

того, что изменение температуры влияет на химическую структуру Д70-ПНИПАМ можно предположить, что фазовый переход в молекуле полимера вызывает десорбцию молекул порфирина с последующей их агрегацией в водной среде. Аналогичный механизм изменения спектральных свойств был описан в случае исследования взаимодействия с данным полимером хлоринов [5].

Подобные изменения наблюдаются и для ГТФП, но амплитуда изменений, связанная с переменной температуры, значительно меньше.

Также было показано, что спектрально-флуоресцентные характеристики и относительный квантовый выход более неполярных соединений ГТФП, мТМФП и мТФП в водных растворах и в присутствии полимера практически идентичны независимо от температуры образцов. По всей видимости, потенциал взаимодействия сополимера Д70-ПНИПАМ с гидрофобными пигментами недостаточен, чтобы повлиять на степень их агрегированности в водной среде. В силу этого, в отличие от мТГФП, эти соединения в растворе полимера находятся в агрегированном состоянии.

Представляет интерес исследование процессов взаимодействия с полимером полярных производных тетрафенилпорфирина. В присутствии полимера для ТСФП и ТКФП не наблюдается никаких изменений спектральных характеристик при температурах выше и ниже НКТР. Кроме того, величина степени поляризации флуоресценции этих пигментов в растворе полимера близка к нулю, что свидетельствует о том, что данные соединения не связываются с сополимером Д70-ПНИПАМ.

Полученные результаты показывают, что особенности химической структуры молекул оказывают существенное влияние на способность сополимеров декстран70-поли(Н-изопропилакриламида) образовывать комплексы с соединениями порфиринового ряда. Предполагается, что наличие полярных боковых заместителей приводит к смещению равновесия в сторону процессов агрегации, а не в сторону процессов образования комплексов с полимером. Следовательно, получение устойчивых комплексов пигментов с сополимером декстран70-поли(Н-изопропилакриламида) возможно только для ограниченного количества соединений. Такие соединения должны характеризоваться определёнными значениями степени полярности их молекул, лежащими в узком диапазоне.

Использование термочувствительных полимерных материалов на основе Д70-ПНИПАМ может повысить эффективность очистки воды, загрязненной гидрофобными соединениями. С помощью сополимеров Д70-ПНИПАМ можно не только удалять загрязняющие вещества из воды с помощью механизмов адсорбции, но и контролировать этот процесс посредством изменения температурных условий. Стоит отметить, что при разработке методов использования подобных материалов для конкретных целей необходимо учитывать, что физико-химические характеристики адсорбируемых молекул существенно влияют на процессы образования комплексов с сополимерами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Liu, J.* Encapsulation of Hydrophobic Phthalocyanine with Poly(N-isopropylacrylamide)/Lipid Composite Microspheres for Thermo-Responsive Release and Photodynamic Therapy / J. Liu [et al.] // *Materials* (Basel, Switzerland) – 2014. – Vol. 7, № 5. – P. 3481-3493.
2. *Saad, A.* Thermo-responsive adsorption-desorption of perfluoroorganics from water using PNIPAm hydrogels and pore functionalized membranes / A. Saad [et al.] // *Journal of membrane science* – 2020. – Vol. 599. – 12 p.
3. *Kutsevol, N.* Biodegradable star-like polymer flocculants for rapid, efficient purification of water contaminated with industrial radionuclides / N. Kutsevol [et al.] // *Separation and Purification Technology* – 2021. – Vol. 273. – 118630 p.
4. *Куцевол, Н. В.* Синтез и структурные особенности разветвленных декстран-поли-изопропилакриламид сополимеров / Н.В. Куцевол [и др.] // *Вестник Казанского технологического университета* – 2016. – Т. 19, №6. – С. 27-31.
5. *Kutsevol, N.* Evaluation of a Dextran-Poly(N-Isopropylacrylamide) Copolymer as a Potential Temperature-Dependent Nanocarrier for Photosensitizers with Different Properties / N. Kutsevol [et al.] // *Ukrainian Journal of Physics*. – 2020. – Vol. 65, № 7. – P. 638–646.

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГРИБА *PHALLUS IMPUDICUS* L. EX PERS ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА ПЛОТНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ CULTURAL AND MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF THE MUSHROOM *PHALLUS IMPUDICUS* L. EX PERS GROWING ON DENSE NUTRITIONAL MEDIA

Т. А. Пучкова
T. A. Puchkova

Белорусский государственный университет, город Минск, Республика Беларусь
Belarusian State University, city Minsk, Republic of Belarus
puchkova@bsu.by

Проведено изучение культурально-морфологических свойств выделенных из плодовых тел штаммов гриба *Phallus impudicus*. Линейная скорость роста у наиболее активных штаммов при 23–25 °С состави-

ла 1,15–1,4 мм/сут, РК –10–12. Оптимальными условиями роста мицелия являлись: температура 23–25 °C и pH 4–6. Проведены качественные реакции на наличие гидролитических и окислительно-восстановительных ферментов. Показана возможность твердофазного культивирования мицелия на субстрате, содержащем зерно ячменя и солому.

The study of the cultural and morphological properties of strains of the mushroom *Phallus impudicus* isolated from fruiting bodies was carried out. The linear growth rate of the most active strains at 23–25°C was 1.15–1.4 mm/day, the growth coefficient was 10–12. The optimal conditions for mycelium growth were: temperature 23–25 °C and pH 4–6. Qualitative tests were carried out for the presence of hydrolytic and redox enzymes. The possibility of solid-phase cultivation of mycelium on a substrate containing barley grain and straw was shown.

Ключевые слова: веселка, *Phallus impudicus*, мицелий, условия культивирования.

Keywords: stinkhorn, *Phallus impudicus*, mycelium, cultivation conditions.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-1-249-252>

Гриб веселка обыкновенная (*Phallus impudicus* L. ex Pers.) встречается в лиственных и смешенных лесах стран Европы, в Сибири, на Дальнем Востоке и в Северной Америке. Он растет на богатых гумусом и почвах с весны и до конца осени. Молодые плодовые тела имеют яйцевидную форму, а зрелые состоят из длинной цилиндрической белой или светло-серой ножки и конической шляпки тёмно-оливкового цвета. Зрелые плодовые тела имеют неприятный запах падали. Это привлекает насекомых, которые распространяют споры гриба. Из-за неприятного запаха этот гриб в англоязычной литературе называют гриб-вонючка. Веселка в наших лесах встречается довольно редко.

Молодые плодовые тела веселки, имеющие форму яйца, считаются съедобными. Веселка издавна использовалась в народной медицине стран Восточной и Северной Европы при подагре, ревматизме, заболеваниях желудка, как вспомогательное средство при лечении онкологических заболеваний. Наружно водочная настойка весёлки применялась для лечения заболеваний кожи: трофических язв, пролежней, ран, укусов [1–2]. Интерес к этому грибу как к природному лекарству сохраняется и в настоящее время.

Научные исследования данного гриба немногочисленны. Плодовые тела и выращенный в лабораторных условиях поверхностный и глубинный мицелий имели сходный биохимический состав по исследованным показателям. Сухая биомасса плодовых тел и мицелия содержала 50–54% общих углеводов, 13,0–14,5 % водорастворимых полисахаридов, 7,0 – 12,5 % хитина, 20 – 25 % сырого протеина, 12,0 – 13,5 % истинного белка, 1,4 – 2,3 % липидов. При изучении их углеводного состава полисахаридов установлено, что они состоят из мономеров глюкозы (47,0%), маннозы (24,0%) и галактозы (18,4%) [3].

Проведенные на лабораторных животных исследования показали, что применение водного экстракта веселки обыкновенной улучшало общее состояние и увеличивало продолжительность жизни мышей, подвергнутых γ -облучению. Полисахариды гриба обладали иммуномодулирующими свойствами путем повышения фагоцитарной активности. Их иммуномодулирующий эффект опосредован различными иммунными клетками, такими как макрофаги и Т-лимфоциты. Экстракты, содержащие полисахариды гриба, улучшали состояние крыс при экспериментальном диабете и гепатите, оказывали антиоксидантное действие. Местное применение содержащих полисахариды экстрактов в составе мази оказывало репаративное действие при повреждениях кожи, способствовало заживлению ран и ожогов у экспериментальных крыс [1, 4].

Природные ресурсы гриба *Ph. impudicus* ограничены. В лесах он встречается редко. В нашей стране гриб весёлка является охраняемым видом. Поэтому представляет интерес изучение его роста на питательных средах в лабораторных условиях. Это позволит в дальнейшем разработать технологию выращивания мицелия для получения биологически активных веществ.

В настоящее время известны технологии выращивания мицелия съедобных и лекарственных грибов поверхностным способом на твердых сыпучих средах, компонентами которых могут служить зерно злаковых культур, отходы лесных, садовых и сельскохозяйственных растений. Такие технологии не требуют больших затрат, так как используется несложное оборудование и дешевые субстраты на основе растительных отходов. Полученный мицелий содержит биологически активные вещества и может использоваться как кормовая добавка для сельскохозяйственных животных.

Целью работы являлось выделение в чистую культуру новых штаммов гриба *Ph. impudicus*, отбор среди них активно растущих, исследование их культурально-морфологических свойств и оценка возможности твердофазного культивирования мицелия.

Штаммы гриба *Ph. impudicus* выделяли из свежих плодовых тел, собранных в лесах Молодечненского района Минской области. Поверхность молодых плодовых тел в стадии яйца обрабатывали 3% перекисью водорода, 96 % этанолом, промывали стерильной дистиллированной водой, разрезали простерилизованным скальпелем. Из их внутренней стерильной части вырезали кусочки размером около 5–10 мм, которые помещали на поверхность агаризованной картофельно-глюкозной среды в чашках Петри. Чистую культуру гриба поддерживали на этой же скошенной среде в пробирках в холодильнике, пересевали раз в 6 месяцев.

Изучение культурально-морфологических свойств *Ph. impudicus* штаммов гриба проводили при выращивании в чашках Петри диаметром 90 мм на агаризованных питательных средах: сусло-агаре (8 °Б) (СА), глюкозо-

пептонном агаре (ГПА) и картофельно-глюкозном агаре (КГА). Приготовление питательных сред и определение количественных характеристик роста грибов, таких как линейная скорость роста (Кр, мм/сут) и ростовой коэффициент (РК) проводили по методикам, описанным в [5]. Микроскопирование мицелия проводили с помощью светового микроскопа с иммерсионной системой при увеличении окуляра $\times 90$.

Для определения качественных реакций на наличие ферментативных активностей мицелий гриба выращивали на ГПА. Реактивы, необходимые для выявления ферментативной активности, при проведении прямых тестов добавляли в питательную среду при её приготовлении. При проведении непрямых тестов реактивы наносили на поверхность выросших мицелиальных колоний.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических функций Microsoft Excel.

Из плодовых тел в чистую культуру выделено пять штаммов гриба *Ph. impudicus*. Их выращивали при различных условиях с целью отобрать более быстрорастущие. При росте на агаризованных питательных средах изучались культурально-морфологические свойства колоний грибов. Такие исследования нужны для последующего контроля чистоты культуры и оценки её пригодности для последующего культивирования.

При микроскопировании вегетативного мицелия *P. impudicus* наблюдались разветвленные, септированные гифы. В области поперечных перегородок между клетками имелись пряжки. На мицелии иногда наблюдались крупные, вздутые клетки неправильной формы. Гифы мицелия переплетались, а также сливались с образованием анастомозов.

Поскольку в литературе имеется мало данных о культивировании гриба *P. impudicus*, использовались питательные среды, на которых хорошо растут высшие базидиомицеты: сусло-агар, картофельно-глюкозный агар и глюкозо-пептонный агар. Агаризованные среды Чапека-Докса и Сабуро не поддерживали рост мицелия гриба. Штаммы гриба *Ph. impudicus* на средах СА, ГПА и КДА формировали высокие, плотные, пушистые, ватные колонии белого цвета с реверзном цвета среды. Край колоний был ровный или слегка волнистый. На поверхности колоний отчетливо выделялись выпуклый центр и концентрические круги. Мицелий имел обычный грибной запах, а не резкий, как у зрелых плодовых тел. Хотя колонии гриба сразу начинали расти высокие и плотные, мицелий достигал края чашки Петри только после 50 суток культивирования. Лучшие показатели роста у всех штаммов наблюдались на глюкозо-пептонном агаре. Рост мицелия стимулировало добавление в среду лесной почвы в количестве 1 г/л. Добавление в среду древесных опилок не активировало рост мицелия.

Линейная скорость роста штаммов составила 0,8-1,2 мм/сут, ростовой коэффициент (РК) – 6,0-12 (таблица). В соответствии критериями роста мицелия грибов, приведенными в [5], все исследуемые штаммы *Ph. impudicus* можно отнести медленнорастущим. Наиболее активным ростом отличались штаммы 4 и 5, максимальная линейная скорость роста у которых при температуре 23-25 °С составила 1,15-1,4 мм/сут, ростовой коэффициент – 10-12.

Исследовано влияние условий культивирования на рост гриба. *P. impudicus* выращивали на агаризованных средах при температурах от 4 до 37 °С. При $+4 \pm 1$ °С вегетативный мицелий рос очень слабо. При $+18-20$ °С имелся слабый рост мицелия. Причем при $+18-20$ °С грибы росли лучше, чем при 26-28 °С. Оптимальная температура роста для всех штаммов *Ph. impudicus* составляла 23-25 °С. При 30 °С и 37 °С колонии гриба не росли. Результаты выращивания штаммов *P. impudicus* 4 и 5 на среде ГПА при различных температурах показаны на рисунке.

Проведено изучение влияния начального значения pH питательной среды на рост *P. impudicus*. Для роста мицелия благоприятным оказалось слабокислое значение pH в диапазоне от 4,0 до 6,0. Аналогичные результаты по влиянию начального значения pH получены при выращивании штаммов на жидкой глюкозо-пептонной среде в колбах. В процессе культивирования мицелия значение pH жидкой среды снижалось до 3,0 – 3,5.

Таблица – Рост штаммов *Phallus impudicus* на агаризованных питательных средах

Штамм	Питательная среда	Кр, мм/сут	РК
1	СА	$0,67 \pm 0,03$	$8,2 \pm 0,3$
	КГА	$1,03 \pm 0,02$	$9,4 \pm 0,2$
	ГПА	$1,1 \pm 0,04$	$10,8 \pm 0,5$
2	СА	$0,75 \pm 0,01$	$10,0 \pm 0,4$
	КГА	$0,97 \pm 0,03$	$9,6 \pm 0,2$
	ГПА	$1,14 \pm 0,02$	$10,8 \pm 0,2$
3	СА	$0,46 \pm 0,04$	$6,4 \pm 0,1$
	КГА	$0,78 \pm 0,02$	$7,3 \pm 0,2$
	ГПА	$1,0 \pm 0,04$	$9,5 \pm 0,4$
4	СА	$0,77 \pm 0,03$	$9,2 \pm 0,3$
	КГА	$1,0 \pm 0,02$	$9,4 \pm 0,3$
	ГПА	$1,15 \pm 0,05$	$12 \pm 0,4$
5	СА	$0,46 \pm 0,03$	$9,0 \pm 0,2$
	КГА	$1,1 \pm 0,02$	$9,8 \pm 0,2$
	ГПА	$1,2 \pm 0,04$	$12 \pm 0,5$

Для определения ферментативной активности *Ph. impudicus* проведены качественные цветные реакции. На наличие ферментативной активности у гриба указывало изменение внешнего вида питательной среды, на которой рос мицелий, проявлявшееся в изменении её окраски, помутнении или просветлении зоны вокруг колонии. У гриба *Ph. impudicus* имелись различные гидролитические ферменты. Наблюдались положительные реакции на амилазу на среде с крахмалом, целлюлазу на среде с карбоксиметилцеллюлозой. Слабая реакция наблюдалась в тестах на протеиназу на среде с добавлением желатины в виде небольших прозрачных зон под колониями выращивания и на липазу на среде с Tween 80. Из восстановительных ферментов определена нитратредуктазная активность на среде с нитратом натрия. Присутствие окислительных ферментов определяли путем нанесения соответствующих реактивов на поверхность колоний. Чёткая реакция проявлялась на лакказу на среде с α -нафтолом и тирозиназу – с р-крезолом. Слабой была реакция на пероксидазу при добавлении перекиси водорода.

Для выращивания плодовых тел различных грибов в искусственных условиях часто используются твердые сыпучие субстраты, включающие зерно, отруби, опилки, солому. Вегетативный мицелий *Ph. impudicus* в течение 6-8 недель обрастал помещенный в литровые банки, закрытые ватными пробками, твердофазный субстрат на основе зерна ячменя и соломы, а образование зачатков плодовых тел наблюдалось через 8-10 недель. Настоящих плодовых тел в данном исследовании получено не было. Однако твердофазное культивирование можно рассматривать как промежуточную стадию для получения кормовой добавки или экстрактов.

Таким образом, проведено изучение культурально-морфологических свойств выделенных из плодовых тел штаммов гриба *Ph. impudicus*. Линейная скорость роста у наиболее активных штаммов при 23-25 °C составила 1,15–1,4 мм/сут, ростовой коэффициент –10-12. Проведены качественные реакции на наличие гидролитических и окислительно-восстановительных ферментов. Показана возможность твердофазного культивирования мицелия на субстрате, содержащем зерно ячменя и солому. Полученные результаты будут способствовать разработке технологии культивирования биомассы *Ph. impudicus* в лабораторных условиях для получения биологически активных веществ.

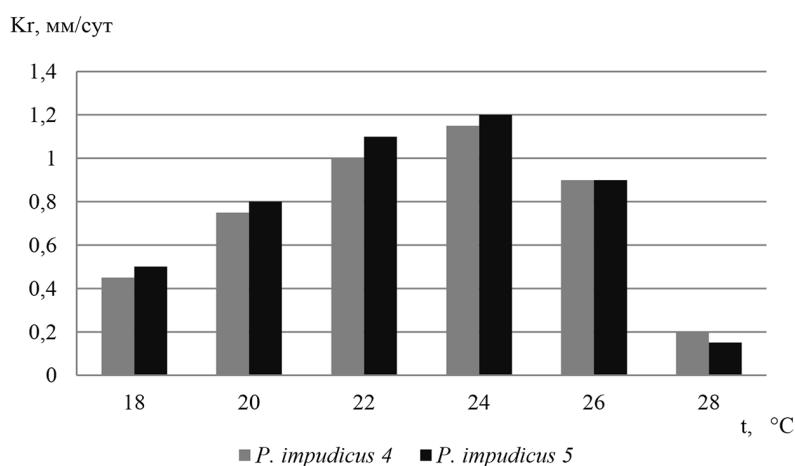


Рисунок – Влияние температуры культивирования на линейную скорость роста штаммов *P. impudicus*

ЛИТЕРАТУРА

1. Kuznecovs, S. *Phallus impudicus*: from folk medicine to supportive cancer care / S. Kuznecovs, K. Jegina // Int. J. of Med. Mushrooms. – 2007. – Vol. 9, N 3–4. – P. 263–264.
2. Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре: сборник научных трудов в двух томах / под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера - Киев, Альтерпрес, 2011. Т. 1. – 217 с.
3. Физиолого-биохимические свойства гриба веселка обыкновенная (*Phallus impudicus* L. Ex Pers.) / Т. А. Пучкова [и др.] // Весці НАН Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2016. – № 1. – С. 13-16.
4. Polysaccharides of mushroom *Phallus impudicus* mycelium: immunomodulating and wound healing properties / V. Boko [et al.] // Modern Food Science and Technology. – 2019. – Vol. 35, N 9. – P. 30–37. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.003.
5. Бухало, А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А. С. Бухало. – Киев: Наук. думка, 1988. – 144 с.