис. 6.2 А). Причому найкращі показники встановлено при використанні етанолу 70 % ($90,06 \pm 0,90\%$), води ($91,01 \pm 0,38\%$) та метанолу ($91,87 \pm 0,67\%$). Однак, фенольні сполуки найкраще екстрагувалися метанолом ($20,54 \pm 0,11$ мг ЕГК/г сухої біомаси) та 70 % етанолом ($19,39 \pm 0,14$ мг ЕГК/г). Кількість фенолів в екстрактах збільшується у послідовності: хлороформ $<$ етилацетат $<$ вода $<$ етанол 96 % $<$ етанол 70 % $<$ метанол (рис. 6.2 Б)

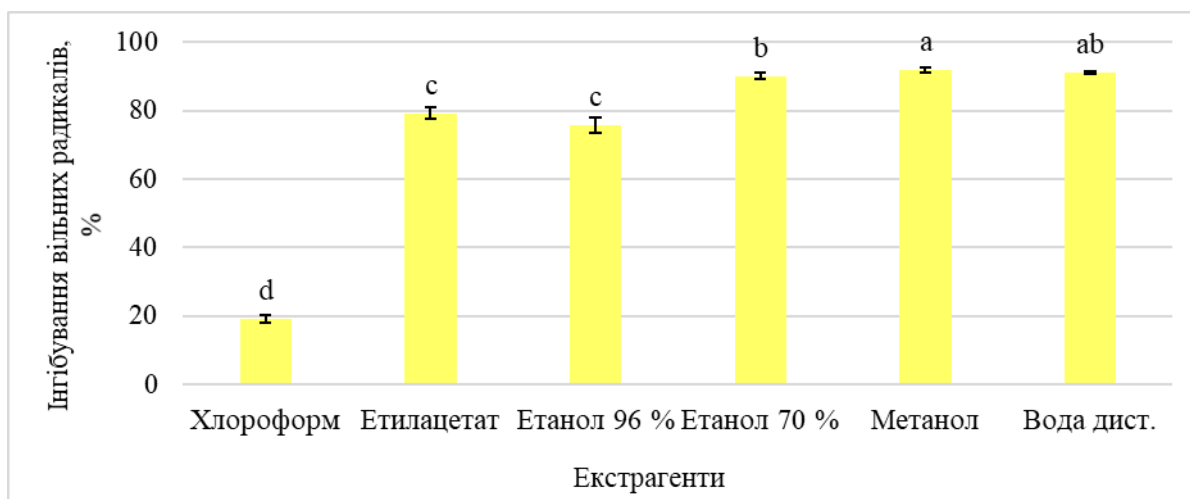
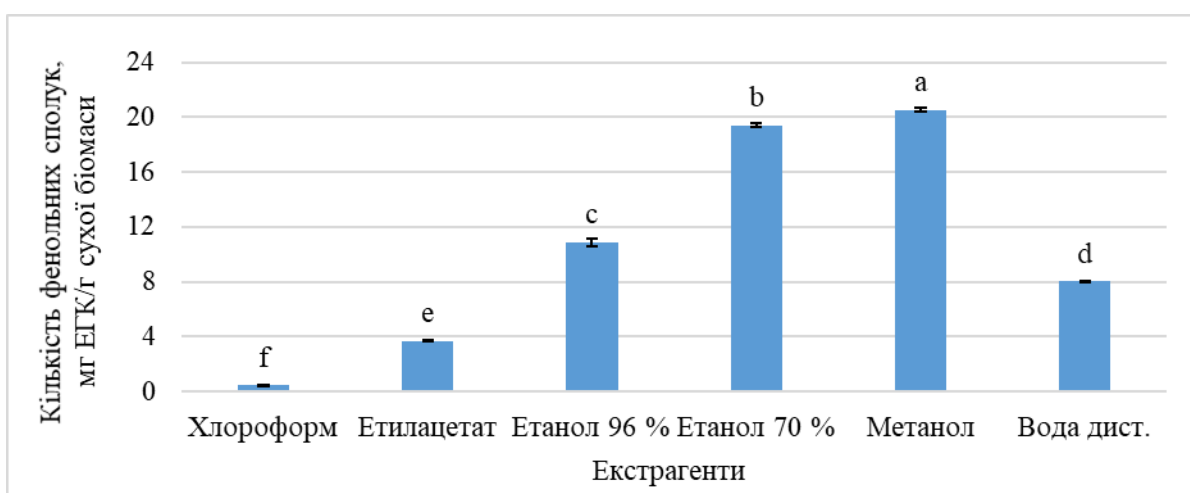
**А****Б**

Рис. 6.2. Вплив екстрагенту на визначення антиоксидантної активності (А) та вмісту фенольних сполук (Б) міцеліальної маси *F. betulina* 2777

Примітка: Вода дист. – вода дистильована. Різними латинськими літерами (a–f) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

У літературі наявні лише фрагментарні дані по екстракції фенольних та інших сполук з міцелію *F. betulina*, вирощеного в культурі. Різні розчинники використовували і для екстракції міцеліальної маси чотирьох штамів березової губки [42]. В середньому, метанол був дещо менш ефективний в екстракції фенолів (15,9–22,8 мг ЕГК/г), ніж етанол 70 % (18,7–25,8 мг ЕГК/г). Хоча отримані результати по штаму *F. betulina* 2777 були зворотні (більше фенолів – $20,54 \pm 0,11$ мг ЕГК/г – у метанольному екстракті, ніж $19,39 \pm 0,14$ мг ЕГК/г при

екстракції 70 % етанолом), все ж наведені значення є доволі співмірними. Тож і в проведеному дослідженні, і в наведеній роботі метанол та 70 % етанол є близькими за ефективністю екстракції.

При дослідженні АОА штамів *F. betulina* в етанольних (етанол 70 %) та метанольних екстрактах [42] спостерігалися відмінні від отриманих показники. Тоді як протестовані зразки інгібували DPPH на рівні ≥ 90 %, в наведеній роботі спостерігали рівень знешкодження вільних радикалів у діапазоні 45–55 %. У трьох штамів *F. betulina* вищий відсоток АОА спостерігався в етанольних екстрактах, тоді як в одного штаму не було статистично значущої різниці при використанні метанолу та етанолу 70 %. Метанольний екстракт з міцелію штаму *F. betulina* 2777 навпаки був більш ефективний відносно етанольного, однак не набагато (рис. 6.2 А).

Дані літератури також підтверджують, що вибір екстрагента значно впливає на визначення АОА і ВФС. De Bruijn et al. [169] показали, що ацетонові екстракти плодових тіл *Grifola gargar* Singer найкраще нейтралізують DPPH-радикали, тоді як вода та етанол екстрагують вищі рівні ВФС. Аналогічно, Атаманчук і Бісько [162] виявили, що найвищі показники ВФС визначаються у метанольних екстрактах глибинно вирощеного міцелію штамів *Xylaria polymorpha* і *X. longipes* (14,81–21,64 мг ЕГК/г), тоді як екстракти етилацетату мали значно нижчі рівні (0,53–1,83 мг ЕГК/г). Показники АОА етилацетатних екстрактів були на середньому рівні (41,28–60,83 %), хоч і все ще нижчі за метанольні та етанольні зразки (52,63–89,50 %). Ці відмінності підкреслюють роль штамоспецифічності культур, обраних екстрагентів та умов росту грибів при підвищенні виходу біологічно активних сполук.

Безумовно, вищенаведені результати не можна екстраполювати на всі існуючі макроміцети, оскільки біосинтетичний профіль кожного виду і штаму досить специфічний, і результати екстракції метаболітів можуть відрізнятися. Тим не менш, узагальнивши всю зазначену інформацію, можна простежити деякі тенденції. Так, дослідники надавали перевагу полярним розчинникам, таким як вода, метанол та етанол.

Таким чином, враховуючи отримані дані щодо ефективності екстракції БАР та приймаючи до уваги такі властивості розчинників, як полярність, токсичність, доступність екстрагента та зручність зберігання готових екстрактів, для подальшої оптимізації процесу отримання біологічно активних екстрактів обрано 70 % етанол.

6.3 Визначення оптимальної температури інкубації

Наступним етапом дослідження стало з'ясування впливу температури інкубації на ключові показники росту та метаболічної активності культури. Для визначення оптимальної температури культивування застосовано три режими: 20 ± 1 °C, 25 ± 2 °C та 30 ± 1 °C.

Найкраще штам *F. betulina* 2777 накопичував біомасу ($5,23 \pm 0,10$ г/л) при температурі 25 ± 2 °C (рис. 6.3 А). По рівнях інгібування вільних радикалів екстрактами міцелію, вирощеного за різних температур, значення були в діапазоні від $89,56 \pm 0,10$ % до $91,66 \pm 0,40$ % (рис. 6.3 Б), тобто не відмічалось значного впливу на прояв АОА. Здатність до утворення фенольних сполук при різних температурах інкубації відрізнялася: ВФС зменшувався у порядку 25 ± 2 °C > 20 ± 1 °C $\geq$ 30 ± 1 °C (рис. 6.3 В). Відповідно, при 25 ± 2 °C встановлена продуктивність (мг фенольних сполук міцелію на 1 л використаного поживного середовища) на рівні 101,10 мг ЕГК/л.

Рівень температури впливає не лише на біологічну активність гриба, а і його життєздатність в цілому. У дослідженні Михайлової [42] при температурі 32 °C ріст міцелію на сусло-агарі не спостерігався, та за зменшення температури до 26 °C ріст цього ж інокулюму поновлювався. Температура $36 \pm 0,1$ °C, встановлена протягом 3 діб, виявилася критичною для всіх штамів *F. betulina*. У дослідженні Ломберг [62] спостерігалася дещо відмінна ситуація. На агаризованому картопляно-глюкозному середовищі за критичної температури (37 °C) внесений на чашки інокулюм або ріс слабо (у двох штамів), або не ріс взагалі (в одного штаму). Після 10-ї доби культивування при зміні температури до 26 °C усі досліджувані штами поновлювали ріст, тобто

життєздатність не втрачалася повністю. Також, згідно з деякими літературними даними [42], навіть температура 32–33 °С може бути критичною для життєздатності окремих культур березової губки.

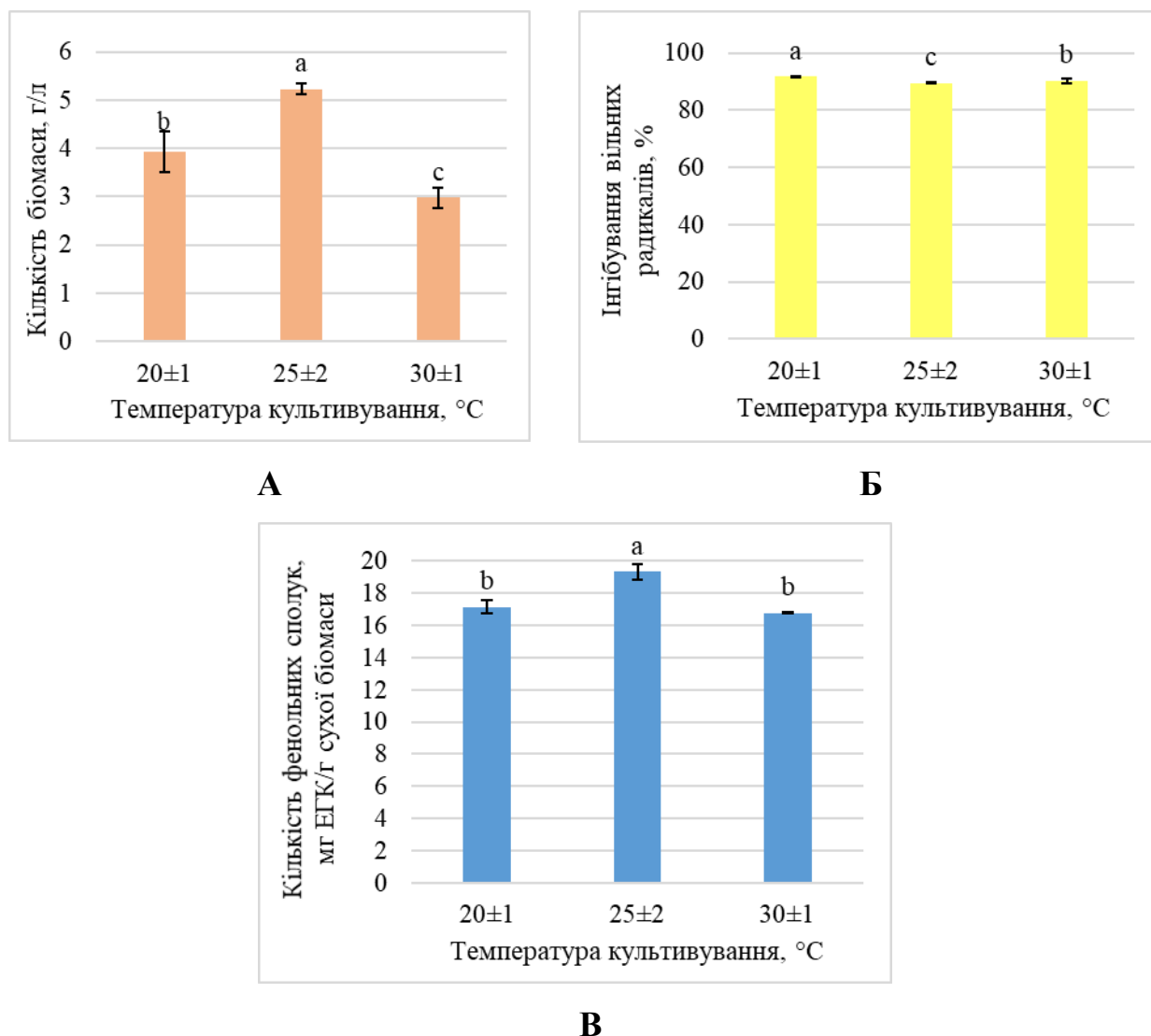


Рис. 6.3. Вплив температури культивування на накопичення міцеліальної маси (А), визначення антиоксидантної активності (Б) та вмісту фенольних сполук (В) *F. betulina* 2777

Примітка: різними латинськими літерами (а–с) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

Нижчі діапазони температур теж не є сприятливими для росту та розвитку досліджуваного виду. Вплив температури на діаметр колоній штамів *F. betulina* вивчали Dresch et al. [47]. На середовищі MEA за різних значень

(10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 32 °C, 37 °C) найбільший діаметр колоній культур березової губки після 5 діб культивування спостерігався саме за 25 °C. Також Михайлова та ін. [11] встановили, що за температури 22 °C штами *F. betulina* показують нижчі швидкості радіального росту, ніж за 26 °C.

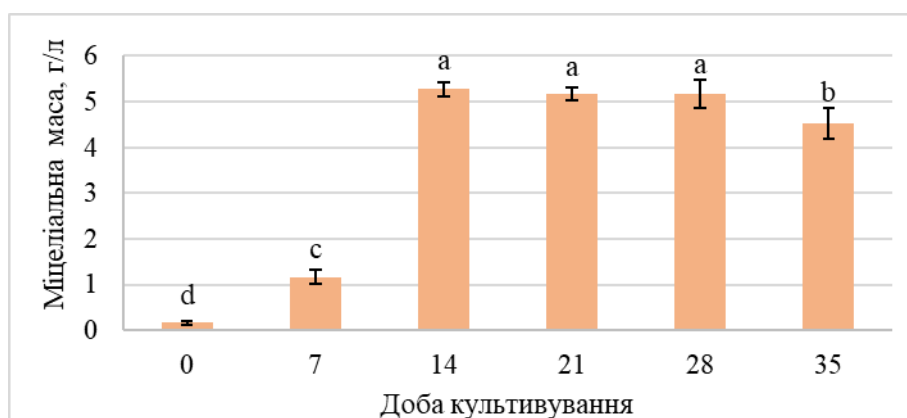
Вплив температури на ріст *F. betulina* вивчали і на рідких середовищах. Накопичення біомаси та антибактеріальну активність штаму *F. betulina* IBK 327 досліджено на середовищі ГПД [13]. Оптимальний діапазон температури встановлено при 26–28 °C.

Таким чином, порівняльний аналіз проведених досліджень та аналіз даних літератури дає підстави вважати діапазон 23–28 °C сприятливим для росту *F. betulina* як виду *in vitro*. На основі показників ВФС, АОА та накопичення біомаси штамом *F. betulina* 2777, оптимальною температурою культивування для цього штаму вважаємо 25 ± 2 °C.

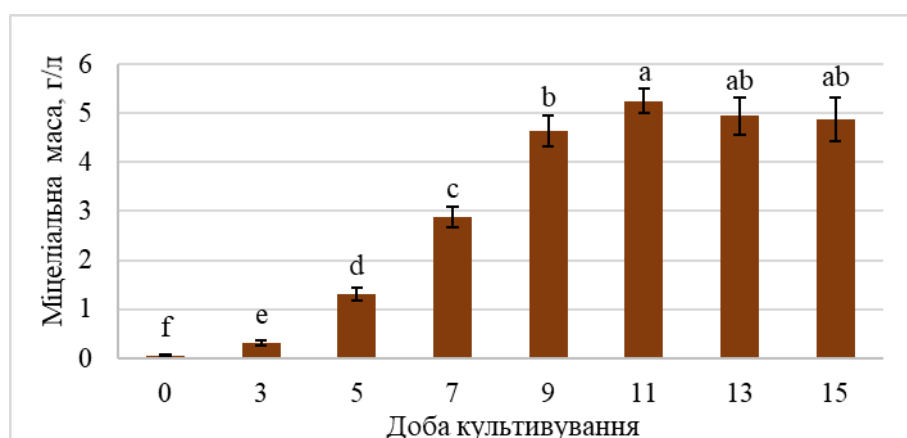
6.4 Оцінка ефективності способу та тривалості культивування

Наступним етапом дослідження стало з'ясування впливу тривалості культивування на ключові показники росту та метаболічної активності культури.

Дослідження динаміки культивування штаму *F. betulina* 2777 дозволило встановити вплив глибинного культивування як за умов струшування, так і при статичному культивуванні (поверхневому рості культури) на накопичення міцеліальної маси, фенольних сполук та прояву АОА. Найбільша кількість міцелію при поверхневому рості спостерігалася на 14-ту добу – $5,28 \pm 0,15$ г/л (рис. 6.4 А), а при глибинному – на 11 добу – $5,25 \pm 0,24$ г/л (рис. 6.4 Б). Варто відзначити, що в обох випадках накопичено кількісно співмірну біомасу. Подальше культивування не призводило до значного збільшення біомаси, і статистично значущих відмінностей не спостерігалось.



А

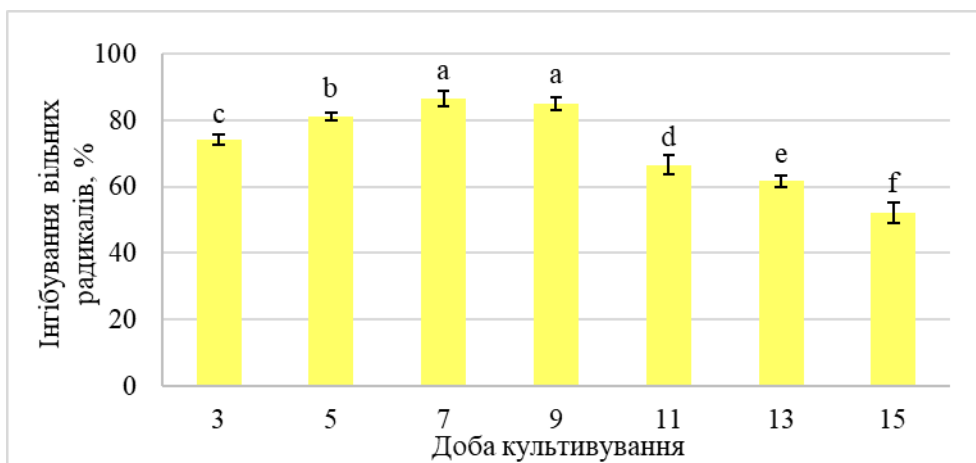


Б

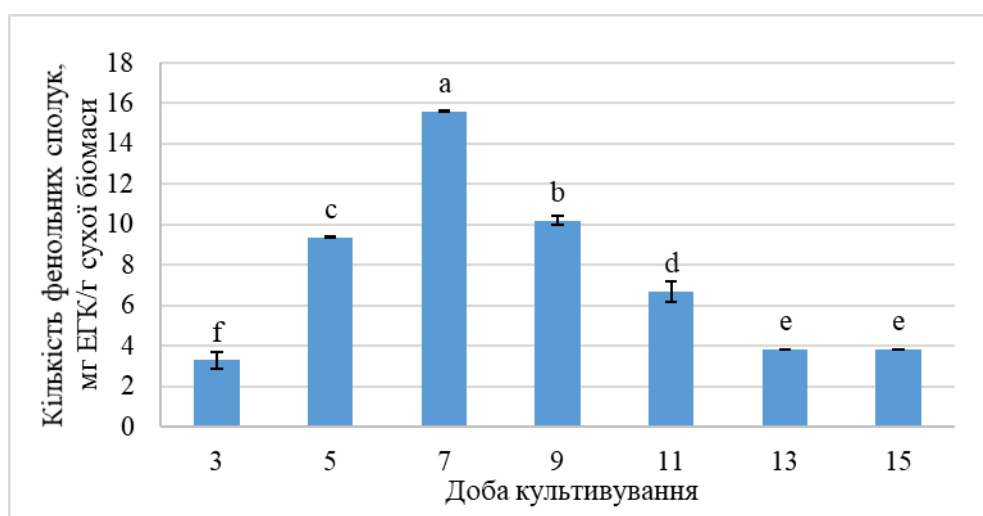
Рис. 6.4. Вплив тривалості стаціонарного (А) та динамічного (Б) культивування на накопичення міцеліальної маси *F. betulina* 2777

Примітка: різними латинськими літерами (a–f) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

Екстракти з міцелію, вирощеного за умов струшування, продемонстрували наявність АОА (рис. 6.5 А) та фенольних сполук протягом культивування з 3-ї по 15-ту добу (рис 6.5 Б). Оптимальний період вирощування за умов постійного струшування встановлено на 7 та 9 добу: з АОА $86,53 \pm 2,20$ % й $84,89 \pm 1,90$ %, відповідно; та максимумом утворення фенолів і продуктивністю: на 7 добу – $15,60 \pm 0,03$ мг ЕГК/г і $44,93$ мг ЕГК/л, на 9 добу – $10,19 \pm 0,22$ мг ЕГК/г та $47,28$ мг ЕГК/л (враховуючи зростання біомаси на 9 добу).



А

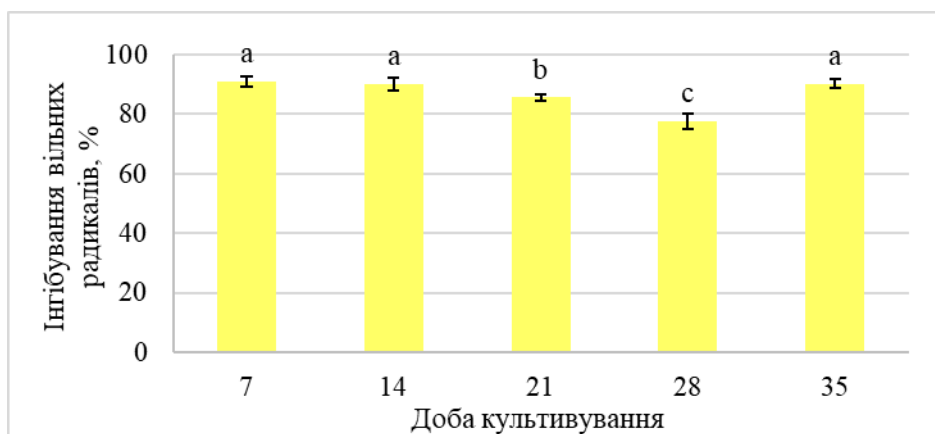


Б

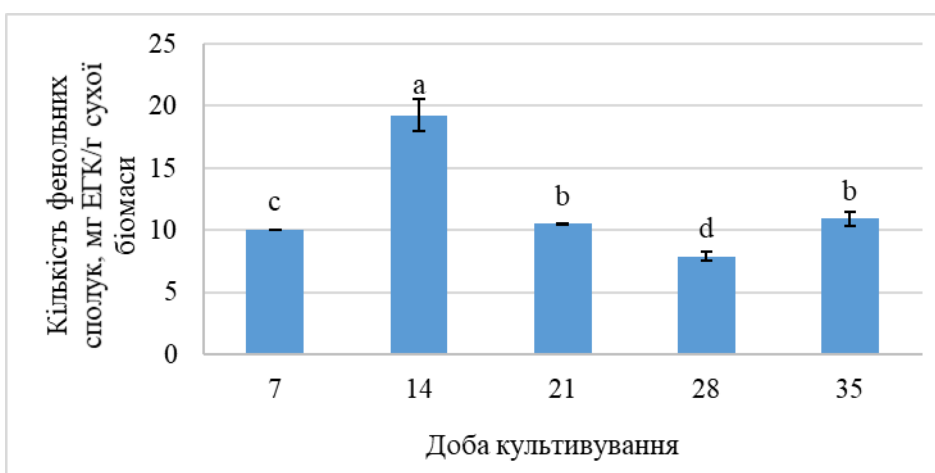
Рис. 6.5. Вплив тривалості глибинного культивування з постійним струшуванням на рівень антиоксидантної активності (А) та накопичення фенолів (Б) у міцелії *F. betulina* 2777

Примітка: різними латинськими літерами (a–f) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

Екстракти з міцелію, вирощеного за умов статичного росту, проявляють високу АОА ($>75\%$) на 7, 14 та 35 добу (рис. 6.6 А). Максимальне накопичення фенолів встановлено на 14 добу ($19,27 \pm 1,31$ мг ЕГК/г та $101,75$ мг ЕГК/л) (рис. 6.6 Б). На 28-мій добі культивування спостерігається спад як АОА, так і утворення фенолів. Однак, встановлено підвищення рівня інгібування вільних радикалів та вмісту фенолів на 35-ту добу, що, ймовірно, може бути спричинено особливостями синтезу вторинних та третинних метаболітів.



А



Б

Рис. 6.6. Вплив тривалості культивування за статичних умов на рівень антиоксидантної активності (А) та накопичення фенолів (Б) у міцелії *F. betulina* 2777

Примітка: різними латинськими літерами (a–d) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

При дослідженні накопичення біомаси чотирьох штамів *F. betulina* протягом глибинного культивування на середовищі ГПД в іншому дослідженні [42] пік росту спостерігався на 14 добу, що передбачає довше культивування, ніж у відібраного штаму *F. betulina* 2777 (11 діб). Однак, кількість накопиченої міцеліальної маси цих штамів була вищою (6–9 г/л), ніж отримана нами ($5,25 \pm 0,24$ г/л). В свою чергу, при порівнянні динаміки статичного культивування штаму *F. betulina* IBK 327 [13] та дослідженого штаму на

середовищах ГПД спостерігається однакова оптимальна тривалість інкубації – 14 діб. Але рівень накопиченої біомаси штамом *F. betulina* IBK 327 є вищим ($8,1 \pm 0,1$ г/л), ніж у *F. betulina* 2777 ($5,28 \pm 0,15$ г/л). Ймовірно, штамоспецифічні особливості гриба зумовлюють різницю у рівнях отриманої міцеліальної маси, які спостерігаються у наведених дослідженнях.

Вплив тривалості культивування на АОА та ВФС *F. betulina* досліджено вперше. Однак, у порівнянні з іншими біологічними активностями, вже встановлено вплив тривалості стаціонарного культивування на прояв антибактеріальної активності штамом *F. betulina* IBK 327 [13]. Максимальний рівень інгібування використаних тест-мікроорганізмів (*B. subtilis*, *E. coli* та *S. aureus*) досягався на 14 добу, однак лише у культуральній рідині. Наявність антибактеріальної активності міцелію спостерігалася на 21 добу (проти *S. aureus*) та 28 добу культивування (проти всіх 3 штамів бактерій). У дослідженого штаму *F. betulina* 2777 високий рівень АОА спостерігався не лише на 14 добу інкубації, а й на 35-ту. Тож вторинні та третинні метаболіти, які виділяються штамми березової губки протягом тривалого культивування, також відіграють роль у її біологічній активності.

Таким чином, за результатами вирощування штаму *F. betulina* 2777 в динаміці, оптимальним визначено культивування культури за статичних умов з отриманням поверхневого росту міцелію. Цей підхід дозволяє одночасно досягти максимального накопичення міцеліальної маси, високого рівня АОА та найвищої продуктивності за фенольними сполуками.

6.5 Вплив джерел вуглецю у поживному середовищі

Надалі дослідження присвячено вивченню впливу різних джерел вуглецю на ключові показники росту та метаболічної активності культури. Встановлено вплив 12 різних джерел вуглецю на ріст біомаси, АОА та утворення фенолів штамом *F. betulina* 2777.

Найоптимальнішим компонентом для росту міцеліальної маси виявилася мальтоза ($1,49 \pm 0,11$ г/л) (рис. 6.7). Найгірше штам конвертував фруктозу, маніт, арабінозу та целюлозу.

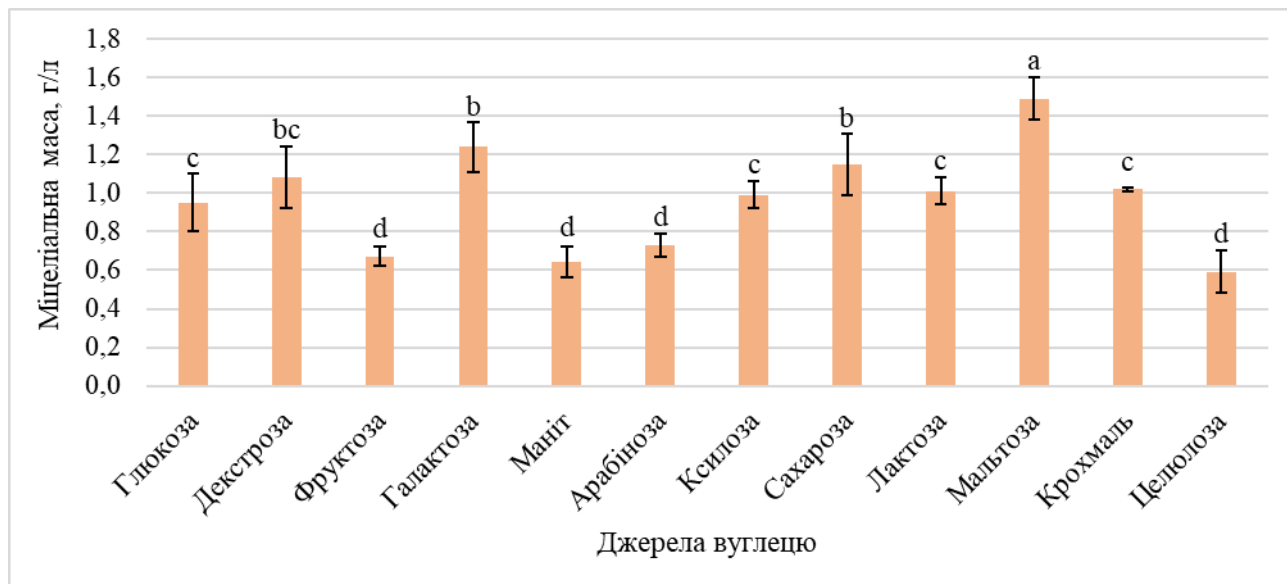


Рис. 6.7. Залежність накопичення міцеліальної маси *F. betulina* 2777 від джерела вуглецевого живлення

Примітка: різними латинськими літерами (a–d) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

Привертає увагу те, що *F. betulina* проявляє помітну штамоспецифічність при споживанні різних джерел вуглецю. Так, при дослідженні росту міцелію штаму *F. betulina* IBK 327 [13] оптимальними виявилися глюкоза, сахароза та целюлоза. Вірогідно, штам *F. betulina* 327 має більш ефективний пул целюлолітичних ферментів, ніж культура *F. betulina* 2777, яка споживала целюлозу найгірше. Однак, спостерігається закономірність позитивного впливу мальтози на ріст біомаси *F. betulina* 2777, оскільки при попередньому скринінгу 22 культур березової губки цей штам мав найкраще накопичення міцеліальної маси ($10,86 \pm 0,40$ г/л) на середовищі з мальт-екстрактом – джерелом мальтози [163,170,171].

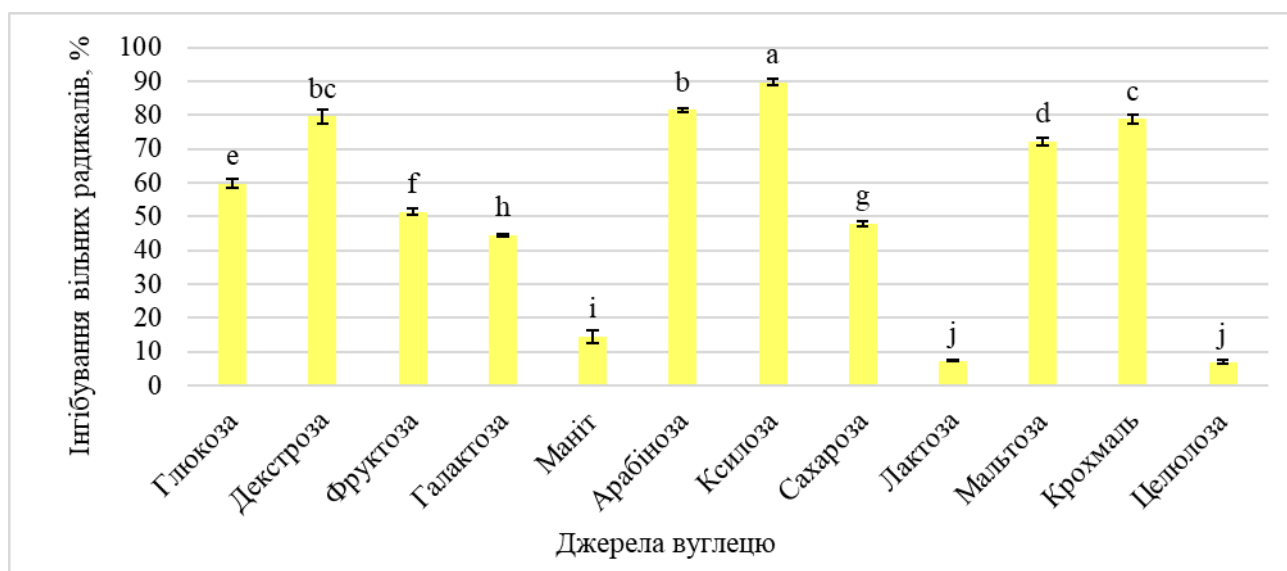
Ще один приклад прояву штамоспецифічності спостерігався у дослідженні Михайлової та ін. [16], де встановили як спільні, так і відмінні риси у споживанні джерел вуглецю. Усі 11 штамів *F. betulina* ефективно

конвертували глюкозу, також більшість з них (7 штамів) споживали середовища з крохмалем. Однак, одиничні штами проявляли здатність до накопичення біомаси на ксилозі, рафінозі та сахарозі. Окремі штами не були здатні засвоювати деякі сполуки: сахарозу (1 штам), лактозу (4 штами) та ксилозу (6 штамів). Натомість, *F. betulina* 2777 та штам *F. betulina* IBK 327 з іншого дослідження [13] мали здатність до росту на усіх використаних джерелах вуглецю. Відзначимо, що в березовій губки спостерігається схильність до поганої конвертації пентоз: у штаму *F. betulina* 2777 – низьке накопичення міцеліальної маси на арабінозі (і помірно на ксилозі), у штаму *F. betulina* 327 – неефективне споживання арабінози [13], а також відсутність росту 6 штамів на ксилозі [16] (хоча решта з досліджених 11 штамів мали на ксилозі або помірний, або ж оптимальний ріст).

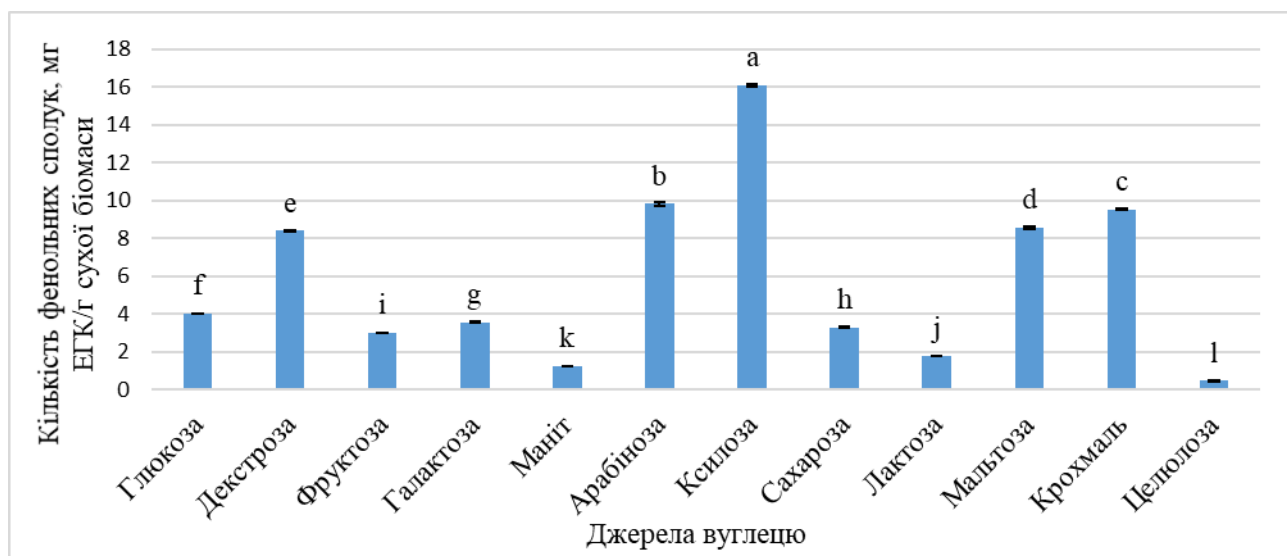
Однак пентози можуть мати не лише негативний вплив на розвиток грибів. Ксилоза може сприяти ростові міцелію окремих штамів таких видів макроміцетів, як *Antrodia cinnamomea*, *Calocybe indica* Purkay. & A. Chandra, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Inonotus obliquus*, *Oudemansiella radicata* (Relhan) Singer, *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin, *Pleurotus ostreatus*, *Schizophyllum commune* та *Tricholoma terreum* (Schaeff.) P. Kumm., а арабіноза – штамів видів *Lactarius deliciosus* (L.) Gray і *Tricholoma batschii* Gulden ex Mort. Chr. & Noordel [105]. У зв'язку з цим, результати, отримані з екстрактів міцелію *F. betulina* 2777, вирощеного із застосуванням ксилози, привертають особливу увагу. Хоча ріст біомаси на цьому джерелі вуглецю був помірний ($0,99 \pm 0,07$ г/л), однак АОА ($89,68 \pm 0,91$ %) (рис. 6.8 А) та ВФС ($16,08 \pm 0,06$ мг ЕГК/г з продуктивністю $15,92$ мг ЕГК/л) (рис. 6.8 Б) виявилися максимальними серед досліджених сполук вуглецю.

Схожа тенденція спостерігалася в штаму, який належить до спільного роду з *F. betulina*, але іншого виду – *Fomitopsis pinicola* IBK 1523. Круподьорова та ін. [168] встановили, що екстракт міцеліальної маси *F. pinicola* IBK 1523, приготований за допомогою етанолу 96 %, також підвищував свою

біосинтетичну активність за допомогою середовища з ксилозою, проявляючи максимальні АОА ($89,91 \pm 0,5$ %) та ВФС ($16,55 \pm 0,4$ мг ЕГК/г), причому ці значення співмірні з результатами дослідження етанольних (70 %) екстрактів *F. betulina* 2777.



А



Б

Рис. 6.8. Залежність рівня антиоксидантної активності (А) та накопичення фенолів (Б) у міцелії *F. betulina* 2777 від джерела вуглецевого живлення

Примітка: різними латинськими літерами (a–l) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

Таким чином, при засвоєнні всіх тест- джерел вуглецю досліджений штам *F. betulina* 2777 проявляв різні потреби для накопичення міцеліальної маси та біосинтетичної активності. Середовище з мальтозою стимулювало ріст міцелію, проте для підвищення рівнів АОА та ВФС доцільно використовувати ксилозу.

6.6 Вплив джерел азоту у поживному середовищі

Наступним етапом дослідження стало з'ясування впливу джерел азоту на ключові показники росту та метаболічної активності культури. Встановлено вплив 9 різних джерел азоту на ріст, АОА та ВФС штаму *F. betulina* 2777. Найбільш ефективним для накопичення міцеліальної маси виявилось середовище з додаванням сульфату амонію (рис. 6.9).

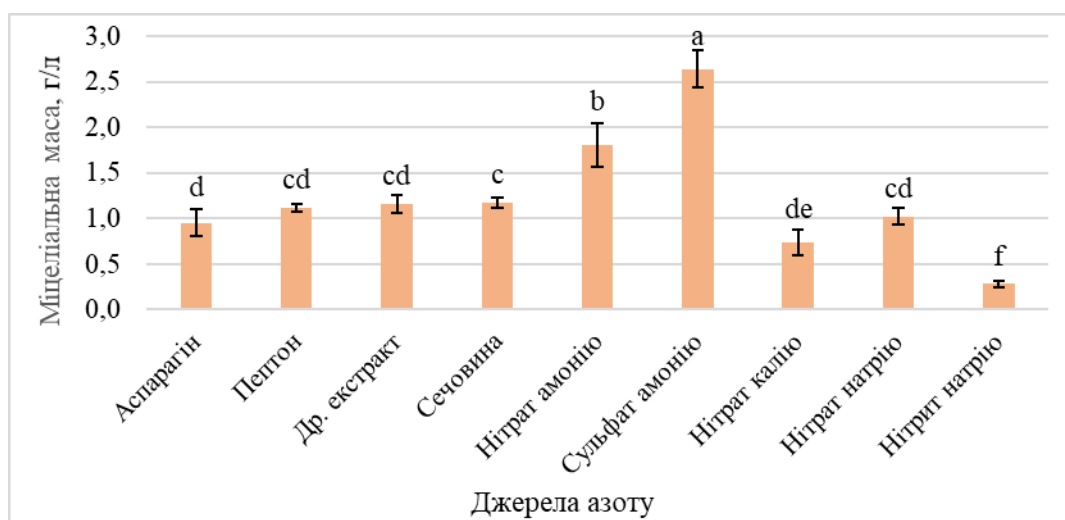


Рис. 6.9. Залежність накопичення міцеліальної маси *F. betulina* 2777 від джерела азотного живлення

Примітка: Др. екстракт – дріжджовий екстракт. Різними латинськими літерами (a–f) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

Для дослідженого раніше штаму *F. betulina* IBK 327 [13] найкращим джерелом азоту для накопичення біомаси слугував аспарагін ($1,5 \pm 0,1$ г/л), але середовище із сульфатом амонію теж сприяло росту культури ($1,3 \pm 0,1$ г/л). Якщо порівнювати кількісні показники, то штам *F. betulina* 2777 на сульфаті амонію накопичив удвічі більше маси ($2,64 \pm 0,21$ г/л), ніж *F. betulina* 327. Ці

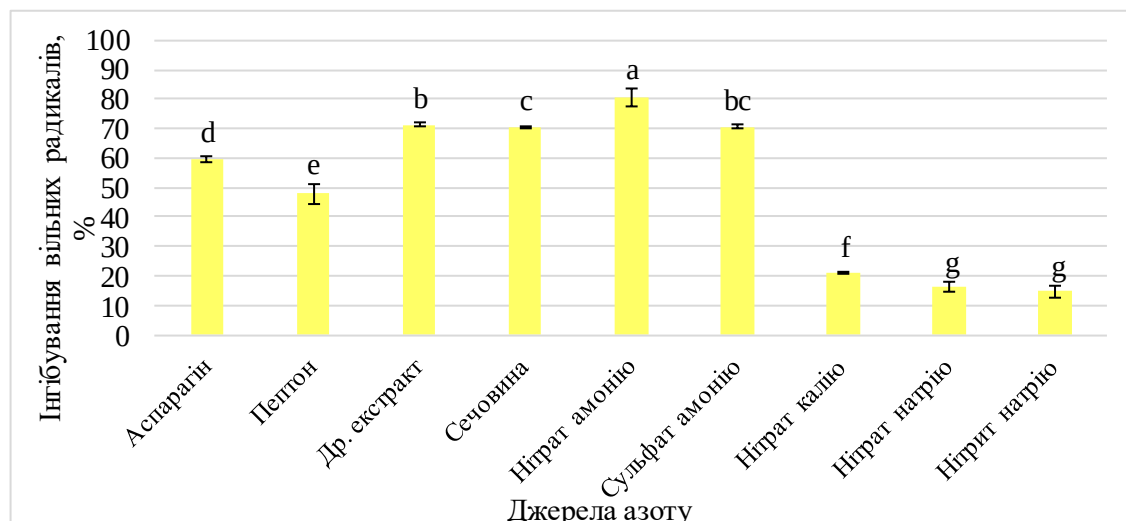
результати черговий раз підкреслюють роль штамоспецифічності у рості та розвитку березової губки. Так, дослідження 11 штамів *F. betulina* [16] продемонструвало, що усі штами надавали перевагу пептону як джерелу азотного живлення, з них ще 8 штамів не гірше конвертували аспарагін (подібно до *F. betulina* 327). Однак, одна культура також накопичувала біомасу і на амонійній солі – гідрофосфатові амонію (як і *F. betulina* 2777, який надає перевагу солям амонію, рис. 6.9).

Відзначимо, що культури *F. betulina* у своїй більшості краще споживали органічні сполуки (пептон та аспарагін). Спільним для усіх розглянутих штамів є те, що нітрат-іони засвоювалися гірше (нітрати натрію, калію, а для *F. betulina* 327 – і нітрат амонію), не кажучи вже про нітрит натрію, який є відомим хімічним мутагеном. Цю сполуку взято для вивчення не лише *F. betulina* 2777, а й штаму *F. pinicola* IBK 1523, який, однак, проявив здатність до росту на даному джерелі азоту (2,5 г/л біомаси) [168].

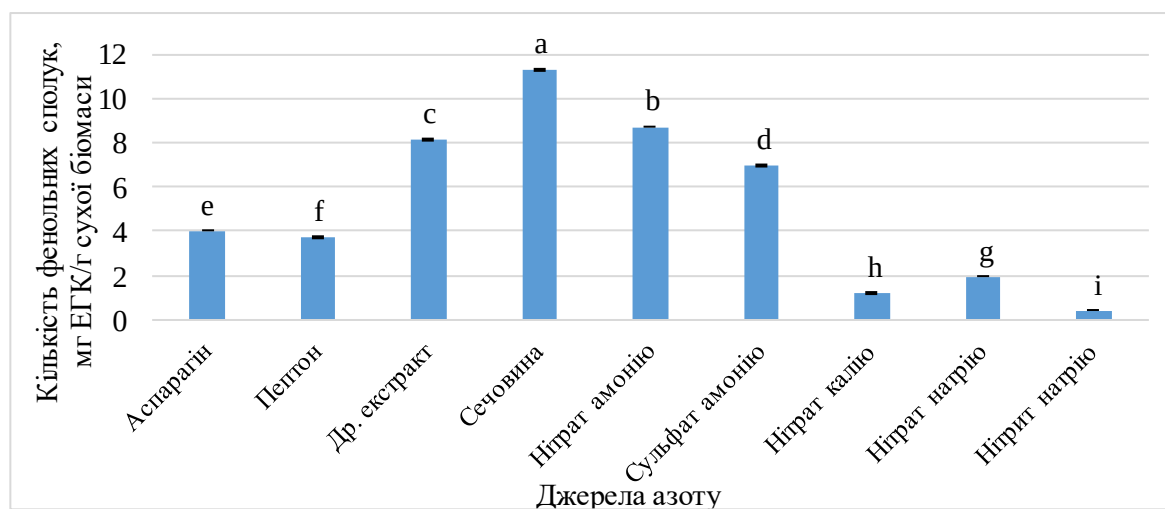
Подібно до *F. betulina* 2777, схильність до споживання солей амонію проявляють інші штами окремих видів грибів:

- ацетат амонію – *Agaricus bisporus*, *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *Phellinus tremulae* (Bondartsev) Bondartsev & P.N. Borisov, *Pleurotus eryngii*;
- сульфат амонію – *Ganoderma applanatum*, *G. lucidum*, *I. obliquus*, *Macrolepiota mastoidea* (Fr.) Singer;
- фосфат амонію – *G. lucidum*, *Phellinus alni* (Bondartsev) Parmasto, *P. baumi* Pilát, *P. cavicola* Kotl. & Pouzar, *P. chrysoloma* (Fr.) Donk, *P. conchatus* (Pers.) Quél., *P. lundellii* Niemelä, *P. pomaceus* (Pers.) Maire, *P. populicola* Niemelä, *P. torulosus*, *P. vorax* (Harkn.) Cerný;
- диамонію фосфат – *Russula sanguinaria* (Schumach.) Rauschert, *Suillus collinitus* (Fr.) Kuntze, *S. granulatus* (L.) Roussel, *Tricholoma batschii*, *T. imbricatum* (Fr.) P. Kumm.;
- хлорид амонію – *Lentinula edodes*, *Pleurotus cystidiosus* O.K. Mill., *P. floridanus* Singer, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* [105].

Оцінено вплив джерел азоту на АОА гриба та ВФС. Для підвищення рівнів АОА (рис. 6.10 А) та ВФС (рис. 6.10 Б) дослідженого штаму *F. betulina* 2777 підходять одразу кілька джерел азотного живлення.



А



Б

Рис. 6.10. Залежність рівня антиоксидантної активності (А) та накопичення фенолів (Б) у міцелії *F. betulina* 2777 від джерела азотного живлення

Примітка: різними латинськими літерами (a–i) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

Нітрат амонію сприяв прояву найвищої АОА – $80,54 \pm 3,10$ %. Але сульфат амонію, сечовина і дріжджовий екстракт також забезпечували набуття значної АОА міцелієм *F. betulina* 2777 (рівень інгібування радикалів ≥ 70 %).

Хоча за абсолютним вмістом фенолів на грам сухої маси міцелію найкращі результати були встановлені при вирощуванні на середовищі із сечовиною ($11,32 \pm 0,05$ мг ЕГК/г), однак за продуктивністю (враховуючи кількість біомаси та об'єм поживного середовища) найефективніше проявив себе екстракт міцелію, культивованого на сульфаті амонію (18,43 мг ЕГК/л). Нітрат амонію і дріжджовий екстракт сприяли утворенню фенолів у кількостях 9,48–15,82 мг ЕГК/л.

Такі сполуки, як нітрати натрію і калію, а також нітрит натрію, виявилися неоптимальними для показників біосинтетичної активності штаму гриба.

Джерела азотного живлення впливають не лише на АОА березової губки, а й на антибактеріальну активність. Варто відмітити, що використання середовища з нітратом амонію для культивування штаму *F. betulina* IBK 327 [13] сприяло прояву найширшого спектру активності щодо тест-бактерій (культуральна рідина пригнічувала ріст усіх трьох штамів: *B. subtilis*, *E. coli* та *S. aureus*, а міцелій – *B. subtilis* та *E. coli*). При цьому після використання середовища із сульфатом амонію антибактеріальна активність *F. betulina* 327 була повністю відсутня.

Отже, досліджений штам *F. betulina* 2777 проявив більшу універсальність у споживанні джерел азоту для набуття високих рівнів АОА та ВФС, ніж у випадку з джерелами вуглецю. Варто підкреслити, що органічні компоненти (дріжджовий екстракт, сечовина, аспарагін, пептон) є водночас і джерелами вуглецевого живлення, а сульфат амонію містить також сірку (яку ще можуть мати білки із сірковмісними амінокислотами у дріжджовому екстракті та пептоні). Тому подальший підбір співвідношення елементів С:N у поживному середовищі, а також використання джерел інших макро- та мікроелементів є актуальним для макроміцетів-продуцентів.

Таким чином, встановлено, що штам *F. betulina* 2777 демонстрував ріст на всіх досліджених джерелах азоту. При цьому сульфат амонію позитивно впливав на утворення біомаси, тоді як сульфат та нітрат амонію, сечовина і дріжджовий екстракт сприяли прояву біосинтетичної активності. Здатність

дослідженого штаму засвоювати різні джерела азоту є значною перевагою, що відкриває можливості для розробки поживних середовищ з оптимізованим складом.

6.7 Визначення оптимального рівня рН поживного середовища

Надалі дослідження присвячено вивченню впливу кислотності поживного середовища на ключові показники росту та метаболічної активності культури. Зазначимо, що *F. betulina* був здатен рости у широкому діапазоні значень рН (рис. 6.11).

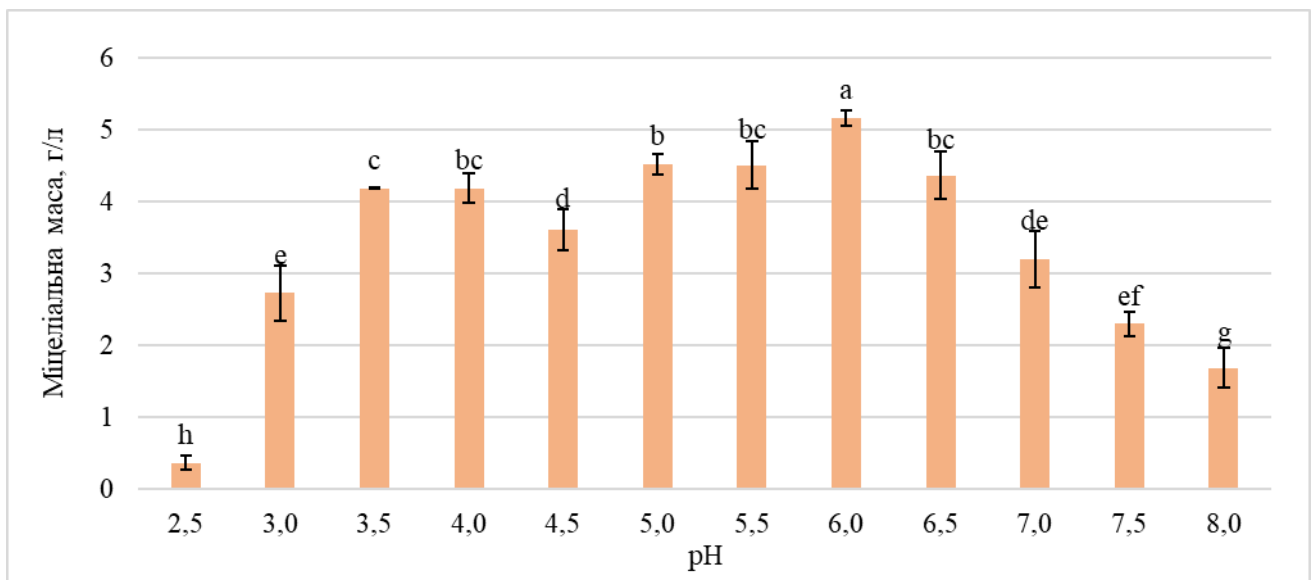


Рис. 6.11. Вплив початкового рівня рН поживного середовища на накопичення міцеліальної маси *F. betulina* 2777

Примітка: різними латинськими літерами (a–h) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

Початковий рівень рН поживного середовища ГПД мав дещо відмінний вплив на прояв АОА та рівні накопичення фенолів і міцеліальної маси. Найкращий ріст біомаси встановлено при рН 6,0 ($5,17 \pm 0,11$ г/л). У межах діапазону досліджуваних значень рН спостерігалось два піки накопичення міцелію: при рН 6,0 і рН 3,5–4,0 ($4,19 \pm 0,01$ і $4,19 \pm 0,20$ г/л відповідно). Утворення біомаси сповільнювалося при рН 4,5, а за подальшого росту значень

pH знову прискорювалося. Після pH 6,0 при наближенні до лужного діапазону швидкість росту міцелію відповідно знижувалася. Єдиним показником, при якому міцелій практично не розвивався, був сильноокислий pH 2,5.

Зазначимо, що у цьому дослідженні вперше встановлено здатність до накопичення біомаси березовою губкою при слабколужному pH (pH 7,5 – $2,30 \pm 0,17$ г/л і pH 8,0 – $1,69 \pm 0,28$ г/л). У дослідженні Михайлової та ін. [16] при рівні кислотності вище 7,0 штами *F. betulina* практично не росли. Але сприятливими показниками pH для накопичення міцеліальної маси були pH 5,5 (для 8 штамів) та 5,0 (3 штами). Найвищу продуктивність по уворенню міцелію проявили 4 штами у діапазоні 4,2–4,6 г/л. Досліджена культура *F. betulina* 2777 при pH 5,0–5,5 накопичувала співмірну кількість – по 4,5 г/л біомаси, тоді як при pH 6,0 – мала вищу продуктивність ($5,17 \pm 0,11$ г/л), що може бути зумовлене як штамоспецифічністю, так і відмінностями у складі поживних середовищ у різних роботах. Проте, на відміну від дослідженого штаму *F. betulina* 2777, культура *F. betulina* IBK 327 [13] накопичувала високий рієнь біомаси (>10 г/л) при pH 3,5–4,0 на такому ж рідкому середовищі ГПД, а нижчі значення pH були неоптимальними. У роботі Ломберг та ін. [69] досліджувався вужчий інтервал рівнів кислотності (3,2–6,1) для штаму *F. betulina* IBK 1653. При pH 3,2 культура утворювала >9 г/л біомаси, а з підвищенням рівня pH рієнь штаму поступово пригнічувався (подібно до *F. betulina* IBK 327, але відмінно від дослідженого штаму). Підсумовуючи усі наведені результати, варто підкреслити важливість корекції кислотності поживних середовищ для кожної окремої культури березової губки.

При вивченні АОА та ВФС у міцелії, вирощеному при різних значеннях pH, у межах діапазону досліджених рівнів кислотності спостерігалось два піки: в середньоокислому та слабкоокислому діапазоні. АОА ≥ 85 % була встановлена в межах pH 3,5–5,0 та 6,0–6,5 (рис. 6.12 А). Зниження рівня утворення фенолів та інгібування вільних радикалів екстрактом міцелію *F. betulina* 2777 встановлено при pH 5,5, а також при переході в сильноокислий і в слабколужний бік дослідженого діапазону. Встановлено оптимальний початковий pH 6,0, який

забезпечував продуктивність синтезу фенолів на рівні 79,98 мг ЕГК/л (рис 6.12 Б).

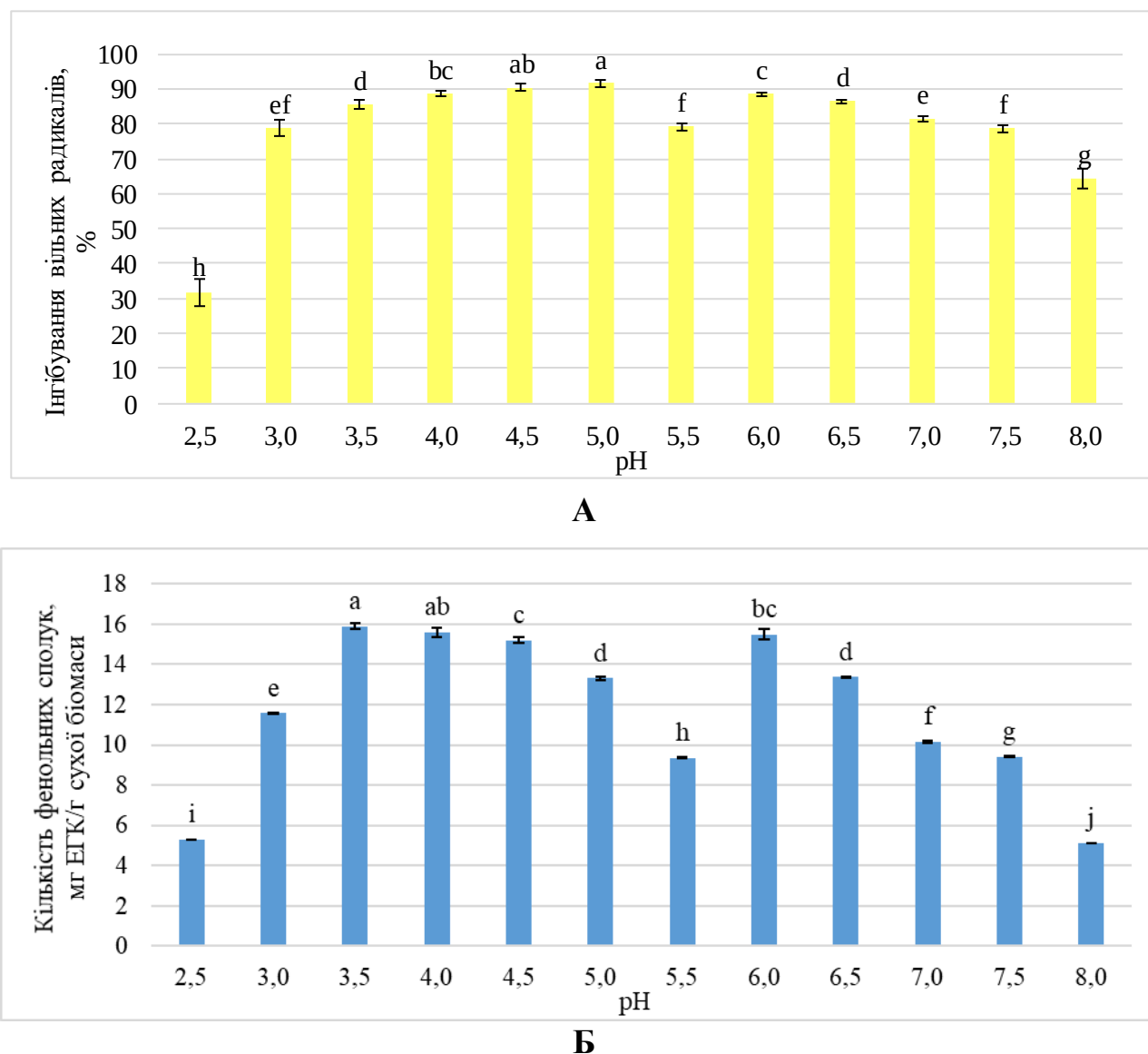


Рис. 6.12. Вплив початкового рівня рН поживного середовища на рівень антиоксидантної активності (А) та накопичення фенолів (Б) у міцелії *F. betulina* 2777

Примітка: різними латинськими літерами (a–j) позначено зразки, які достовірно відрізняються один від одного згідно з LSD-тестом ($p \leq 0,05$)

Для деяких культур зміни рН мають менший вплив на їхню біологічну активність, вказуючи на їх більшу стійкість. Штам *F. betulina* IBK 327 [13] проявляв антибактеріальну активність у культуральній рідині при всіх

досліджених рівнях кислотності (рН 3,5–6,5), але все ж надаючи перевагу слабкокислим значенням, підвищуючи здатність до інгібування тест-мікроорганізмів при рН 5,5–6,5. Інший вид макроміцета, *F. pinicola* IBK 1523, проявляв рівень АОА >80 % в діапазоні рН 2,5–6,0 з маскимальним утворенням фенольних сполук (>25 мг ЕГК/г) при рН 2,5–5,0 [168]. В цілому, усі отримані результати відповідають загальній тенденції для макроміцетів, які здебільшого надають перевагу слабкокислим або нейтральним значенням рН (за нечастими винятками) [105].

Таким чином, досліджений штам *F. betulina* 2777 здатний проявляти біосинтетичну активність в широкому діапазоні кислотності поживного середовища (2,5–8,0). Хоча для його росту були характерні точки погіршення показників росту та біосинтетичної активності, важливо відзначити, що значення рН цих точок різнилися: рН 4,5 для утворення міцеліальної маси і рН 5,5 для накопичення фенолів та набуття АОА. З огляду на встановлені максимальні рівні біомаси, АОА та фенолів, рН 6,0 визначено як оптимальний для приготування поживних середовищ, придатних для ефективного культивування *F. betulina* 2777.

6.8 Кореляція між рівнями накопичення міцеліальної маси, фенольних сполук та величиною АОА за різних умов культивування

Для обчислення потенційної кореляції між встановленими величинами розраховано коефіцієнт Пірсона (r) (табл. 6.2). Рівень інтенсивності взаємозв'язків розраховували між кількістю накопиченої біомаси, рівнем АОА та концентрацією фенолів (ВФС) у біомасі штаму *F. betulina* 2777. Відповідно, встановлено наявність як позитивних, так і негативних кореляцій різної сили.

На залежність між кількістю міцелію та рівнем АОА найсильніше впливали рівні температури та рН, і помірно – тривалість поверхневого росту при статичному культивуванні. Встановлена велика та середня негативна кореляція, як і під час скринінгу 22 штамів *F. betulina* [169].

Таблиця 6.2

Коефіцієнт кореляції Пірсона (r) між параметрами біосинтетичної активності штаму *F. betulina* 2777, залежно від умов культивування

Кореляція	Екстрагент	Т	Спосіб і тривалість культивування		Джерела живлення		рН
			Стац.	Струш.	С	N	
Біомаса/АОА	–	-0,8036	-0,4427	-0,06738	-0,157	0,07901	-0,6504
Біомаса/ВФС	–	0,5994	0,7172	0,7395	0,3455	0,3238	0,3637
АОА/ВФС	-0,08253	-0,8858	-0,1457	-0,1315	-0,08271	0,02617	-0,1694

Примітка: «–» – відсутність розрахунку кореляції; АОА – антиоксидантна активність; ВФС – вміст фенольних сполук; Стац. – глибинне культивування за стаціонарних умов; Струш. – глибинне культивування зі струшуванням; Т – температура інкубації; С – джерела вуглецю; N – джерела азоту. Через скісну риску наведені показники, між якими розраховували кореляцію. Опис рівня кореляції: $|r| < 0,1$ – дуже мала, $0,1 \leq |r| < 0,3$ – мала, $0,3 \leq |r| < 0,5$ – середня, $0,5 \leq |r|$ – велика [17]

Вірогідно, фізичні параметри культивування (температура та рН) є доволі стресогенними для культур березової губки, через що при низькому рівні утворення біомаси відбувається підвищення АОА (ймовірно, за рахунок посилення продукування біологічно активних сполук для адаптації до умов вирощування). Культивування за статичних умов могло впливати на кореляцію більше, ніж за умов струшування, через різну їхню тривалість (35 та 15 діб, відповідно). Зазначимо, що триваліше культивування передбачає залучення вторинного та третинного метаболізму, продукти якого впливають на біологічну активність гриба [13,170,171]. Також при культивуванні зі струшуванням відбувається більш ефективний масообмін, за рахунок чого біля міцелію гриба не накопичуються метаболіти та відмерлі клітини, а також є постійне надходження нутрієнтів, оскільки при перемішуванні концентрації речовин у культуральній рідині урівноважуються. А при статичному культивуванні дифузія відповідно відбувається повільніше, що може частково створювати стресогенні умови. Проте, як відомо, макроміцети ефективно

ростуть за статичних умов на твердих субстратах (і на рідких теж), тому вплив кожного способу культивування варто розглядати окремо.

У випадку з кількістю біомаси та рівнем ВФС встановлена навпаки позитивна кореляція, як і при скринінгу штамів *F. betulina* [169]. Результати дослідження вказують на сильний взаємозв'язок, що проявлявся при різній тривалості та умовах культивування (як у струшуваних, так і в статичних культурах), а також при різних температурах. Інші параметри інкубації впливали на цю кореляцію помірно.

Здатність до АОА здебільшого не корелювала з рівнем ВФС, окрім встановленого негативного взаємозв'язку за зміни температури. Для більшого розуміння наявності чи відсутності взаємної залежності між здатністю до інгібування вільних радикалів та кількістю фенольних сполук варто розглянути окремо вплив розчинника на екстракцію міцелію *F. betulina* 2777, оскільки для цього експерименту використовувалася біомаса, вирощена в однакових умовах. Між АОА та ВФС не виявлено значущої залежності, хоча очікувалося, що здатність різних розчинників екстрагувати з біомаси феноли має навпаки підкреслити їх антиоксидантний потенціал, оскільки екстрагенти також впливають на визначення рівня АОА. Крім цього, позитивна кореляція між ВФС та біологічними активностями (АОА та антибактеріальною), виявлена в етилацетатних екстрактах 22 штамів *F. betulina* [169], дозволяла висловити припущення щодо біологічної ролі фенолів березової губки. Зазвичай, в постановці експериментів дослідники визначають водночас і рівень АОА, і вимірюють ВФС [9,37,38,42,91,162,168]. Ці показники мали взаємозв'язок і при розрахунках кореляцій [9,37,168], і при прямому дослідженні біологічної ролі фенольних сполук [2,3].

Використання низки різних розчинників дозволяє екстрагувати з міцелію грибів сполуки різноманітної хімічної природи у концентраціях, які варіюють. Тому дослідники використовують різні екстракційні суміші для вилучення з біомаси відмінних за хімічними властивостями речовин [8] та складні багатоетапні методики [41]. За рахунок варіацій у якості та кількості виділених

БАР, пов'язаних з методами обробки плодових тіл та міцелію, встановлені рівні біологічної активності макроміцетів також відрізняються [1,8,33,36,42,45,53].

Використання етилацетату при первинному скринінгу антибактеріальної, антиоксидантної активностей та рівня ВФС могло сприяти виділенню саме того комплексу сполук, який позитивно корелював з біологічними активностями. У процесі вибору розчинників, а також при подальшому використанні етанолу 70 %, ймовірно, міг екстрагуватися інший пул речовин. Наприклад, ендopolісахариди, які володіють антиоксидантною активністю [166,172], можуть не лише осаджуватися етанолом, але й повноцінно ним екстрагуватися [172,173]. Деякі грибні полісахариди є розчинними у воді, що, вірогідно, може пояснити різницю між високою АОА та низьким ВФС у водному екстракті [170,171]. Важливо також враховувати різноманітність фенольних сполук та відмінності у їхніх пропорціях в екстрактах з грибів [8,9,41], оскільки це також може впливати на рівні АОА. Антиоксидантний потенціал мають також токоферолі, каротиноїди та аскорбінова кислота, які можуть утворюватися березовою губкою [9,38]. Підкреслимо, що при скринінгу розчинників етанол 70 % екстрагував порівняно значну кількість фенолів. Вірогідно, з міцелію, отриманого за різних умов культивування, цей розчинник міг вилучати відмінні комбінації сполук, що пояснює як і збіжність високих рівнів АОА та ВФС, так і їхню непропорційність за деяких умов вирощування *F. betulina* 2777.

Якщо зважати на величину кореляцій по кожному параметру культивування *F. betulina* 2777, то за впливовістю їх можна ранжувати як: температура > тривалість культивування за стаціонарних умов > рН > тривалість культивування при струшуванні > джерела вуглецю > джерела азоту. Отримані результати помітно відрізняються від порівняння впливу умов інкубації на біосинтетичні показники *F. pinicola* IBK 1523, де спостерігалися лише позитивні кореляції різної сили [168]. Сильна позитивна залежність між АОА і ВФС була встановлена за зміни джерел вуглецю та азоту, рН, тривалостей статичного та динамічного культивування. Параметри культивування *F. pinicola* IBK 1523 за їхнім впливом ранжуються як: тривалість

культивування за стаціонарних умов > рН > джерела вуглецю > тривалість культивування при струшуванні > температура > джерела азоту. Штам *F. pinicola* IBK 1523 був більш чутливим до джерел вуглецевого живлення, в той час як *F. betulina* 2777 сильніше піддавався впливу температури. Проте, для обох видів одного роду були характерні й спільні ознаки, зокрема, значний вплив тривалості стаціонарного культивування та незначний вплив джерел азоту на значущість кореляцій між біосинтетичними показниками. Безумовно, розрахунок кореляцій є лише допоміжним інструментом у дослідженнях, а роль підбору оптимальних умов вирощування культур грибів є все ще ключовою. Але встановлення рівнів чутливості штаму *F. betulina* 2777 до різних параметрів може спрогнозувати можливості адаптації гриба, що дасть змогу розробляти як специфічні, так і універсальні поживні середовища, також і з урахуванням умов параметрів культивування.

Висновки до розділу 6. За результатами проведених скринінгових досліджень 22 штамів березової губки для подальшої роботи обрано біотехнологічно перспективний штам *Fomitopsis betulina* IBK 2777. Вивчено вплив параметрів культивування даного штаму на рівень накопичення міцеліальної маси, прояву АОА та утворення ВФС. Для оптимального співвідношення продукування фенолів та біомаси, а також рівня АОА, встановлено сприятливі параметри статичного культивування: температура – 25 ± 2 °С, рН – 6,0, тривалість – 14 діб, джерело вуглецю – ксилоза, джерело азоту – сульфат амонію.

Отримані результати створюють передумови для подальшої оптимізації поживного середовища з метою підвищення кількості біомаси, фенольних сполук та антиоксидантної активності *F. betulina* 2777. Враховуючи результати розрахунків по кореляції між біосинтетичними параметрами штаму *F. betulina* 2777, у подальших дослідженнях даної культури варто звернути увагу як на здатність до накопичення міцелієм фенольних сполук, так і на утворення

ендополісахаридів, каротиноїдів, токоферолів, аскорбінової кистоти та інших речовин з антиоксидантним потенціалом.

Основні результати експериментальних досліджень даного розділу викладено в публікаціях:

Зайченко ТО, Барштейн ВЮ, Круподьорова ТА. Вплив умов культивування базидієвого гриба *Fomitopsis betulina* на антиоксидантну активність його міцелію. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Хохленкова НВ, Двінських НВ, Калюжная ОС, редактори. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали V міжнародної наук.-практ. конф; 2025 Берез 28; Харків. Х.: НФаУ; 2025. с. 190-2.

Зайченко ТО, Барштейн ВЮ, Круподьорова ТА. Вплив умов культивування на синтез фенольних сполук міцелієм макроміцета *Fomitopsis betulina*. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Філімонова НІ, Кошова ОЮ, редактори. «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині»: матеріали III науково-практичної міжнародної дистанційної конференції; 2025 Берез 21; Харків. Х.: НФаУ; 2025. с. 101-3.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Грибівництво сьогодні стрімко розвивається і посідає важливе місце як у промисловості, так і в біотехнології. Серед грибів, що викликають буру гниль, увагу привертає *Fomitopsis betulina* (березова губка) – поліпоровий гриб, який здавна використовували в народній медицині [1,2,25,26,83,84]. Сучасні дослідження підтверджують, що цей вид є джерелом біологічно активних речовин [1-3,5,8-10,24,38,41,45,46,85]. Особливо цінними вважаються полісахариди, терпени, органічні кислоти та їхні похідні. Окрім цього, у його складі знайдено білки, ферменти, пігменти та складні полісахаридно-білкові комплекси. Загалом на сьогодні вже відомо понад 100 вторинних метаболітів, які продукує *F. betulina* [3]. Все більше дослідників із різних галузей науки звертають увагу на цей гриб, що свідчить про його наукову й практичну цінність. Проте, більшість досліджень поки що залишаються несистемними й розрізненими, тому очевидною є потреба у більш цілісному, комплексному підході до вивчення *F. betulina*.

Використання чистих культур як експериментальної моделі дослідження створює підґрунтя для вивчення фундаментальних процесів життєдіяльності гриба на клітинному та молекулярному рівнях. Крім того, такий підхід сприяє ідентифікації нових біологічно активних сполук і оцінці їхньої потенційної біологічної, фармакологічної, нутрицевтичної або косметичної активності. Ці передумови визначили напрям наших досліджень, спрямованих на поглиблене вивчення фізіолого-біохімічних особливостей *F. betulina* в умовах чистої культури. Дисертаційна робота спрямована на з'ясування параметрів росту, метаболічної активності, трофічних потреб та адаптаційних механізмів березової губки за різних умов культивування. Водночас важливим аспектом дослідження є використання генетично та фізіологічно різних штамів, що дало змогу виявити внутрішньовидову мінливість, визначити найбільш перспективні культури для біотехнологічного застосування.

Результати дослідження ґрунтуються на аналізі штамоспецифічних особливостей 22 культур *F. betulina*. Із них 11 штамів (311, 327, 978, 988, 989, 2269, 2290, 2363, 2364, 2366, 2399) були надані Колекцією культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України (ІВК) [70]. Ще 11 штамів були виділені здобувачем з плодових тіл, зібраних на *Betula pubescens* Ehrh. з природніх локалітетів. Ізоляти були передані до Колекції культур шапинкових грибів Національної Академії наук України Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного (ІВК). Їм надано відповідні номери: 2770, 2771, 2772, 2773, 2774, 2775, 2776, 2777, 2778, 2785, 2786. За допомогою молекулярно-генетичних методів підтверджено видову приналежність відібраного перспективного штаму *F. betulina* 2777. Отримані нуклеотидні послідовності ITS регіону рибосомальної ДНК цього штаму депоновано до міжнародної бази даних GenBank під реєстраційним номером PQ184655.

Морфологічні характеристики культур становлять важливу основу для їхньої ідентифікації, адже зовнішні ознаки здатні відображати внутрішні біологічні особливості організму. Зміни морфології можуть слугувати індикатором фізіолого-біохімічних відмінностей між штамми, що виникають у відповідь на варіації складу поживного середовища під час культивування. За результатами досліджень, встановлено певні морфологічні особливості росту штамів залежно від використаного поживного середовища. Колонії здебільшого були шерстисті, шерстисто-повстяні та повстяні. Найбільш варіабельними ознаками морфології міцелію *F. betulina* були щільність поверхні колонії, наявність чи відсутність пігментації, ексудату, зональність, формування примордіїв, відносно сталими – тип, край і колір колонії, зміна кольору реверзума.

Оцінка біотехнологічного потенціалу культур включала визначення ростових характеристик на твердих та рідких широкоживаних поживних середовищах. Досліджені штами належать до таких, що ростуть із середньою швидкістю ($V_r = 3,1\text{--}9$ мм/добу) залежно від використаного поживного середовища та штаму. За показником швидкості радіального росту окреслено

біотехнологічно перспективні штами *F. betulina* 2366 (на середовищах КДА та СДА – $8,06 \pm 0,00$ та $7,25 \pm 0,41$ мм/добу, відповідно), 2775 (на МЕА – $8,75 \pm 0,50$ мм/добу), 2786 (на ГПДА – $7,25 \pm 0,12$ мм/добу). Кількість отриманої міцеліальної маси після 14 днів росту суттєво варіювала від $2,28 \pm 0,26$ до $13,72 \pm 0,05$ г/л залежно від середовища та використаного штаму. За показником накопичення біомаси виділено штами 311 (на ГПД і СД – $9,06 \pm 0,01$ та $12,44 \pm 0,06$ г/л, відповідно) та 2290 (на КД та МЕ – $9,98 \pm 0,02$ та $13,72 \pm 0,05$ г/л, відповідно). Результати порівняльного аналізу росту культур на агаризованих та рідких поживних середовищах показали, що вплив кожного середовища на утворення біомаси *F. betulina* має подібну закономірність. Поживні середовища можна розташувати в порядку зменшення сприятливості до росту наступним чином: для агаризованих – МЕА > СДА > КДА > ГПДА; для рідких – МЕ > СД > КД $\geq$ ГПД.

Досліджено здатність 22 штамів продукувати екзополісахариди (ЕПС). Вміст ЕПС на 14 добу культивування варіював від $0,02 \pm 0,00$ до $2,20 \pm 0,31$ г/л залежно від використаного поживного середовища та штаму. Наскільки нам відомо, ці дані отримано вперше. За показником продукування ЕПС окреслено перспективні штами: *F. betulina* 2399 (на ГПД – $0,23 \pm 0,11$ г/л), 311 (СД – $2,20 \pm 0,31$ г/л), 2269 (КД – $1,68 \pm 0,42$ г/л), 2770 (МЕ – $1,28 \pm 0,40$ г/л). Поживні середовища, що сприяли продукуванню ЕПС штамми *F. betulina*, можна ранжувати в порядку зменшення ефективності наступним чином: КД > СД > МЕ > ГПД.

За результатами експериментів, мальтоза як джерело вуглецю в МЕА та МЕ була найбільш сприятливою для росту міцелію більшості досліджених штамів *F. betulina*, тоді як рідке середовище на основі картоплі та декстрази більш придатним для продукування ЕПС.

З'ясовано біологічну активність штамів, що дозволило оцінити їхні потенційно корисні властивості та окреслити перспективи практичного застосування.

Актуальність розробки ефективних засобів контролю шкочинних і патогенних мікроміцетів зумовлює необхідність пошуку нових біологічних метаболітів з антагоністичними властивостями. У цьому контексті проведено комплексне дослідження антагоністичної активності штамів *F. betulina* шляхом їх спільного культивування з представниками широкого спектра фітопатогенних та умовно-патогенних грибів. Серед тест-об'єктів: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* IFBG 134, *Candida albicans* 319, *Cladobotryum mycophilum*, *Fusarium poae*, *Microdochium nivale*, *Penicillium polonicum* IFBG 138, *Pichia kudriavzevii* 301, а також макроміцети *Inonotus obliquus* IBK 1877 і *Heterobasidion annosum* IBK 361. Досліджені штами березової губки були не активними лише щодо агресивного мікопатогену – *C. mycophilum*. Загалом, 22 штами березової губки проявляли антагоністичну дію проти більшості грибів (69,2–84,6 %).

За результатами експериментів між дослідженими грибами виявлено характерні реакції взаємодії: тип А – двостороннє гальмування росту колоній при контакті; тип В – двостороннє гальмування росту колоній на дистанції; підтип С_{А1} – часткове наростання однієї колонії на іншу після взаємного гальмування росту при контакті; підтип С_{А2} – повне наростання однієї колонії на іншу після взаємного гальмування росту при контакті. У низці випадків спостерігалися варіації типів і підтипів антагонізму, зумовлені штамовими та видовими особливостями культур, а також складом використаного поживного середовища. Встановлено, що характер антагоністичних взаємодій змінювався залежно від тривалості експерименту, що свідчить про необхідність довготривалих спостережень у процесі культивування з метою забезпечення достовірності та репрезентативності експериментальних даних.

Уперше встановлено антагоністичну активність штамів *F. betulina* у подвійній культурі проти *A. fumigatus*, *C. mycophilum*, *F. poae*, *H. annosum* та *M. nivale*. Виявлено, що ступінь інгібування тест-організмів варіював, демонструючи поступове зростання антагоністичної дії у такій послідовності: *A. fumigatus* < *H. annosum* < *P. polonicum* < *A. niger* < *F. poae* < *I. obliquus* ≤

P. kudriavzevii $\leq$ *C. albicans* $<$ *M. nivale*. Максимальний антагоністичний індекс (37,5) зафіксовано у штаму *F. betulina* 2771, а також високий рівень антагоністичної активності встановлено для штамів 978, 989, 2364, 2770 та 2772, що свідчить про їхню перспективність для подальшого біотехнологічного застосування.

З огляду на зростаючу стійкість патогенних бактерій до традиційних антибіотиків, актуальним напрямом сучасних мікробіологічних досліджень є пошук альтернативних засобів бактеріального контролю. З огляду на це, проведено оцінку антибактеріальної активності досліджених штамів як потенційних продуцентів антибактеріальних метаболітів. Усі досліджені штами *F. betulina* (100 %) продемонстрували наявність антибактеріальної активності (АБА) у етилацетатних екстрактах міцеліальної маси та/або культуральної рідини методом дифузії в агар. Діаметр зон затримки росту тест-бактерій *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* коливався в межах від $8,0 \pm 0,0$ мм до $22,5 \pm 0,5$ мм. АБА міцелію була більш показовою. За результатами скринінгу окреслено культури з високою антибактеріальною активністю щодо тест-бактерій: пригнічення росту *B. subtilis* – етилацетатні екстракти культуральної рідини *F. betulina* 978, 2774, 2785 та міцелію штамів 2399 і 2776; *E. coli* – екстракти культуральної рідини *F. betulina* 311, 978, 2269 і міцелію *F. betulina* 2363, 2399, 2778; *K. pneumoniae* – культуральна рідина штамів 311, 978 та міцелію *F. betulina* 988 і 2771; *P. aeruginosa* – екстракти культуральної рідини та міцелію *F. betulina* 2269; *S. aureus* – екстракти культуральної рідини *F. betulina* 2290, 2785 і міцелію *F. betulina* 2363. Найширший спектр активності проти усіх тест-бактерій: під впливом екстрактів культуральної рідини та міцелію *F. betulina* 978 та 2778.

Враховуючи перспективність використання природних антиоксидантів, проведено оцінку антиоксидантної активності досліджених штамів з метою визначення їх потенціалу як джерел антиоксидантних метаболітів. Антиоксидантну активність (АОА) штамів *F. betulina* визначали як відсоток

інгібування DPPH-радикалів. Усі досліджені зразки (100 %) продемонстрували здатність до нейтралізації вільних радикалів. АОА екстрактів культуральної рідини варіювала в межах від $18,32 \pm 0,50$ до $96,66 \pm 0,40$ %, тоді як показники активності екстрактів міцелію становили від $7,74 \pm 2,40$ до $90,95 \pm 0,60$ %. Більшість штамів (68,2 %) *F. betulina* показали вищу активність у КР, ніж у міцелії. Ефективно знешкоджували вільні радикали: культуральна рідина штаму 2773 ($96,66 \pm 0,40$ %), міцелій штамів 988, 2290, 2771 (понад 89 %); міцелій і культуральна рідина штамів 2777 ($81,37 \pm 0,50$ % та $90,86 \pm 0,60$ %, відповідно) і 2778 ($79,61 \pm 0,50$ % і $91,02 \pm 0,45$ %, відповідно).

Наявність фенольних сполук за реакцією з реактивом Фоліна-Чокальтеу встановлено у всіх (100 %) штамів *F. betulina*. Вміст фенольних сполук (ВФС) в екстрактах культуральної рідини варіював від слідових кількостей до $8,57 \pm 0,18$ мг ЕГК/г сухого екстракту, в екстрактах міцелію – від слідових кількостей до $5,48 \pm 0,10$ мг ЕГК/г сухого міцелію. У більшості штамів (72,7 %) *F. betulina* кількість фенолів була більшою у міцелії, ніж у КР. За вмістом фенольних сполук найкращі результати отримано у випадку культуральної рідини штаму 2777 ($8,57 \pm 0,18$ мг ЕГК/г сухого екстракту), міцелію штаму 2771 ($5,48 \pm 0,10$ мг ЕГК/г сухого міцелію).

Потенційні кореляції між АБА, АОА та ВФС та продукуванням біомаси і ЕПС у штамів *F. betulina* обчислено за широковживаним коефіцієнтом Пірсона (r). Позитивні кореляції різної величини були виявлені між ВФС і АБА міцелію ($r = 0,04-0,67$). Рівні продукування біомаси негативно корелюють із біологічною активністю: із середньою залежністю відносно АОА ($r = -0,43$) і відносно АБА проти *E. coli* ($r = -0,48$) та *S. aureus* ($r = -0,38$) і слабшою залежністю відносно АБА проти *K. pneumoniae* ($r = -0,04$) та *P. aeruginosa* ($r = -0,18$). В екстрактах культуральної рідини не виявлено значущої залежності між більшістю досліджених параметрів. Винятком були показники АОА і ВФС, між якими виявлено сильну позитивну кореляцію ($r = 0,52$), подібно до екстрактів міцеліальної маси ($r = 0,91$). Сильна позитивна кореляція, виявлена в нашому дослідженні між АОА та ВФС (як в екстрактах міцелію, так і

культуральної рідини), може бути ще одним доказом пов'язаності цих параметрів. Вірогідно, позитивна взаємна залежність між АБА, АОА та ВФС може бути характерною особливістю біологічної активності та метаболізму *F. betulina*.

Досліджені культури *F. betulina* виявили значні відмінності у своїх біосинтетичних характеристиках. Серед них встановлено перспективні штами, що є продуцентами антибактеріальних, антимікотичних та антиоксидантних метаболітів. З огляду на проблеми сьогодення, такі як довготривалий стрес, забруднення довкілля, оксидативний стрес, який обумовлює провокування багатьох захворювань (включаючи хвороби серця та деякі види раку) та прискорює старіння організму, існує нагальна потреба у розробленні антиоксидантних дієтичних добавок. У цьому контексті штам *F. betulina* 2777 є перспективним для встановлення оптимальних параметрів культивування, сприятливих для накопичення міцеліальної маси, вмісту фенольних сполук, набуття антиоксидантної активності. З технологічної точки зору, для полегшення процесу екстракції та подальших етапів, дослідження проведено з міцелієм, а не з культуральною рідиною.

Використання різних екстрагентів для міцелію штаму *F. betulina* 2777 дозволило встановити, що більшість розчинників (дистильована вода, метанол, етанол 96 % і 70 % та етилацетат) проявили високий рівень інгібування вільних радикалів DPPH (>70 %). Причому найкращі показники досягнуто при використанні етанолу 70 % ($90,06 \pm 0,90$ %), води ($91,01 \pm 0,38$ %) та метанолу ($91,87 \pm 0,67$ %). Проте, фенольні сполуки найкраще екстрагувалися метанолом ($20,54 \pm 0,11$ мг ЕГК/г сухої біомаси) та 70 % етанолом ($19,39 \pm 0,14$ мг ЕГК/г). Загалом, кількість фенолів в екстрактах зростала в такій послідовності: хлороформ < етилацетат < вода < 96% етанол < 70 % етанол < метанол. Враховуючи отримані дані щодо ефективності екстрагентів та приймаючи до уваги такі властивості розчинників, як полярність, токсичність, доступність екстрагента та зручність зберігання готових екстрактів, 70 % етанол визначено оптимальним розчинником.

З'ясовано вплив умов культивування на ключові показники росту та метаболічної активності штаму *F. betulina* 2777. Рівні інгібування вільних радикалів екстрактами міцелію встановлено в діапазоні від 89,56–91,66 %, що свідчить про відсутність значного впливу температури на антиоксидантну активність. Однак, здатність до утворення фенольних сполук варіювала залежно від температури інкубації, знижуючись у послідовності: 25 °C > 20 °C ≥ 30 °C. На основі показників ВФС, АОА та накопичення біомаси штамом 2777, оптимальною температурою культивування для цього штаму обрано 25±2 °C. Найбільший ріст міцелію при статичному культивуванні (поверхневому рості культури) спостерігався на 14 добу – 5,28±0,15 г/л, а при струшуванні – на 11 добу – 5,25±0,24 г/л. Ці дані свідчать про накопичення кількісно співмірної біомаси за цих умов росту. Сьома доба росту за умов струшування визнана оптимально для АОА (86,53±2,20 %) та вмісту фенолів (15,60±0,03 мг ЕГК/г), а 14 доба – у випадку статичного культивування, з показниками АОА понад >75 % і ВФС на рівні 19,27±1,31 мг ЕГК/г. Оптимальнішим джерелом вуглецю для росту міцеліальної маси встановлено мальтозу, проте для підвищення рівнів АОА (89,68±0,91 %) та ВФС (16,08±0,06 мг ЕГК/г) доцільно використовувати ксилозу.

Сульфат амонію стимулював продукування біомаси, проте нітрат амонію сприяв прояву найвищої АОА – 80,54±3,10 %. Відзначено, що сульфат амонію, сечовина і дріжджовий екстракт також забезпечували набуття значної АОА міцелієм штаму 2777 (рівень інгібування радикалів ≥70 %). Це свідчить про більшу універсальність дослідженого штаму у споживанні джерел азоту для набуття високих рівнів АОА та ВФС, ніж у випадку з джерелами вуглецю. За продуктивністю рівнів фенольних сполук (18,43 мг ЕГК/л) оптимальним джерелом обрано сульфат амонію. Початковий рівень рН поживного середовища ГПД мав дещо відмінний вплив на прояв АОА та рівні накопичення фенолів і міцеліальної маси. Найкращий ріст біомаси (5,17±0,11 г/л) встановлено при рН 6,0. АОА понад 85 % була встановлена в межах рН 3,5–5,0

та 6,0–6,5, тоді як оптимальний початковий рН 6,0 забезпечував продуктивність утворення фенолів на рівні 79,98 мг ЕГК/л.

За результатами коефіцієнтів Пірсона на залежність між кількістю міцелію штаму 2777 та рівнем АОА найсильніше впливали рівні температури та рН, і помірно – тривалість культивування за статичних умов. У випадку з кількістю біомаси та рівнем ВФС встановлена навпаки позитивна кореляція. Результати дослідження вказують на сильний взаємозв'язок, що проявлявся при різній тривалості та умовах культивування (як у струшуваних, так і в статичних умовах), а також при різних температурах. Інші параметри інкубації впливали на кореляцію помірно. Здатність до АОА здебільшого не корелювала з рівнем ВФС. Зважаючи на величини кореляції, параметри культивування *F. betulina* 2777 за їхнім впливом можна ранжувати так: температура > тривалість статичного культивування > рН > тривалість культивування при струшуванні > джерела вуглецю > джерела азоту.

Отримані результати створюють передумови для подальшої оптимізації поживного середовища з метою підвищення кількості біомаси, вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності *F. betulina* 2777. Враховуючи кореляційний аналіз біосинтетичних параметрів штаму 2777, у подальших дослідженнях цієї культури доцільно зосередитися як на здатності міцелію до накопичення фенольних сполук, так і на утворенні ендополісахаридів, каротиноїдів, токоферолів, аскорбінової кислоти та інших сполук з антиоксидантним потенціалом.

Таким чином, отримані результати створюють науково обґрунтовану базу для подальшого використання окреслених в роботі перспективних штамів-продуцентів екзополісахаридів, фенольних сполук та метаболітів з антимікробними та антиоксидантними властивостями з культур *F. betulina*. Дослідження має значний потенціал для досягнення Цілей сталого розвитку ООН до 2030 року. Встановлена біоактивність метаболітів сприяє розробці нових препаратів для зміцнення здоров'я, профілактики хвороб і боротьби з резистентністю до ліків (Ціль 3). Виявлена антимікотична дія та здатність до

біоконтролю патогенів відкривають перспективи для сталого сільського господарства. Розвиток біотехнологій на основі таких досліджень стимулює інновації, створення робочих місць і експортний потенціал (Ціль 9), сприяє екологічно безпечному виробництву (Ціль 12) і збереженню біорізноманіття (Ціль 15).

ВИСНОВКИ

Встановлено штамоспецифічні культурально-морфологічні та біосинтетичні особливості 22 штамів *Fomitopsis betulina* (березової губки) та визначено значний біотехнологічний потенціал цих штамів у продукуванні цінних метаболітів з антиоксидантними та антимікробними властивостями, що обґрунтовує доцільність скринінгу та оптимізації умов культивування для цілеспрямованого отримання біологічно активних речовин з метою створення інноваційних засобів.

1. Інтродуковано в культуру та депоновано до Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України одинадцять ізолятів *F. betulina*, що розширює ресурсну базу для подальших фундаментальних і прикладних біотехнологічних та мікологічних досліджень.
2. З'ясовано вплив поживних середовищ на культурально-морфологічні особливості штамів *F. betulina*. Найбільш варіабельними ознаками є щільність поверхні колоній, наявність або відсутність пігментації, ексудату, зональності та здатність до формування примордіїв, тоді як тип, край і колір колоній, а також зміна кольору реверсу залишаються відносно стабільними показниками незалежно від умов культивування. Колонії міцелію переважно шерстисті та повстяні.
3. Встановлено, що більшість штамів *F. betulina* характеризуються середніми рівнями швидкості росту (3,50–8,75 мм/добу), накопичення біомаси (2,28–13,72 г/л) та утворення екзополісахаридів (0,02–2,20 г/л). Виявлено, що мальтоза є найсприятливішим джерелом вуглецю для росту, а рідке середовище на основі картопляного відвару з додаванням декстрази – для продукування екзополісахаридів у більшості досліджених штамів *F. betulina*. Штам *F. betulina* 311 продемонстрував найбільший біотехнологічний потенціал завдяки високим показникам накопичення біомаси (12,44 г/л) та утворення екзополісахаридів (2,2 г/л).

4. Встановлено високу антагоністичну здатність штамів *F. betulina* щодо широкого спектра мікроміцетів (*Candida albicans*, *Pichia kudriavzevii*, *Microdochium nivale*, *Fusarium poae*, *Penicilium polonicum*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*) та макроміцетів (*Heterobasidion annosum*, *Inonotus obliquus*), про що свідчать значення антагоністичного індексу (AI) в межах 28,0–37,5. Штами *F. betulina* були не активними лише по відношенню до *Cladobotryum mycophilum*. Найвищу антагоністичну активність (AI 37,5) виявлено для штаму *F. betulina* 2771. Вперше встановлено антагоністичну дію *F. betulina* у подвійних культурах проти *A. fumigatus*, *C. mycophilum*, *F. poae*, *H. annosum*, *I. obliquus* та *M. nivale*.
5. Виявлено, що більша частина досліджених етилацетатних екстрактів штамів *F. betulina* (60 %) проявляла антибактеріальну активність щодо грампозитивних (*S. aureus*, *B. subtilis*) та грамнегативних (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) бактерій, з діаметрами зон затримки росту від 8,0 до 22,5 мм. Визначено окремі штам, екстракти культуральної рідини та міцелію яких проявляють максимальну інгібувальну дію на певні види бактерій, причому екстракти міцелію загалом характеризуються ширшим спектром та вищою антибактеріальною активністю порівняно з екстрактами культуральної рідини. Культуральна рідина і міцелій штамів *F. betulina* 978 та 2778 виявили активність проти всіх використаних тест-бактерій.
6. Виявлена антиоксидантна активність у всіх досліджених етилацетатних екстрактах штамів *F. betulina*. Знешкодження вільного радикалу 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу (DPPH) варіювало в межах від 7,74 до 96,66 % залежно від штаму та типу екстракту. У 15 штамів вища антиоксидантна активність спостерігалась у культуральній рідині, тоді як у 7 штамів більш активними були екстракти міцеліальної маси. Штами 2777 та 2778 відзначилися високою антиоксидантною активністю як у культуральній рідині (90,86 % і 91,02 %), так і в міцелії (81,37 % і 79,61 %).
7. Встановлено загальний вміст фенольних сполук в екстрактах культуральної рідини від слідових кількостей до 8,57 мг ЕГК/г сухого екстракту, а в

екстрактах міцелію штамів *F. betulina* – від слідових кількостей до 5,48 мг ЕГК/г сухого міцелію. Найвищий вміст фенольних сполук виявлено в екстрактах міцелію штаму *F. betulina* 2771 та в культуральній рідині штаму 2777.

8. Визначено оптимальні умови культивування для максимального накопичення біомаси, фенольних сполук та прояву антиоксидантної активності відібраного штаму *F. betulina* 2777: початковий рН середовища 6,0, температура 25 ± 2 °C, ксилоза як джерело вуглецю та сульфат амонію як джерела азоту, а також глибинне культивування за статичних умов тривалістю 14 діб. З урахуванням варіативності встановленого вмісту фенолів (від 0,44 до 20,54 мг ЕГК/г у міцелії) та рівня антиоксидантної активності (від 19,14 до 91,87 %) залежно від екстрагенту, в якості оптимального обрано 70 % етанол. Підтверджено видову приналежність культури, отримані нуклеотидні послідовності депоновано в GenBank.
9. Встановлено значний вміст екзополісахаридів і фенольних сполук у культуральній рідині окремих штамів *F. betulina* разом із вираженою антибактеріальною та антиоксидантною активністю цієї ж рідини, аналогічно до активності міцелію, що свідчить про вагомую роль внутрішньо- та позаклітинних метаболітів у набутті загального біологічного потенціалу дослідженого виду. Це підкреслює необхідність застосування комплексного підходу до вивчення біологічної активності макроміцетів з урахуванням метаболітів ендо- та екзогенного походження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pleszczyńska M, Lemieszek MK, Siwulski M, Wiater A, Rzeski W, Szczodrak J. *Fomitopsis betulina* (formerly *Piptoporus betulinus*): the Iceman's polypore fungus with modern biotechnological potential. World J Microbiol Biotechnol. 2017 April 4;33(83). DOI: [10.1007/s11274-017-2247-0](https://doi.org/10.1007/s11274-017-2247-0)
2. Gafforov Y, Deshmuk SK, Verekar SA, Tomšovský M, Yarasheva M, Chen J, et al. *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai; *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. – Fomitopsidaceae. In: Khojimatov OK, Gafforov Y, Bussmann RW, Eds. Ethnobiology of Uzbekistan. Cham: Springer; 2023. pp. 1085-101. DOI: [10.1007/978-3-031-23031-8_108](https://doi.org/10.1007/978-3-031-23031-8_108)
3. Li J, Li Z, Duan Y, Liu C, Yan M. Secondary metabolites of *Fomitopsis betulina*: chemical structures, biological activity and application prospects. J Fungi. 2024 Aug 29;10(616). DOI: [10.3390/jof10090616](https://doi.org/10.3390/jof10090616)
4. Guevara-Gonzalez R, Torres-Pacheco I, editors. Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI. Springer Science & Business Media; 2014. 476 p. DOI: [10.1007/978-3-319-03880-3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-03880-3)
5. Schlegel B, Luhmann U, Hartl A, Grafe U. Piptamine, a new antibiotic produced by *Piptoporus betulinus* Lu 9–1. J Antibiot. 2000 Sept;53(9):973-4. DOI: [10.7164/antibiotics.53.973](https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.973)
6. Nowotarska P, Janeczek M, Wiatrak B. Cytotoxic activity of *Fomitopsis betulina* against normal and cancer cells – a comprehensive literature review. Contemp Oncol. 2024 Oct 15;28(3):191-200. DOI: [10.5114/wo.2024.144223](https://doi.org/10.5114/wo.2024.144223)
7. Sevindik M, Bal C, Eraslan E, Uysal İ, Mohammed F. Medicinal mushrooms: a comprehensive study on their antiviral potential. Prospect. Pharm. Sci. 2023 June 6;21(2):42-56. DOI: [10.56782/pps.141](https://doi.org/10.56782/pps.141)
8. Sułkowska-Ziaja K, Szewczyk A, Galanty A, Gdula-Argasińska J, Muszyńska B. Chemical composition and biological activity of extracts from fruiting bodies and mycelial cultures of *Fomitopsis betulina*. Mol Biol Rep. 2018 Oct 13;45(6):2535-44. DOI: [10.1007/s11033-018-4420-4](https://doi.org/10.1007/s11033-018-4420-4)

9. Kozarski M, Klaus A, Špirović-Trifunović, B, Miletić S, Lazić V, Žižak Ž, et al. Bioprospecting of selected species of polypore fungi from the Western Balkans. *Molecules*. 2024 Jan 28;29(314). DOI: [10.3390/molecules29020314](https://doi.org/10.3390/molecules29020314)
10. Sułkowska-Ziaja K, Motyl P, Muszyńska B, Firlej A. *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. – bogate źródło związków aktywnych biologicznie. *Post Fitoter*. 2015;16(2):89-95.
11. Михайлова ОБ. Морфолого-культуральні властивості лікарського гриба *Piptoporus betulinus* (Basidiomycetes) на агаризованих живильних середовищах. *Укр. ботан. журн*. 2014;71(5):603-9.
12. Krupodorova T, Barshteyn V, Zabeida E, Pokas E. Antibacterial activity of macromycetes mycelia and culture liquid. *Microbiol Biotechnol Let*, 2016;44(3):246-53. DOI: [10.4014/mbl.1603.03003](https://doi.org/10.4014/mbl.1603.03003)
13. Krupodorova TA, Barshteyn VYu, Kizitska TO, Pokas EV. Effect of cultivation conditions on mycelial growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* (Berk.) Singer and *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai. *Czech Mycol*. 2019 Dec 13;71(2):167-86. DOI: [10.33585/cmy.71204](https://doi.org/10.33585/cmy.71204)
14. Krupodorova T, Barshteyn V, Pokas E. Antibacterial activity of *Fomitopsis betulina* cultural liquid. *Eureka Life Sci*. 2019 Nov 30;6:10-6. DOI: [10.21303/2504-5695.2019.001066](https://doi.org/10.21303/2504-5695.2019.001066)
15. Krupodorova T, Barshteyn V, Kizitska T, Kvasko H, Andriiash H, Tigunova O. Effect of ultraviolet C irradiation on growth and antibacterial activity of *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han and Y.C. Dai. *GSC Biol Pharm Sci*. 2018;4(3):1-6. DOI: [10.30574/gscbps.2018.4.3.0073](https://doi.org/10.30574/gscbps.2018.4.3.0073)
16. Михайлова ОБ, Ломберг МЛ, Красінько ВО. Біотехнологічні основи інтенсивного культивування лікарського базидієвого гриба *Fomitopsis betulina* (Fomitopsidaceae, Polyporales). *Наукові праці НУХТ*. 2021;27(1):32-41. DOI: [10.24263/2225-2924-2021-27-1-5](https://doi.org/10.24263/2225-2924-2021-27-1-5)
17. Mann WU. Test calculator [Internet]. Statistics Kingdom; 2017 [cited 2025 March 28]. Available from: <https://www.statskingdom.com/>

18. Karunarathna SC, Patabendige NM, Kumla J, Hapuarachchi KK, Suwannarach N. The bioactive compounds, beneficial medicinal properties, and biotechnological prospects of *Fomitopsis*: a comprehensive overview. *Front Cell Infect Microbiol.* 2025;15:1534617. DOI: [10.3389/fcimb.2025.1534617](https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1534617)
19. Han ML, Chen YY, Shen LL, Song J, Vlasák J, Dai YC, et al. Taxonomy and phylogeny of the brown-rot fungi: *Fomitopsis* and its related genera. *Fungal Divers.* 2016;80:343-73. DOI: [10.1007/s13225-016-0364-y](https://doi.org/10.1007/s13225-016-0364-y)
20. Liu S, Song CG, Xu TM, Ji X, Wu DM., Cui BK. Species diversity, molecular phylogeny, and ecological habits of *Fomitopsis* (Polyporales, Basidiomycota). *Front microbiol.* 2022;13:859411. DOI: [10.3389/fmicb.2022.859411](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.859411)
21. European Council for the Conservation of Fungi. Activities [Internet]. European Mycological Association (EMA); Bern Convention (Council of Europe) Standing Committee; Planta Europa Network; NWFP (Non-Wood Forest Products); 1998–2019 [updated 2019 Sep 27; cited 2025 May 5]. Available from: <http://www.eccf.eu/activities-en.ehtml>
22. Ryvarden L, Gilbertsson RL. European Polypores. Synopsis fungorum 6. Oslo: Fungiflora; 1993. 387 p.
23. Tokareva OV, Mashkova BL, Puzrina N. Pest management in forests of eastern Europe. Manual. Kyiv: NULES of Ukraine; 2022. 426 p.
24. Verekar SA, Gupta MK, Deshmukh SK. *Fomitopsis betulina* a rich source of diverse bioactive metabolites. In: Sridhar KR, Deshmukh SK editors. *Advances in macrofungi. Pharmaceuticals and cosmeceuticals*. Boca Raton: CRC Press; 2021. p. 22-66. DOI: [10.1201/9781003191278](https://doi.org/10.1201/9781003191278)
25. Lemieszek MK, Langner E, Kaczor J, Kandefer-Szerszeń M, Sanecka B, Mazurkiewicz W, et al. Anticancer effect of fraction isolated from medicinal Birch polypore mushroom, *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetideae): *in vitro* studies. *Int J Med Mushrooms.* 2009;11(4):351-64. DOI: [10.1615/IntJMedMushr.v11.i4.20](https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v11.i4.20)

- 26.Grienke U, Zöll M, Peintner U, Rollinger JM. European medicinal polypores – a modern view on traditional uses. *J Ethnopharmacol.* 2014;154(3):564-83. DOI: [10.1016/j.jep.2014.04.030](https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.030)
- 27.Hobbs C. *Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing, & Culture* (Herbs and Health Series). Botanica Press; 2002. 251 p.
- 28.Semerďžieva M, Veselský J. *Léčivé houby dříve a nyní*. Praha: Academia; 1986. 177 p.
- 29.Stamets P. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Berkeley: Ten Speed Press; 1993. 554 p.
- 30.Peintner U, Poder R, Pumpel T. The iceman's fungi. *Mycol Res.* 1998;102(10):1153-62. DOI: [10.1017/S0953756298006546](https://doi.org/10.1017/S0953756298006546)
- 31.Papp N, Rudolf K, Bencsik T, Czégényi D. Ethnomycological use of *Fomes fomentarius* (L.) Fr. and *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. in Transylvania, Romania. *Genet Resour Crop Evol.* 2017;64:101-11. DOI: [10.1007/s10722-015-0335-2](https://doi.org/10.1007/s10722-015-0335-2)
- 32.Sun C. *Studies on chemical constituents of four higher fungi [thesis].*, Hefei: Anhui University of Chinese Medicine; 2015.
- 33.Cyranka M, Grąż M, Kaczor J, Kandefer-Szerszeń M, Walczak K, Kapka-Skrzypczak L, et al. Investigation of antiproliferative effect of ether and ethanol extracts of Birch polypore medicinal mushroom, *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes) *in vitro* grown mycelium. *Int J Med Mushrooms.* 2011;13(6):525-33. DOI: [10.1615/IntJMedMushr.v13.i6.40](https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v13.i6.40)
- 34.Harms M, Lindequist U, Al-Resly Z, Wende K. Influence of the mushroom *Piptoporus betulinus* on human keratinocytes. *Planta Medica.* 2013;79(13):PC4. DOI: [10.1055/s-0033-1351998](https://doi.org/10.1055/s-0033-1351998)
- 35.Kozarski M, Klaus A, Jakovljevic D, Todorovic N, Vunduk J, Petrović P, et al. Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules.* 2015 Oct 27;20(10):19489-525. DOI: [10.3390/molecules201019489](https://doi.org/10.3390/molecules201019489)
- 36.Vunduk J, Klaus A, Kozarski M, Petrovic P, Zizak Z, Nikšić M, et al. Did the Iceman know better? Screening of the medicinal properties of the Birch polypore

- medicinal mushroom, *Piptoporus betulinus* (Higher Basidiomycetes). Int J Med Mushrooms. 2015;17(12):1113-25. DOI: [10.1615/intjmedmushrooms.v17.i12.10](https://doi.org/10.1615/intjmedmushrooms.v17.i12.10)
37. Szymański M, Smolibowska J, Szymański A. An investigation into the relationships between antioxidant activity and chemical elements as well as polyphenolics in fungal fruiting bodies growing on *Betula* L. J Elem. 2019;24(1):193-205. DOI: [10.5601/jelem.2018.23.2.1412](https://doi.org/10.5601/jelem.2018.23.2.1412)
38. Reis FS, Pereira E, Barros L, Sousa MJ, Martins A, Ferreira IC. Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value. Molecules. 2011 May 25;16(6):4328-38. DOI: [10.3390/molecules16064328](https://doi.org/10.3390/molecules16064328)
39. Krupodorova T, Barshteyn V, Gafforov Y, Rašeta M, Zaichenko T, et al. Comparative evaluation of free radical scavenging activity and total metabolite profiles among 30 macrofungi species. Bioresour Bioprocess. 2025;12(13). DOI: [10.1186/s40643-025-00841-4](https://doi.org/10.1186/s40643-025-00841-4)
40. Сирчін СО, Гродзинська ГА. Оцінка антиоксидантної активності деяких дикорослих макроміцетів. Укр. ботан. журн. 2015;72(3):257-60. DOI: [10.15407/ukrbotj72.03.257](https://doi.org/10.15407/ukrbotj72.03.257)
41. Sułkowska-Ziaja K, Muszyńska B, Motyl P, Pasko P, Ekiert H. Phenolic compounds and antioxidant activity in some species of polyporoid mushrooms from Poland. Int J Med Mushrooms. 2012;14(4):385-93. DOI: [10.1615/IntJMedMushr.v14.i4.60](https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v14.i4.60)
42. Михайлова О.Б. Біотехнологічні основи регуляції біосинтетичної активності лікарських макроміцетів за допомогою екологічно безпечних фізичних факторів [дисертація]. Київ: НТУУ «КПІ ім. Ігоря Сікорського»; 2025. 527 с.
43. Kamo T, Asanoma M, Shibata H, Hirota M. Anti-inflammatory lanostane-type triterpene acids from *Piptoporus betulinus*. J Nat Prod. 2003;66:1104-6. DOI: [10.1021/np0300479](https://doi.org/10.1021/np0300479)
44. Wangun HVK, Berg A, Hertel W, Nkengfack AE, Hertweck C. Anti-inflammatory and anti-hyaluronate lyase activities of lanostanoids from *Piptoporus betulinus*. J Antibiot. 2004;57:755-8. DOI: [10.7164/antibiotics.57.755](https://doi.org/10.7164/antibiotics.57.755)

45. Alresly Z. Chemical and pharmacological investigations of *Fomitopsis betulina* (formerly: *Piptoporus betulinus*) and *Calvatia gigantea* [dissertation]. Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt University Greifswald; 2019. 220 p. DOI: [10.13140/RG.2.2.27835.54561](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27835.54561)
46. Alresly Z, Lindequist U, Lalketal M. Bioactive triterpenes from the fungus *Piptoporus betulinus*. Rec. Nat. Prod. 2016;10(1):103-8.
47. Dresch P, D'Aguanno MN, Rosam K, Grienke U, Rollinger JM, Peintner U. Fungal strain matters: colony growth and bioactivity of the European medicinal polypores *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola* and *Piptoporus betulinus*. AMB Express. 2015 Jan 24;5(4). DOI: [10.1186/s13568-014-0093-0](https://doi.org/10.1186/s13568-014-0093-0)
48. Suay I, Arenal F, Asensio FJ, Basilio A, Cabello MA, Díez MT, et al. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. Antonie Van Leeuwenhoek. 2000 Aug;78(2):129-39. DOI: [10.1023/A:1026552024021](https://doi.org/10.1023/A:1026552024021)
49. Krupodorova TA. Barshteyn VYu, Pokas OV. Antagonistic effectiveness of Macromycetes against *Candida albicans* strains and *Issatchenkia orientalis*. Nova Biotechnol Chim. 2021;20(1): e760. DOI: [10.36547/nbc.760](https://doi.org/10.36547/nbc.760)
50. Krupodorova T, Barshteyn V, Kizitska T, Ratushnyak V, Blume Y. Antagonistic activity of selected macromycetes against two harmful micromycetes Czech Mycol. 2023;75(1):85-100. DOI: [10.33585/cmy.75106](https://doi.org/10.33585/cmy.75106)
51. Piętka J, Grzywacz A. Attempts at active protection of *Inonotus obliquus* by inoculating birches with its mycelium. Acta Mycol. 2006;41(2):305-12. DOI: [10.5586/am.2006.031](https://doi.org/10.5586/am.2006.031)
52. Wasyl A. Evaluation of neurotrophic properties of ethanol and ether extracts from polyporous bracket fungi *Piptoporus betulinus* (Bull. Ex Fr.) P. Karst *in vitro* model [dissertation]. Lublin: Maria Curie-Skłodowska University; 2006.
53. Keller C, Maillard M, Keller J, Hostettmann K. Screening of European fungi for antibacterial, antifungal, larvicidal, molluscicidal, antioxidant and free-radical scavenging activities and subsequent isolation of bioactive compounds. Pharm Biol. 2002 Sept 29;40(7):518-25. DOI: [10.1076/phbi.40.7.518.14680](https://doi.org/10.1076/phbi.40.7.518.14680)

54. Pleszczyńska M, Wiater A, Siwulski M, Lemieszek MK, Kunaszewska J, Kaczor J et al. Cultivation and utility of *Piptoporus betulinus* fruiting bodies as a source of anticancer agents. World J Microbiol Biotechnol. 2016;32:151. DOI: [10.1007/s11274-016-2114-4](https://doi.org/10.1007/s11274-016-2114-4)
55. Shang J, Yan S, Wang Q. Degradation mechanism and chemical component changes in *Betula platyphylla* wood by wood-rot fungi. BioRes. 2013;8(4):6066-77. DOI: [10.15376/biores.8.4.6066-6077](https://doi.org/10.15376/biores.8.4.6066-6077)
56. Valášková V, Baldrian P. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* – production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. Microbiology. 2006;152(12):3613-22. DOI: [10.1099/mic.0.29149-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.29149-0)
57. Valášková V, Baldrian P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. Res Microbiol. 2006;157(2):119-24. DOI: [10.1016/j.resmic.2005.06.004](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.06.004)
58. Reh U, Kraepelin G, Lamprecht I. Use of differential scanning calorimetry of structural analysis of fungally degraded wood. Appl Environ Microbiol. 1986;52(5):1101-6. DOI: [10.1128/AEM.52.5.1101-1106.1986](https://doi.org/10.1128/AEM.52.5.1101-1106.1986)
59. Krupodorova T, Barshteyn V, Ivanova T. Screening of extracellular enzymatic activity of macrofungi. J Microbiol Biotechnol Food Sci. 2014;3(4): 315-8.
60. Ka K-H, Ryu S-R, Lee B-H, Yoon K-H, Bak W-C. Log cultivation of the birch fungus *Piptoporus betulinus* using *Betula davurica*. Korean J Mycol. 2008;36(1):98-100. DOI: [10.4489/KJM.2008.36.1.098](https://doi.org/10.4489/KJM.2008.36.1.098)
61. Du Z, Hu Z, Kang X, Li J, Wang X, Wang X. Preliminary exploration of domestication and cultivation of wild *Fomitopsis betulina*. Edible Med Mushrooms. 2019;27:411-3.
62. Ломберг МЛ. Лікарські макроміцети у поверхневій та глибинній культурі [дисертація]. Київ: Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного; 2005. 231 с.
63. Передуга О, Плужник А, Джаган В. Вплив агаризованих поживних середовищ різного складу на ріст та морфологію колоній деяких

- дереворуйнівних грибів. В: «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя / Advancements in life sciences»: збірник тез XXI Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених; 2024 Квіт 24-26; Київ. Київ: СПОЛОМ; 2024. с. 274-8.
- 64.Badalyan SM., Sakeyan CZ. Morphological, physiological, and growth characteristics of mycelia of several wood-decaying medicinal mushrooms (Aphyllphoromycetideae). *Int J Med Mushrooms*. 2004;6(4):347-60. DOI: [10.1615/IntJMedMushr.v6.i4.50](https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v6.i4.50)
 - 65.Krupodorova T, Barshteyn V. Alternative substrates for higher mushrooms mycelia cultivation. *J BioSci Biotechnol*. 2015;3:339-47. DOI: [10.69085/jbb20153339](https://doi.org/10.69085/jbb20153339)
 - 66.Baldrian P, Gabriel J. Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*. *Mycologia*. 2002;94(3):428-36. DOI: [10.2307/3761777](https://doi.org/10.2307/3761777)
 - 67.Petre CV, Tănase C. Culture characteristics of 20 lignicolous basidiomycetes species that synthesize volatile organic compounds. *Analele Științifice ale Universității «Al. I. Cuza» Iași s. II a. Biol. vegetală*. 2013;59(2):37-57.
 - 68.Badalyan SM, Gharibyan NG. Characteristics of mycelial structures of different fungal collections – Yerevan: YSU Press; 2017. 176 p.
 - 69.Lomberh ML, Solomko EF, Buchalo1 AS, Kirchhoff B. Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures. In: Sánchez et al. (editors).Conference: The 4th Intern. Confer. Mushroom Biology and Mushroom Products; 2002; Cuernavaca, Mexico. Cuernavaca: 2002. p. 367-78.
 - 70.Bisko N, Lomberg M, Mykhaylova O, Mytropolska N. IBK Mushroom Culture Collection. Version 1.8., The IBK Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany, Kyiv. GBIF [databases on the Internet]. Hosted by GBIF Norway: 2024 Feb 24; [cited: 2025 March 28]. Available from: <https://www.gbif.org/dataset/148aefb6-cf88-443e-9780-b774ef7333e7>
DOI: [10.15468/dzdsqu](https://doi.org/10.15468/dzdsqu)

- 71.Бухало АС, Дзигун ЛП, Ліновицька ВМ. Виділення вищих базидіоміцетів, перспективних продуцентів біологічно активних речовин, у чисту культуру і їх довготривале зберігання. Наукові вісті НТУУ "КПІ". 2013;3:12-7.
- 72.Pluzhnyk AV, Petlovana VR, Dzhagan VV. Rapid and efficient method for DNA extraction from fungi of the genus *Morchella* Dill. ex Pers. Mikrobiol Z. 2025;87(1):47-53. DOI: [10.15407/microbiolj87.01.047](https://doi.org/10.15407/microbiolj87.01.047)
- 73.White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. London: Academic Press; 1990. pp 315-22.
- 74.National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 1988 [cited 2025 April 13]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 75.Robert V, Stegehuis G, Stalpers J. International Mycological Association (IMA) and the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. The MycoBank engine and related databases [Internet]. 2005 [cited 2025 April 2]. Available from: <https://www.mycobank.org/>
- 76.Weis AL, Solomko EF, Buchalo AS, Wasser SP, Mitropolskaya NYu, Grigansky AP, Gorovits EL. Cultural study and illudin S production of medicinal mushroom *Omphalotus olearius* (DC.Fr.) Fay. (Agaricales s.l.) from Israel. Int J Med Mushrooms. 1999;1(1):93-103. DOI: [10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i1.80](https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i1.80)
- 77.Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956;28(3):350-6. DOI: [10.1021/ac60111a017](https://doi.org/10.1021/ac60111a017)
- 78.Badalyan SM, Innocenti G, Garibyan NG. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. Phytopathol Mediterr. 2002 Dec;41(3):220-5.

- 79.Badalyan SM, Innocenti G, Garibyan NG. Interactions between xylotrophic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments. *Phytopathol Mediterr.* 2004;43(3):44-8.
- 80.Singh J, Tripathi NN. Inhibition of storage fungi of black gram (*Vigna mungo*) by some essential oils. *Flavour Fragr J.* 1999;14:1-4. DOI: [10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199901/02\)14:1%3C1::AID-FFJ735%3E3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199901/02)14:1%3C1::AID-FFJ735%3E3.0.CO;2-R)
- 81.Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958 Apr 26;181:1199-200. DOI: [10.1038/1811199a0](https://doi.org/10.1038/1811199a0)
- 82.Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16(3):144-58. DOI: [10.5344/ajev.1965.16.3.144](https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144)
- 83.Guthmann J. Heilende Pilze: Die Wichtigsten Arten der Welt im Porträt. 2nd ed. Wiebelsheim: Quelle & Meyer Verlag; 2016. 446 p.
- 84.Gründemann C, Reinhardt JK, Lindequist U. European medicinal mushrooms: do they have potential for modern medicine? An update. *Phytomedicine.* 2019;66:153131. DOI: [10.1016/j.phymed.2019.153131](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153131)
- 85.Khalilov Q, Li L, Liu Y, Tohtahon Z, Chen X, Aisa HA, Yuan T. Piptolinic acids F-J, five new lanostane-type triterpenoids from *Piptoporus betulinus*. *Nat Prod Res.* 2018;33(21):3044-51. DOI: [10.1080/14786419.2018.1516218](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1516218)
- 86.Sofrenić I, Anđelković B, Todorović N, Stanojković T, Vujisić L, Novaković M, et al. Cytotoxic triterpenoids and triterpene sugar esters from the medicinal mushroom *Fomitopsis betulina*. *Phytochem.* 2021 Jan;181(112580). DOI: [10.1016/j.phytochem.2020.112580](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112580)
- 87.Tohtahon Z, Xue J, Han J, Liu Y, Hua H, Yuan T. Cytotoxic lanostane triterpenoids from the fruiting bodies of *Piptoporus betulinus*. *Phytochem.* 2017 Nov;143:98-103. DOI: [10.1016/j.phytochem.2017.07.013](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.07.013)
- 88.Weber LA, Puff C, Kalbitz J, Kietzmann M, Feige K, Bosse K, Rohn K, Cavalleri JV. Concentration profiles and safety of topically applied betulinic acid and NVX-207 in eight healthy horses – A randomized, blinded, placebo-controlled,

- crossover pilot study. *J Vet Pharmacol Ther.* 2020;44(1):47-57. DOI: [10.1111/jvp.12903](https://doi.org/10.1111/jvp.12903)
89. de Jesus LI, Smiderle FR, Ruthes AC, Vilaplana F, Dal'Lin FT, Maria-Ferreira D, Werner MF, Van Griensven L, Iacomini M. Chemical characterization and wound healing property of a β -D-glucan from edible mushroom *Piptoporus betulinus*. *Int J Biol Macromol.* 2018;117:1361-6. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2017.12.107](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.107)
90. Wiater A, Paduch R, Pleszczyńska M, Próchniak K, Choma A, Kandefer-Szerszeń M, Szczodrak J. α -(1 $\rightarrow$ 3)-D-Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. *Biotechnol Lett.* 2001;33:787-95. DOI: [10.1007/s10529-010-0502-7](https://doi.org/10.1007/s10529-010-0502-7)
91. Krupodorova T, Barshteyn V, Tsygankova V, Sevindik M, Blume Y. Strain-specific features of *Pleurotus ostreatus* growth in vitro and some of its biological activities. *BMC Biotechnol.* 2024 Feb 8;24(1):9. DOI: [10.1186/s12896-024-00834-9](https://doi.org/10.1186/s12896-024-00834-9)
92. Mensah D, Obodai M. Morphological characteristics of mycelial growth of two strains of the indigenous medicinal mushroom, *Lentinus squarrosulus* Mont. (Singer), on solid media. *Afr J Agric Res.* 2014;9(23):1753-60. DOI: [10.5897/AJAR2013.8340](https://doi.org/10.5897/AJAR2013.8340)
93. Дзигун ЛП, Дуган ОМ. Вплив умов культивування на ріст ксилотрофних базидіоміцетів *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. та *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill. Вісник аграрної науки Причорномор'я. 2012;1:178-85.
94. Ліновицька ВМ, Бухало АС, Швед ОМ, Дуган ОМ. Створення біотехнології отримання екзополісахаридів на основі глибинного культивування вищого базидіоміцету *Schizophyllum commune*. Вісник НУ «Львівська політехніка». 2011;700:161-72.
95. Бухало АС, Ліновицька ВМ. Культивування вищого базидіального гриба *Schizophyllum commune* на агаризованих поживних середовищах. Наукові вісті НТУУ «КПІ». 2014;95(3):7-11.

96. Badalyan SM, Gharibyan NG, Iotti M, Zambonelli A. Morphological and ecological screening of different collections of medicinal white-rot bracket fungus *Ganoderma adspersum* (Schulzer) Donk (Agaricomycetes, Polyporales). Ital J Mycol. 2019;48:1-15. DOI: [10.6092/issn.2531-7342/9092](https://doi.org/10.6092/issn.2531-7342/9092)
97. Badalyan S, Gharibyan N, Gianchino C, Iotti M, Zambonelli A. Morphological observation and biomass formation in different edible medicinal *Morchella* collections (Pezizomycetes, Ascomycota). Ital J Mycol. 2023;52(1):50-61. DOI: [10.6092/issn.2531-7342/16112](https://doi.org/10.6092/issn.2531-7342/16112)
98. Miros S, Koocherov V, Bilokon S, Sechnyak A. Stability of basidiomycete strains when preserved in a collection. Food science and technology. 2020;14(1):39-45. DOI: [10.15673/fst.v14i1.1647](https://doi.org/10.15673/fst.v14i1.1647)
99. Adams T. *Piptoporus betulinus*: some aspects of population biology [thesis]. Exeter: University of Exeter; 1982. 246 p.
100. **Kizitska TO**, Barshteyn VYu, Ratuchnuak VV, Krupodorova TA. Isolation of macromycete *Fomitopsis betulina* strains – potential producer of biologically active substances. In: Mankovska O, Papuga O, Nesterenko Ye, Sobolevskiy M, Antonenko S, editors. The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology; 2022 June 15-17; Kyiv, Ukraine. Kyiv: IMBG of NAS of Ukraine; 2022. p. 39.
101. **Кізіцька ТО**, Круподьорова ТА, Ратушняк ВВ, Барштейн ВЮ. Особливості морфології штамів *Fomitopsis betulina* на агаризованих поживних середовищах. В: «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XVIII Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених, 2024 Трав 17; Київ. Київ: КПП ім. Ігоря Сікорського, 2024. с. 102-4.
102. Krupodorova T, Barshteyn V, Al-Maali G, Sevindik M. Requirements for vegetative growth of *Hohenbuehelia myxotricha* and its antimycotic activity. Pol J Natur Sc. 2022;7(1):75-92.
103. Guadarrama-Mendoza PC, del Toro GV, Ramírez-Carrillo R, Robles-Martínez F, Yáñez-Fernández J, Garín-Aguilar ME, et al. Morphology and mycelial growth

- rate of *Pleurotus* spp. strains from the Mexican mixtec region. Braz J Microbiol. 2014; 45(3):861-72. DOI: [10.1590/s1517-83822014000300016](https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000300016)
104. Dzhagan V, Krupodorova T, Atamanchuk A, Lytvynenko Y, Dzhagan V. Growth and morphological characteristics of some pyrophilous discomycetes in culture. Biosyst Divers. 2023;31(3):282-9. DOI: [10.15421/012332](https://doi.org/10.15421/012332)
 105. Krupodorova T, Barshteyn V, Sekan A. Review of the basic cultivation conditions influence on the growth of basidiomycetes. Curr Res Environ Appl Mycol J Fungal Biol. 2021;1:494-531. DOI: [10.5943/cream/11/1/34](https://doi.org/10.5943/cream/11/1/34)
 106. Jaros D, Köbsch J, Rohm H. Exopolysaccharides from Basidiomycota: Formation, isolation and techno-functional properties. Eng Life Sci. 2018;18(10):743-52. DOI: [10.1002/elsc.201800117](https://doi.org/10.1002/elsc.201800117)
 107. Osemwegie OO, Adetunji CO, Ayeni EA, Adejobi OI, Arise RO, Nwonuma CO, Oghenekaro AO. Exopolysaccharides from bacteria and fungi: current status and perspectives in Africa. Heliyon. 2020;6(6):e04205. DOI: [10.1016/j.heliyon.2020.e04205](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04205)
 108. Osińska-Jaroszuk M, Jarosz-Wilkolazka A, Jaroszuk-Ściśeł J, Szaląpata K, Nowak A, Jaszek M, et al. Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. World J Microbiol Biotechnol. 2015;31:1823-44. DOI: [10.1007/s11274-015-1937-8](https://doi.org/10.1007/s11274-015-1937-8)
 109. Hamidi M, Okoro OV, Milan PB, Khalili MR, Samadian H, Nie L, Shavandi A. Fungal exopolysaccharides: Properties, sources, modifications, and biomedical applications. Carbohydr Polym. 2022;284:119152. DOI: [10.1016/j.carbpol.2022.119152](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119152)
 110. Stoica RM, Moscovici M, Lakatos ES, Cioca LI. Exopolysaccharides of fungal origin: Properties and pharmaceutical applications. Processes. 2023;11(2):335. DOI: [10.3390/pr11020335](https://doi.org/10.3390/pr11020335)
 111. Lee BC, Bae JT, Pyo HB, Choe TB, Kim SW, Hwang HJ, Yun JW. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides

- by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzym Microb Technol.* 2004;35(5):369-76. DOI: [10.1016/j.enzmictec.2003.12.015](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.015)
112. Tavares AP, Agapito MS, Coelho MA, Lopes da Silva JA, Barros-Timmons A, Coutinho JA, Xavier AM. Selection and optimization of culture medium for exopolysaccharide production by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2005;21:1499-507. DOI: [10.1007/s11274-005-7370-7](https://doi.org/10.1007/s11274-005-7370-7)
113. Lin ES, Sung SC. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Int J Food Microbiol.* 2006;108(2):182-7. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.010](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.010)
114. Maziero R, Cavazzoni V, Bononi V L R Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Revista de Microbiologia.* 1999;30:77-84. DOI: [10.1590/S0001-37141999000100015](https://doi.org/10.1590/S0001-37141999000100015)
115. Sasidhara R, Bakki V, Thirunalas T Screening of some basidiomycetes for useful polysaccharides. *Mushroom Reseach.* 2011;20(2):83-6.
116. Rajput Y, Shit S, Shukla A, Gupta S, Shukla K Screening for exopolysaccharide production from basidiomycetes of Chhattisgarh. *CCCRENT Botany* 2011, 2(10):11-14.
117. Umeo SH, Souza GP, Rapachi PM, Garcia DM, Paccola-Meirelles LD, Valle JS, et al. Screening of basidiomycetes in submerged cultivation based on antioxidant activity. *Genet Mol Res.* 2015;14(3):9907-14.
118. Montoya S, Sánchez ÓJ, Levin L. Polysaccharide Production by Submerged and Solid-State Cultures from Several Medicinal Higher Basidiomycetes. *Int J Med Mushrooms.* 2013,15(1): 71-9. DOI: [10.1615/IntJMedMushr.v15.i1.80](https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v15.i1.80)
119. Asadi F, Barshan-Tashnizi M, Hatamian-Zarmi A, Davoodi-Dehaghani F, Ebrahimi-Hosseinzadeh B. Enhancement of exopolysaccharide production from *Ganoderma lucidum* using a novel submerged volatile co-culture system. *Fungal Biol.* 2021;125(1):25-31. DOI: [10.1016/j.funbio.2020.09.010](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.09.010)
120. Tabibzadeh F, Alvandi H, Hatamian-Zarmi A, Kalitukha L, Aghajani H, Ebrahimi-Hosseinzadeh B. Antioxidant activity and cytotoxicity of

- exopolysaccharide from mushroom *Heridium coralloides* in submerged fermentation. Biomass Conv Bioref. 2022;14:26953-63 DOI: [10.1007/s13399-022-03386-0](https://doi.org/10.1007/s13399-022-03386-0)
121. Wu C-Y, Liang Z-C, Lu C-P, Wu S-H. Effect of carbon and nitrogen sources on the production and carbohydrate composition of exopolysaccharide by submerged culture of *Pleurotus citrinopileatus*. J Food Drug Anal. 2008;16(2):6. DOI: [10.38212/2224-6614.2364](https://doi.org/10.38212/2224-6614.2364)
 122. Bolla K, Gopinath BV, Shaheen Syed Zeenat, Singara Charya MA. Optimization of carbon and nitrogen sources of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Trametes versicolor*. Int J Biotechnol Mol.Biol Res. 2010;1(2):15-21.
 123. Evans JD. Straightforward statistics for the behavioral sciences. Pacific Grove: Brooks/Cole Pub. Co.; 1996. 600 p.
 124. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2nd ed. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Publisher; 1988. 567 p.
 125. Mykchaylova O, Dubova H, Lomberg M, Negriyko A, Poyedinok N. Influence of low-intensity light on the biosynthetic activity of the edible medicinal mushroom *Heridium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. *in vitro*. Arch Biol Sci. 2023;75(4):489-501. DOI: [10.2298/ABS230821040M](https://doi.org/10.2298/ABS230821040M)
 126. Kim YR. Production of polysaccharide by the edible mushroom, *Grifola frondosa*. Mycobiology. 2003;31(4):205-8.
 127. Elisashvili V. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (Review). Int J Med Mushrooms. 2012;14(3):211-39. DOI: [10.1615/intjmedmushr.v14.i3.10](https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v14.i3.10)
 128. Bisko N, Mustafin K, Al-Maali G, Suleimenova Z, Lomberg M, Narmuratova Z, Mykchaylova O, Mytropolska N, Zhakipbekova A. Effects of cultivation parameters on intracellular polysaccharide production in submerged culture of the edible medicinal mushroom *Lentinula edodes*. Czech Mycol. 2020;72(1):1-17. DOI: [10.33585/cmy.72101](https://doi.org/10.33585/cmy.72101)

129. Narmuratova Zh, Bisko N, Mustafin K, Al-Maali G, Kerner A, Bondaruk S, et al. Biological activity of edible medicinal mushrooms of the genus *Hericium*. Turk J Biochem. 2023;48(3):290-7. DOI: [10.1515/tjb-2022-0235](https://doi.org/10.1515/tjb-2022-0235)
130. Schlößer R, Bien S, Bußkamp J, Langer GJ, Langer EJ. On the lookout for a potential antagonist against *Cryptostroma corticale* – an insight through *in vitro* dual culture studies. Front For Glob Change. 2025;7:1518972. DOI: [10.3389/ffgc.2024.1518972](https://doi.org/10.3389/ffgc.2024.1518972)
131. Atamanchuk A, Bisko N, Al-Mali G. Antagonistic activity of wood-inhabiting *Xylaria* species against other fungi in dual culture experiments. J Microbiol Biotech Food Sci. 2024;14(1):e9529. DOI: [10.55251/jmbfs.9529](https://doi.org/10.55251/jmbfs.9529)
132. Медведєв ДГ. Біологія деяких видів роду *Hypomyces* (Fr.) Tul. & C. Tul. та його анаморф *Cladobotryum* – збудників павутинної цвілі печериці в Україні [дисертація]. Київ: Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного; 2020. 184 с.
133. Yu G, Sun Y, Han H, Yan X, Wang Y, Ge X, et al. Coculture, an efficient biotechnology for mining the biosynthesis potential of macrofungi via interspecies interactions. Front Microbiol. 2021;12:663924. DOI: [10.3389/fmicb.2021.663924](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663924)
134. Круподьорова ТА, Барштейн ВЮ. Антагоністична активність макроміцетів проти *Mucor* sp. IFBG 139. Мікробіологія і біотехнологія. 2019;2:65-75. DOI: [10.18524/2307-4663.2019.2\(46\).166485](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2(46).166485)
135. Santos M, Diáñez F, Moreno-Gavíra A, Sánchez-Montesinos B, Gea FJ. *Cladobotryum mycophilum* as potential biocontrol agent. Agronomy. 2019;9:891. DOI: [10.3390/agronomy9120891](https://doi.org/10.3390/agronomy9120891)
136. Zuo B, Lu BH, Liu XL, Wang Y, Ma GL, Gao J. First report of *Cladobotryum mycophilum* causing cobweb on *Ganoderma lucidum* cultivated in Jilin Province. China Plant Dis. 2016;100(6):1239. DOI: [10.1094/pdis-12-15-1431-pdn](https://doi.org/10.1094/pdis-12-15-1431-pdn)
137. Wang GZ, Guo MP, Bian YB. First report of *Cladobotryum protrusum* causing cobweb disease on the edible mushroom *Coprinus comatus*. Plant Dis. 2015;99(2):287. DOI: [10.1094/pdis-07-14-0757-pdn](https://doi.org/10.1094/pdis-07-14-0757-pdn)

138. Wu XY, Li Y. First Report of cobweb disease caused by *Cladobotryum mycophilum* on cultivated Shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) in China. Plant Dis. 2020;104(2). DOI: [10.1094/PDIS-07-19-1434-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1434-PDN)
139. Wang Y, Li S, Wang L, Zhao Q, Bai M, Naicker O, Li Q, Zhang C. Cobweb disease on *Morchella sextelata* caused by *Hypomyces* spp. in Sichuan province, China. Crop Protection. 2024;180: 106656. DOI: [10.1016/j.cropro.2024.106656](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106656)
140. Peng K, Lin M, Yuan X, Li C, Zeng X, Tian F, et al. Identification and fungicides sensitivity evaluation of the causal agent of cobweb disease on *Lyophyllum decastes* in China. BMC microbiology. 2024;24(1):180. DOI: [10.1186/s12866-024-03326-0](https://doi.org/10.1186/s12866-024-03326-0)
141. Navale V, Vamkudoth KR, Ajmera S, Dhuri V. *Aspergillus* derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity. Toxicology reports. 2021;8:1008-30. DOI: [10.1016/j.toxrep.2021.04.013](https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.04.013)
142. Machado M, Fortún J, Patricia Muñoz P. Invasive aspergillosis: A comprehensive review. Medicina Clínica. 2024;163(4): 189-98. DOI: [10.1016/j.medcli.2024.01.045](https://doi.org/10.1016/j.medcli.2024.01.045)
143. Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, Larsen TO, Frisvad JC. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. Anal Bioanal Chem. 2009;395(5):1225-42. DOI: [10.1007/s00216-009-3081-5](https://doi.org/10.1007/s00216-009-3081-5)
144. **Кізіцька ТО**, Круподьорова ТА, Барштейн ВЮ, Сабібін ОВ. Антагоністична активність штамів *Fomitopsis betulina* відносно *Cladobotrium mycophillum* та *Aspergillus fumigatus*. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Хохленкова НВ, Калюжная ОС, Двінських НВ, редактори. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали II міжнародної наук.-практ. інтернет-конф.; 2022 Трав 20; Харків. Х.: НФаУ, 2022. с. 127-8.
145. **Кізіцька ТО**, Круподьорова ТА, Барштейн ВЮ, Ратушняк ВВ. Антагоністична активність штамів *Fomitopsis betulina* відносно *Penicillium polonicum*. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Хохленкова НВ, Калюжная ОС, Двінських НВ, редактори. Проблеми та досягнення сучасної

- біотехнології: матеріали III міжнародної наук.-практ. інтернет-конф.; 2023 Берез 24; Харків. Х.: НФаУ, 2023. с. 200-2.
146. Muhammad STF, Aftab A, Akbar N, Khaliq S, Sajjad A, Kakar MA, et al. Extraction, isolation and chemical characterization of pigments from *Penicillium* species. Pak Euro Journal of Medical and Life Sciences. 2021;4(3):59-69.
 147. Пасайлюк М, Пліхтяк Л. Антагоністичні взаємодії деяких макроміцетів та *Penicillium* sp. (*Aspergillaceae*) в культурі. Нотатки сучасної біології. 2022;2(4):36-40. DOI: [10.29038/2617-4723-2022-2-7](https://doi.org/10.29038/2617-4723-2022-2-7)
 148. **Зайченко ТО.** Антагоністична активність окремих макроміцетів відносно деяких фітопатогенних грибів у дуальній культурі. В: Біологія рослин та біотехнології: збірка тез V конференції молодих учених; 2025 Трав 15-16; Київ. К.: ДУ «ІХБГ НАНУ», 2025. с. 60.
 149. **Кізіцька ТО,** Круподьорова ТА. Антагоністична активність штамів *Fomitopsis betulina* відносно рослинних патогенів *Microdochium nivale* та *Fusarium poae*. В: Біологія рослин та біотехнології: збірка тез IV конференції молодих учених; 2024 Трав 16-18; Київ. Київ: ДУ «ІХБГ НАНУ»; 2024. с. 59.
 150. Кізіцька Т. Антифунгальна активність макроміцетів проти *Candida krusei*. В: Матеріали VII Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»; 2018 Листоп 29–30; Київ. Київ: НУБіП; 2018. с. 174-5.
 151. Pasailiuk MV, Sukhomlyn MM, Gryganskyi AP. Patterns of *Hericium coralloides* growth with competitive fungi. Czech Mycol. 2019;71(1):49-63. DOI: [10.33585/cmy.71104](https://doi.org/10.33585/cmy.71104)
 152. Bal T, Raj J, Richter DL. Influence of Chaga (*Inonotus obliquus*) treatment of wood in decay tests. Curr Res Environm Appl Mycol J Fungal Biol. 2019;9(1):85-91. DOI: [10.5943/cream/9/1/9](https://doi.org/10.5943/cream/9/1/9)
 153. Юсипович ЮМ, Ковальова ВА, Гут РТ. Діагностика кореневої губки (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s.str.) методом полімеразно-ланцюгової реакції. Науковий вісник НЛТУ України. 2012;22.6:43-9.

154. Napierała-Filipiak A, Werner A. Antagonism of higher fungi to *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. in laboratory conditions. Dendrobiology. 2000;45:65-81.
155. Woodward S, Sultan HY, Barrett DK, Pearce RB. Two new antifungal metabolites produced by *Sparassis crispa* in culture and in decayed trees. J Gen Microbiol. 1993;139:153-9. DOI: [10.1099/00221287-139-1-153](https://doi.org/10.1099/00221287-139-1-153)
156. Цвид НВ. Гастероїдні гриби в умовах культури [дисертація]. Київ: КНІ ім. Тараса Шевченка; 2020. 173 с.
157. Круподьорова Т.А. Біотехнологічні основи одержання біомаси макроміцетів порядків Agaricales та Polyporales для створення біологічно активних добавок [дисертація]. Київ: ДУ «ІХБГ НАНУ»; 2025. 523 с.
158. Alves MJ, Ferreira IC, Dias J, Teixeira V, Martins A, Pintado M. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. Planta Med. 2012 Nov;78(16):1707-18. DOI: [10.1055/s-0032-1315370](https://doi.org/10.1055/s-0032-1315370)
159. Ranadive KR, Belsare MH, Deokule SS, Jagtap NV, Harshada KJ, Vaidya JG. Glimpses of antimicrobial activity of fungi from world. J New Biol Rep. 2013;2(2):142-62.
160. Lomberg M, Krupodorova T, Krasinko V, Mykchaylova O. The antibacterial activity of culture filtrates and mycelia of selected strains of macromycetes from genus *Hericium*. Bot Serb. 2023;47(2):241-9. DOI: [10.2298/BOTSERB2302241L](https://doi.org/10.2298/BOTSERB2302241L)
161. Дзигун ЛП, Кудрінецька АВ, Дуган ОМ. Антимікробні властивості ксилотрофного базидіоміцету *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) murrill. Вісник НУ “Львівська політехніка”. 2011;700:156-60.
162. Atamanchuk A, Bisko N. Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant capacity in *Xylaria polymorpha* and *Xylaria longipes* strains. Bull T Shevchenko Nat Univ Kyiv Ser Biol. 2023;94(3):5-9. DOI: [10.17721/1728.2748.2023.94.5-9](https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.94.5-9)
163. **Kizitska T**, Barshteyn V, Sevindik M, Krupodorova T. Evaluation of *Fomitopsis betulina* strains for growth on different media and exopolysaccharide

- production. Arch Biol Sci. 2024 July 2;76(3):257-65. DOI: [10.2298/ABS240523018K](https://doi.org/10.2298/ABS240523018K)
164. Scalbert A, Andres-Lacueva C, Arita M, et al. Databases on food phytochemicals and their health-promoting effects. J Agric Food Chem. 2011 May 11;59(9):4331-48. DOI: [10.1021/jf200591d](https://doi.org/10.1021/jf200591d)
165. Sabaragamuwa R, Perera CO. Total triterpenes, polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of bioactive phytochemicals of *Centella asiatica* by different extraction techniques. Foods. 2023 Oct 30;12(21):3972. DOI: [10.3390/foods12213972](https://doi.org/10.3390/foods12213972)
166. Zhao Y, Wang Z, Fu R, Xie R, Wang B, Li Q. Structural characterization and antioxidant activity of processed polysaccharides PCP-F1 from *Polygonatum cyrtonema* Hua. Front Nutr. 2023 Sep 5;10:1272977. DOI: [10.3389/fnut.2023.1272977](https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1272977)
167. Alvandi H, Hatamian-Zarmi A, Hosseinzadeh BE, Mokhtari-Hosseini ZB, Langer E, Aghajani H. Improving the biological properties of *Fomes fomentarius* MG835861 exopolysaccharide by bioincorporating selenium into its structure. Carbohydr Polym Technol Appl. 2021 Dec 25;2:100159. DOI: [10.1016/j.carpta.2021.100159](https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100159)
168. Krupodorova T, Barshteyn V, Dzhagan V, Pluzhnyk A, Zaichenko T, Blume Y. Enhancement of antioxidant activity and total phenolic content of *Fomitopsis pinicola* mycelium extract. Fungal Biology and Biotechnology. 2024;11(18). DOI: [10.1186/s40694-024-00187-0](https://doi.org/10.1186/s40694-024-00187-0)
169. De Bruijn J, Loyola C, Aqueveque P, Cañumir J, Cortéz M, France A. Antioxidant properties of extracts obtained from *Grifola gargal* mushrooms. Micol Apl Int. vol. 2009 Jan;21(1):11-8.
170. **Zaichenko T**, Barshteyn V, Sevindik M, Krupodorova T. Antibacterial and antioxidant activities of *Fomitopsis betulina* extracts. Open Agric J. 2025 Feb 20;19:e18743315375853. DOI: [10.2174/0118743315375853250213061411](https://doi.org/10.2174/0118743315375853250213061411)
171. **Зайченко ТО**, Барштейн ВЮ, Круподьорова ТА. Вплив умов культивування базидієвого гриба *Fomitopsis betulina* на антиоксидантну

- активність його міцелію. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Хохленкова НВ, Двінських НВ, Калюжная ОС, редактори. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали V міжнародної наук.-практ. конф; 2025 Берез 28; Харків. Х.: НФаУ; 2025. с. 190-2.
172. **Зайченко ТО**, Барштейн ВЮ, Круподьорова ТА. Вплив умов культивування на синтез фенольних сполук міцелієм макроміцета *Fomitopsis betulina*. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Філімонова НІ, Кошова ОЮ, редактори. «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині»: матеріали III науково-практичної міжнародної дистанційної конференції; 2025 Берез 21; Харків. Х.: НФаУ; 2025. с. 101-3.
173. Abd El-Zaher EHF, Mostafa HAA, Shalaby E, Attia WYF. A comparative study on endopolysaccharides and exopolysaccharides production from some basidiomycetes with studying the antioxidant and anti-tumour effects of *Pleurotus ostreatus* mushroom. Egypt J Exp Biol (Zoo). 2015;11(1):1-14.
174. Osman M, Ahmed W, Hussein F, El-sayed H. Endopolysaccharides production and growth of *Flammulina velutipes* 6 under submerged conditions. J Chem Bio Phy Sci. 2014;4(4):3350-66.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті у періодичних виданнях

1. **Zaichenko T**, Barshteyn V, Sevindik M, Krupodorova T. Antibacterial and antioxidant activities of *Fomitopsis betulina* extracts. Open Agric J. 2025 Feb 20;19:e18743315375853. DOI: [10.2174/0118743315375853250213061411](https://doi.org/10.2174/0118743315375853250213061411) (Scopus Q3). (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробка результатів, написання статті).
2. **Kizitska T**, Barshteyn V, Sevindik M, Krupodorova T. Evaluation of *Fomitopsis betulina* strains for growth on different media and exopolysaccharide production. Arch Biol Sci. 2024 July 2;76(3):257-65. DOI: [10.2298/ABS240523018K](https://doi.org/10.2298/ABS240523018K) (Scopus Q3). (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, в обробці результатів та у підготовці статті).

Тези доповідей у матеріалах конференцій

1. **Зайченко ТО**. Антагоністична активність окремих макроміцетів відносно деяких фітопатогенних грибів у дуальній культурі. В: Біологія рослин та біотехнології: збірка тез V конференції молодих учених; 2025 Трав 15-16; Київ. К.: ДУ «ІХБГ НАНУ», 2025. с. 60.
2. **Зайченко ТО**, Барштейн ВЮ, Круподьорова ТА. Вплив умов культивування базидієвого гриба *Fomitopsis betulina* на антиоксидантну активність його міцелію. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Хохленкова НВ, Двінських НВ, Калюжная ОС, редактори. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали V міжнародної наук.-практ. конф; 2025 Берез 28; Харків. Х.: НФаУ; 2025. с. 190-2.
3. **Зайченко ТО**, Барштейн ВЮ, Круподьорова ТА. Вплив умов культивування на синтез фенольних сполук міцелієм макроміцета

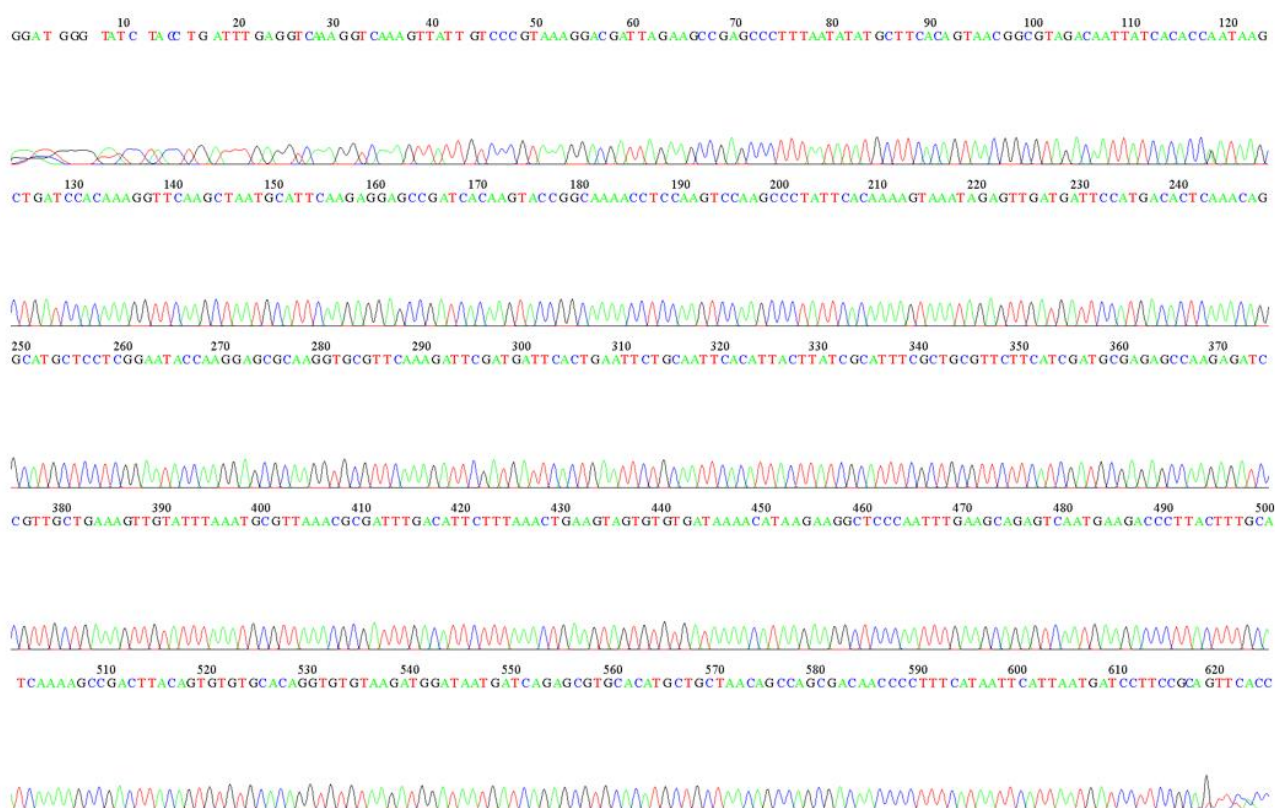
- Fomitopsis betulina*. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Філімонова НІ, Кошова ОЮ, редактори. «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині»: матеріали III науково-практичної міжнародної дистанційної конференції; 2025 Берез 21; Харків. Х.: НФаУ; 2025. с. 101-3.
4. **Кізіцька ТО**, Круподьорова ТА. Антагоністична активність штамів *Fomitopsis betulina* відносно рослинних патогенів *Microdochium nivale* та *Fusarium poae*. В: Біологія рослин та біотехнології: збірка тез IV конференції молодих учених; 2024 Трав 16-18; Київ. Київ: ДУ «ІХБГ НАНУ»; 2024. с. 59.
 5. **Кізіцька ТО**, Круподьорова ТА, Ратушняк ВВ, Барштейн ВЮ. Особливості морфології штамів *Fomitopsis betulina* на агаризованих поживних середовищах. В: «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XVIII Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених, 2024 Трав 17; Київ. Київ: КПП ім. Ігоря Сікорського, 2024. с. 102-4.
 6. **Кізіцька ТО**, Круподьорова ТА, Барштейн ВЮ, Ратушняк ВВ. Антагоністична активність штамів *Fomitopsis betulina* відносно *Penicillium polonicum*. В: Котвіцька АА, Владимірова ІМ, Хохленкова НВ, Калюжная ОС, Двінських НВ, редактори. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали III міжнародної наук.-практ. інтернет-конф.; 2023 Берез 24; Харків. Х.: НФаУ, 2023. с. 200-2.
 7. **Kizitska TO**, Barshteyn VYu, Ratuchnuak VV, Krupodorova TA. Isolation of macromycete *Fomitopsis betulina* strains – potential producer of biologically active substances. In: Mankovska O, Papuga O, Nesterenko Ye, Sobolevskiy M, Antonenko S, editors. The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology; 2022 June 15-17; Kyiv, Ukraine. Kyiv: IMBG of NAS of Ukraine; 2022. p. 39.
 8. **Кізіцька ТО**, Круподьорова ТА, Барштейн ВЮ, Сабибін ОВ. Антагоністична активність штамів *Fomitopsis betulina* відносно *Cladobotrium mycophillum* та *Aspergillus fumigatus*. В: Котвіцька АА,

Владимирова ІМ, Хохленкова НВ, Калюжная ОС, Двінських НВ, редактори.
Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали II міжнародної
наук.-практ. інтернет-конф.; 2022 Трав 20; Харків. Х.: НФаУ, 2022. с. 127-8.

ДОДАТОК Б

НУКЛЕОТИДНІ ПОСЛІДОВНОСТІ ITS РИБОСОМАЛЬНОЇ ДНК
FOMITOPSIS BETULINA
 (номер реєстрації у базі даних GENBANK – PQ184655)

File: 13 ITS4.ab1 Run Ended: 2024-07-16 23:41:14 Signal G:1175 A:1868 C:1973 T:2006
 Sample: 13 ITS4 Lane: 8 Base spacing: 14.767704 1708 bases in 21775 scans Page 1 of 2



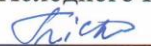
ДОДАТОК В

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ
ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАН УКРАЇНИ»
04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а
Тел./факс: (044) 463-05-32
E-mail: office.ihbt@nas.gov.ua

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ
ім. М.Г. ХОЛОДНОГО НАН УКРАЇНИ
01601, м. Київ, вул. Терещенківська, 2
Тел./факс: (044) 234-40-41
E-mail: instl@botany.kiev.ua

Акт № 5
приймання-передачі
чистих культур *Fomitopsis betulina* (березової губки)
до Колекції культур шапинкових грибів (ІВК)
Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
складений «21» квітня 2025 р.

Ми, що нижче підписалися, з однієї сторони – куратор Колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України д.б.н., професор Бісько Ніна Анатоліївна, та з іншої сторони – т.в.о. завідувача відділу рослинних харчових продуктів та біофортificaції ДУ «ІХБГ НАНУ» к.т.н. Барштейн Віктор Юрійович, склали цей акт про те, що до Колекції шапинкових грибів передано 11 штамів *Fomitopsis betulina*, інтродукованих в культуру у 2021 році Зайченко Тетяною Олександрівною, провідним інженером відділу рослинних харчових продуктів та біофортificaції ДУ «ІХБГ НАНУ». Отриманим культурам надані відповідні номери (2770-2778, 2785, 2786), вони внесені до загального списку культур електронного каталогу (<https://doi.org/10.15468/dzdsqu>). Штами передані у належному стані на сусло-агаризованому середовищі згідно з вимогами до довгострокового зберігання макроміцетів.

Куратор Колекції шапинкових грибів
Інституту ботаніки ім. М.Г.
Холодного НАН України
 / Ніна БІСЬКО

т.в.о. Завідувача відділу
ДУ «Інституту харчової біотехнології
та геноміки НАН України»
 / Віктор БАРШТЕЙН



Підпис *Бісько Н.*
Засвідчую
Відділ кадрів *Zac*



Підпис *В. Барштейн*
завідувач
вчений секретар ДУ «ІХБГ НАН України»
В. Барштейн

ДОДАТОК Г

«УЗГОДЖЕНО»

Директор ДУ «ІХБГ НАН України»,

академік НАН України



Ярослав БЛЮМ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ТОВ «ЕСМАШ-3»



Дмитро БАХЛУКОВ

АКТ

про впровадження наукової розробки
від 13.04.2025

Ми, що нижче підписались, склали цей акт про те, що результати наукових досліджень, проведені співробітниками відділу рослинних харчових продуктів та біофортificaції ДУ «ІХБГ НАН України», щодо оптимальних умов культивування лікарського гриба *Fomitopsis betulina* з метою прискорення колонізації субстрату, **впроваджено у виробничий процес підприємства «Царство грибів»** (входить до складу ТОВ «ЕСМАШ-3»), м. Київ, Україна.

Сутність впровадження:

У ході досліджень було визначено, що внесення до субстрату регульованої кількості джерел вуглецю та азоту в поєднанні з контрольованими параметрами рН, температури, забезпечує **оптимальні умови для швидкого обростання субстрату міцелієм *Fomitopsis betulina***. Результати експериментів показали, що за оптимізованих умов **швидкість колонізації субстрату зростає у 1,5-1,8 рази** порівняно з базовими параметрами. Це дозволяє скоротити виробничий цикл, зменшити енергозатрати та підвищити якість отриманого посівного матеріалу.

Місце впровадження:

Виробничі потужності підприємства «Царство грибів» (ТОВ «ЕСМАШ-3»).

Впровадження підтверджено:

- Експериментальними даними, отриманими у виробничих умовах;
- Документальною звітністю, складеною підприємством.

Т.в.о. завідувача Відділу рослинних харчових продуктів та біофортificaції ДУ «ІХБГ НАН України»,
канд. техн. наук, ст. наук. співроб.

Віктор БАРШТЕЙН

Провідний інженер Відділу рослинних харчових продуктів та біофортificaції ДУ «ІХБГ НАН України»,

Тетяна ЗАЙЧЕНКО