

МРНТИ: 34.27.39, 68.03.07

Д.Д. БОКЕНОВ^{1,2}, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ^{1,2},
Д.Е. АБДИЛЬМАНОВ^{1,2}, М.Г. САУБЕНОВА¹¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОТБОР ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ И
АНТАГОНИСТОВ МИКРОМИЦЕТОВ-ЗАСОРИТЕЛЕЙ ИЗ
ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ****doi:10.53729/MV-AS.2023.02.05****Аннотация**

Рост населения мира и проблема нехватки продовольствия и кормов требуют развития технологий в области пищевой промышленности и кормопроизводства, повышающих эффективность использования вторичных возобновляемых ресурсов, а именно целлюлозосодержащих отходов сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности. Культивирование высших грибов для получения пищевого и кормового белка и биологически активных соединений является наиболее рациональным способом переработки лигноцеллюлозных отходов растениеводства. Использование плодовых тел высших грибов способно в значительной мере сократить потребность в производстве мяса и обеспечить население высококачественным и ценным продуктом питания. Однако присутствие в целлюлозосодержащем сырье разнообразных плесневых грибов тормозит развитие высших грибов, требует энергоемкой предварительной подготовки субстрата и сдерживает развитие данной отрасли. Использование микроорганизмов, обладающих целлюлолитической активностью и антагонизмом в отношении плесневых грибов, является перспективным решением проблемы. В данном исследовании было выделено 49 изолятов целлюлолитических бактерий из пшеничной, овсяной и ячменной соломы, а также разрушенной древесины. Показана наибольшая эффективность выделения целлюлолитических микроорганизмов из длительно хранящихся образцов пшеничной соломы. Среди изолятов с наиболее высокой целлюлолитической активностью и коллекционных культур микроорганизмов отобраны антагонисты выделенных ранее из соломы микромицетов, относящихся к родам *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*. Также определена антагонистическая активность выделенных микроорганизмов к одному из основных возбудителей зеленой плесени высших грибов *Trichoderma longibrachiatum*. Отобрано 8 изолятов с наиболее выраженной целлюлолитической активностью и антагонизмом в отношении микромицетов - засорителей вторичного целлюлозосодержащего сырья. Отобранные микроорганизмы будут использованы в дальнейшей работе по разработке способа комплексного использования лигноцеллюлозных отходов в культивировании высших грибов для пищевой промышленности, сельского хозяйства, медицины и фармацевтики.

Ключевые слова: целлюлолитические бактерии, антагонизм, противогрибковая активность, целлюлозосодержащие отходы растениеводства, плесневые грибы.

Нехватка продовольствия в связи с ростом населения планеты – актуальная проблема, которая становится все более выраженной со временем. Растущее население Земли означает, что все больше людей нуждаются в еде. Согласно отчетам ООН, население Земли превысило 8,02 миллиарда человек и достигнет к 2050 году 9,7 миллиардов, причем большая часть роста будет приходиться на менее развитые страны [1]. Это означает, что потребность в продовольствии продолжит расти, и в некоторых регионах уже существует дефицит продуктов питания. С другой стороны, нехватка продовольствия может быть вызвана рядом факторов, таких как изменение климата, ухудшение почвы, убыль природных ресурсов, нарастающие затраты на производство и распространение продуктов питания, а также ограниченные возможности для развития животноводства и сельского хозяйства.

Решение проблемы нехватки продовольствия может быть достигнуто через улучшение технологий животноводства и сельского хозяйства и повышение эффективности использования вторичных ресурсов. Важную роль здесь играют развитие инноваций и научных исследований, которые могут помочь увеличить производительность и улучшить качество продуктов питания. Использование белка высших грибов является хорошей альтернативой повышению продукции мяса [2]. В настоящее время производство высших грибов считается одним из наиболее разумных решений, которые могут улучшить качество жизни человека. В течение многих веков грибы использовались в пищевой, медицинской и косметической промышленности, а также в народной медицине для лечения различных заболеваний. Богатство питательными веществами и биологически активными соединениями делает высшие грибы ценным источником пищевой и медицинской продукции [3,4]. Отработанный грибной субстрат, содержащий мицелий и отходы высших грибов может быть ценной кормовой добавкой для животноводства благодаря своей пищевой и биологической ценности [5-7]. Более того, производство грибов может быть экологически безопасным и эффективным с точки зрения использования земельных ресурсов. Выращивание грибов может осуществляться на широком спектре лигноцеллюлозных отходов сельского хозяйства [8], что может способствовать снижению количества отходов и уменьшению негативного влияния на окружающую среду. В целом, производство высших грибов является перспективным направлением развития не только сельского хозяйства, но и медицины, пищевой и косметической промышленности, а также экологии.

Для обеспечения устойчивого роста высших грибов необходима соответствующая предподготовка субстрата, направленная на подавление роста засоряющих микромицетов [8,9]. Одним из наиболее перспективных решений этой проблемы является применение микроорганизмов, проявляющих одновременно целлюлолитическую и антагонистическую активность. Наличие у таких микроорганизмов целлюлолитической активности будет способствовать предподготовке субстрата для культивирования высших грибов, а антагонизм в отношении засоряющих и конкурирующих микромицетов обеспечит контролируемость процесса культивирования. Целью данного исследования было выделение целлюлолитических бактерий из природных субстратов и получение изолятов с высокой целлюлазной и антагонистической активностью для дальнейшего использования в процессе культивирования высших грибов.

Материалы и методы исследования

Для выделения целлюлолитических бактерий использовались солома злаковых культур таких как ячмень, овес и пшеница, а также древесина, разрушенная жуками-древоточцами. Сбор целлюлозосодержащих растительных остатков проводили стерильным пинцетом и помещали в стерильную тару. Целлюлолитические бактерии выделяли на селективной плотной питательной среде Гетчинсона с Na-карбоксиметилцеллюлозой (Na-КМЦ) в качестве единственного источника углерода и энергии. Для подавления роста грибковых микроорганизмов в среду добавляли антибиотик нистатин. Для выделения на агаризованной среде мелконарезанные кусочки соломы раскладывали на чашки Петри с питательной средой и культивировали в термостате при 37°C в течение 3 суток. Для получения накопительных культур использовали жидкую среду Гетчинсона с пшеничной соломой, инкубировали 14 суток при температуре 37°C. Выделение чистых культур целлюлолитических бактерий проводили путем высева из последовательных разведений накопительных культур на агаризованную питательную среду Гетчинсона с добавлением Na-КМЦ. Чистоту выделенных культур микроорганизмов проверяли визуально и путем микроскопирования.

Для определения целлюлолитической активности колонии бактерии культивировали на жидкой среде Гетчинсона с фильтровальной бумагой. Засеянные пробирки инкубировали в термостате при 30°C до 40 суток. Степень разложения целлюлозы

определяли визуально в процентах и выражали символически в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 – Уровень целлюлолитической активности целлюлозоразрушающих бактерий

Целлюло-литическая активность	Обозначение	Степень разложения фильтровальной бумаги, %	Описание
Высокая	+++	50-70	Распадение фильтровальной бумаги на мелкие кусочки, образование густой мути.
Средняя	++	30-40	Значительное разложение с сохранением целостности части бумаги.
Слабая	+	10-20	Образование мути, разложение части бумаги.
Очень слабая	±	<10	Образование мути.

Для определения антагонистической активности отобранных изолятов использовали засоряющие микромицеты родов *Penicillium* sp. Пш 2-2, *Aspergillus niger* Пш 1-1 и *Fusarium* sp. Яч-1, выделенные из различных видов соломы, а также два штамма возбудителя зеленой плесени шляпочных грибов *Trichoderma longibrachiatum* V и *T. longibrachiatum* VG, изолированные ранее из вешенки и неидентифицированного пластинчатого гриба [9]. Определяли антагонистическую активность как у новых изолятов целлюлолитических бактерий, так и у микроорганизмов из коллекции антагонистов лаборатории пищевой микробиологии.

Определение антагонистической активности ассоциаций проводили методом диффузии в агар и совместного культивирования на чашке Петри. Для газона гриба использовали питательную среду Чапека 7. Мицелиальные грибы предварительно культивировали в жидкой среде Чапека 7 на кусочке хлопковой ваты при 30°C в течение 7 суток. Посев тестовых грибов для получения газона производили на поверхности чашки Петри. Далее в газоне готовили лунки диаметром 10мм, в которые вносили культуральные жидкости изучаемых целлюлолитических бактерий. Чашки инкубировали до 5–7 суток при 30°C. Эксперименты повторяли в 3-х повторностях. Результаты выражали в виде среднего значения и ошибки среднего.

Для выявления антагонизма изолятов в отношении грибов *T. longibrachiatum* использовали также метод совместного культивирования. В качестве питательной среды использовали смесь Wort Agar (сусло агар) и Гетчинсона с Na-КМЦ (1:1). В середине чашки Петри засекали триходерму методом штриха, а по краям чашки на расстоянии 2-3 см от штриха триходермы засекали целлюлолитические бактерии-антагонисты. Чашки культивировались при 30°C в течение 7 суток.

Результаты и обсуждение

Из накопительных культур с использованием различных целлюлозосодержащих субстратов и с поверхности соломы изолированы целлюлолитические бактерии. Всего получено 49 изолятов. Из образцов пшеничной соломы выделено 17 изолятов, с ячменной - 9, с овсяной – 10, с разрушенной древесины и выделений жуков-древоточцев - 13 изолятов.

По эффективности разложения целлюлозы изоляты с различных источников значительно различались. Из 17 изолятов с пшеничной соломы 6 обладали высокой целлюлолитической активностью, 6 – средней. Из 9 изолятов, выделенных с ячменной соломы, только 2 проявили среднюю активность, остальные же слабо и очень слабо разлагали целлюлозу фильтровальной бумаги (таблица 2). Только 1 из 10 изолятов с овсяной соломы показал высокую целлюлолитическую активность. Из разрушенной древесины было получено 3 изолята с высокой целлюлолитической активностью.

В целом 20,4% изолятов хорошо расщепляли целлюлозу.

Таблица 2 – Целлюлолитическая активность изолированных микроорганизмов

Источник выделения	Изолят	Уровень целлюлолитической активности	Изолят	Уровень целлюлолитической активности
Пшеничная солома, урожай 2020 г.	Пш 1-1	+	Пш 1 I	+
	Пш 1-2	++	Пш 1 II	±
	Пш 1-3	++		
Пшеничная солома со следами порчи	Пш 2-1	++	Пш 2 I	++
	Пш 2-2	+++	Пш 2 II	++
	Пш 2-3	+++	Пш 2 III	+++
	Пш 2-4	+++		
Пшеничная солома, урожай 2015 г.	Пш 3-1	+++	Пш 3 II	±
	Пш 3-2	+++	Пш 3 III	++
	Пш 3 I	±		
Ячменная солома, урожай 2020 г.	Яч 1	++	Яч II	±
	Яч 2	++	Яч III	±
	Яч 3	+	Яч 3 I	±
	Яч 4	±	Яч 3 II	±
	Яч I	±		
Овсяная солома, урожай 2019 г.	Ов 1	+	Ов 6	±
	Ов 2	+++	Ов 7	+
	Ов 3	±	Ов 8	±
	Ов 4	±	Ов 9	±
	Ов 5	+	Ов 10	+
Различные образцы разрушенной древесины	Дв 1 I	±	Дв 3 I	+++
	Дв 1 II	±	Дв 3 II	±
	Дв I	±	Дв 3 III	±
	Дв 2 I	+	Дв III	+++
	Дв 2 II	±	Дв 4 I	+++
	Дв II	+	Дв 4 II	+
Выделения жука древооточца	Дв 1	++	Контроль	-

Наиболее высокая целлюлолитическая активность отмечена у изолятов Пш 2-2, Пш 2-3, Пш 2-4, Пш 2 III, Пш 3-1 и Пш 3-2 из пшеничной соломы, изолята Ов 2 - из овсяной соломы, Дв 3 I, Дв III и Дв 4 I - из разрушенной древесины. Изоляты с ячменной и овсяной соломы характеризовались наиболее слабой целлюлолитической активностью, а с пшеничной – самой высокой. Указанные различия в активности изолятов, по всей видимости, связаны не с разным составом пшеничной и ячменной соломы, а с отбором для исследования нескольких образцов пшеничной соломы, часть из которых хранилась длительное время, что позволило целлюлолитическим бактериям развиваться в данных образцах. Так, данные, представленные в таблице 2, показывают, что все 7 изолятов из образца пшеницы со следами порчи проявили высокую или среднюю целлюлолитическую активность. Два из пяти изолятов с соломы урожая 2015 г обладали высокой способностью к разложению целлюлозы, а в образце соломы 2020 года сбора не выявлены микроорганизмы с высокой целлюлолитической активностью. Изоляты высокоактивных целлюлолитических бактерий из разрушенной древесины также были получены с более старых образцов древесины с высокой степенью разрушения. Изолят из выделений жука древооточца проявил средний уровень активности.

В результате проведенного исследования отобрано 19 изолятов целлюлолитических бактерий с высокой и средней целлюлолитической активностью: 12 - из образцов пшеничной соломы, 2 - из ячменной, 1 - из овсяной соломы и 4 - из разрушенной древесины. Данные изоляты были проверены на способность к подавлению роста микромицетов-

засорителей культивирования высших грибов.

Результаты исследования противогрибковой активности отобранных изолятов целлюлолитических бактерий и коллекционных бактерий антагонистов показаны в таблице 3. Как видно из представленных в таблице результатов, антагонистическая активность в отношении всех четырех тестовых мицелиальных грибов выявлена у 10 изолятов, 4-х новых и 6 коллекционных. Три из четырех тестов подавляли новых 6 изолятов и 1 коллекционный. Наиболее выраженный антагонизм проявили среди новых изолятов Пш 2-2, Пш 2-3, Пш 2 III, Пш 3-1, Пш 3-2, В1 2, Дв 1, Дв III и Дв 4 I, семь из которых обладали наиболее высокой целлюлолитической активностью, несмотря на то, что наличие целлюлозы в клеточной стенке не характерно для аскомицетных грибов [10]. Вероятной причиной является более широкая специфичность ряда гликозидазных ферментов [11], а также сложнокомпонентный состав клеточных стенок мицелиальных грибов, включающих кроме хитина также глюканы и другие полимеры [10]. В то же время наличие литической активности не всегда является признаком присутствия антагонистической активности [12].

Таблица 3 – Противогрибковая активность изолятов целлюлолитических бактерий и коллекционных бактерий антагонистов

№	Изолят	Диаметр зон задержки роста/спорообразования*, мм			
		<i>Penicillium</i> sp. Пш 2-2	<i>Fusarium</i> sp. Яч-1	<i>Aspergillus niger</i> Пш 1-1	<i>T. longibrachiatum</i> V
1	2	3	4	5	6
1	Пш 1-2	0	0	14,0*±1,0	15,0*±1,0
2	Пш 1-3	13,0*±1,0	0	0	0
3	Пш 2-1	0	0	23,0*±1,0	0
4	Пш 2-2	12,0*±0,0	0	15,0*±0,0	28,0*±1,5
5	Пш 2-3	22,0*±1,0	12±1,0	30,0*±0,5	20,0±3,0 30,0*±5,0
6	Пш 2-4	0	0	12,0*±1,0	0
7	Пш 2 I	0	0	34,0*±4,0	11,0*±1,0
8	Пш 2 III	44,0±6,5	0	41,5*±1,5	32,0±8,0 37,0*±3,0
9	Пш 2 II	0	0	15,0*±0,0	11,0±1,0 12,5*±2,5
10	Пш 3-1	18,0±1,0	12,0*±0,0	19,0*±1,0	23,0*±1,5
11	Пш 3-2	12,0±0,0 17,0*±1,0	15,0*±0,0	23,0*±3,0	30,0*±1,0
12	Пш 3 III	0	0	0	0
13	Яч 1	20,0±0,0	0	0	28,0*±1,0
14	Яч 2	17,0±3,0	18,0±3,0	0	17,0±0,0 30,0*±1,0
15	Ов 2	0	0	0	0
16	Дв 1	25,0±5,0	12,0±1,0	21,0*±5,7	33,0±6,5
17	Дв 3 I	0	0	0	0
18	Дв III	20,0±5,0	0	30,0*±2,5	29,5*±2,5
19	Дв 4 I	12,5±2,5	0	15,0*±1,0	35,0±10,0
20	ПГ 1 св.	0	22,0±3,5	13,0*±1,0	18,5±1,5
21	<i>Bacillus</i> sp. 98	27,5±3,0	35,6±2,7	28,5±1,5 40,0*±4,5	26,0±3,0

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6
22	<i>Bacillus coagulans</i> 17	0	0	0	0
23	PG 1-2	30,2±4,5	27,5±1,5	35,0±3,0	25,0±2,5
24	PG 3	11,0*±1,0	23,5±0,5	15,0±1,0	16,2±2,1
25	PG 6	20,6±0,6	22,0±1,0	10,5*±0,5	22,0±1,0
26	PG	0	20,5±1,5	11,0*±1,0	15,0±1,5
27	<i>Bacillus</i> sp. СВ 1-2	32,0±1,0	35,3±4,7	30,5±1,2	38,0±3,5
28	В1 2	16,0±0,5	20,0±1,0	38,4±2,7	19,5±1,5

При исследовании антагонизма в отношении *Trichoderma*, являющихся основными возбудителями болезней гриба вешенка [13,14], показана наибольшая антагонистическая активность новых изолятов Пш 2–3, Пш 2 III, Пш 3-2. Среди коллекционных микроорганизмов выраженный антагонизм в отношении *T. longibrachiatum* проявили *Bacillus* sp СВ 1-2, *Bacillus* sp. 98, и изоляты В1 2, PG 1-2 и PG 6. Влияние изолированных и коллекционных бактерий на рост *T. longibrachiatum* при совместном культивировании на одной чашке Петри представлено на рисунке 1. Полученные результаты демонстрируют зависимость полученных результатов по уровню антагонистической активности микроорганизмов от применяемого метода исследования. Так, при совместном культивировании изоляты PG 3, В1 2 и Дв 4 I не проявляли антагонизма в отношении *T. longibrachiatum* V, хотя при исследовании влияния методом отсроченного антагонизма были получены положительные результаты.

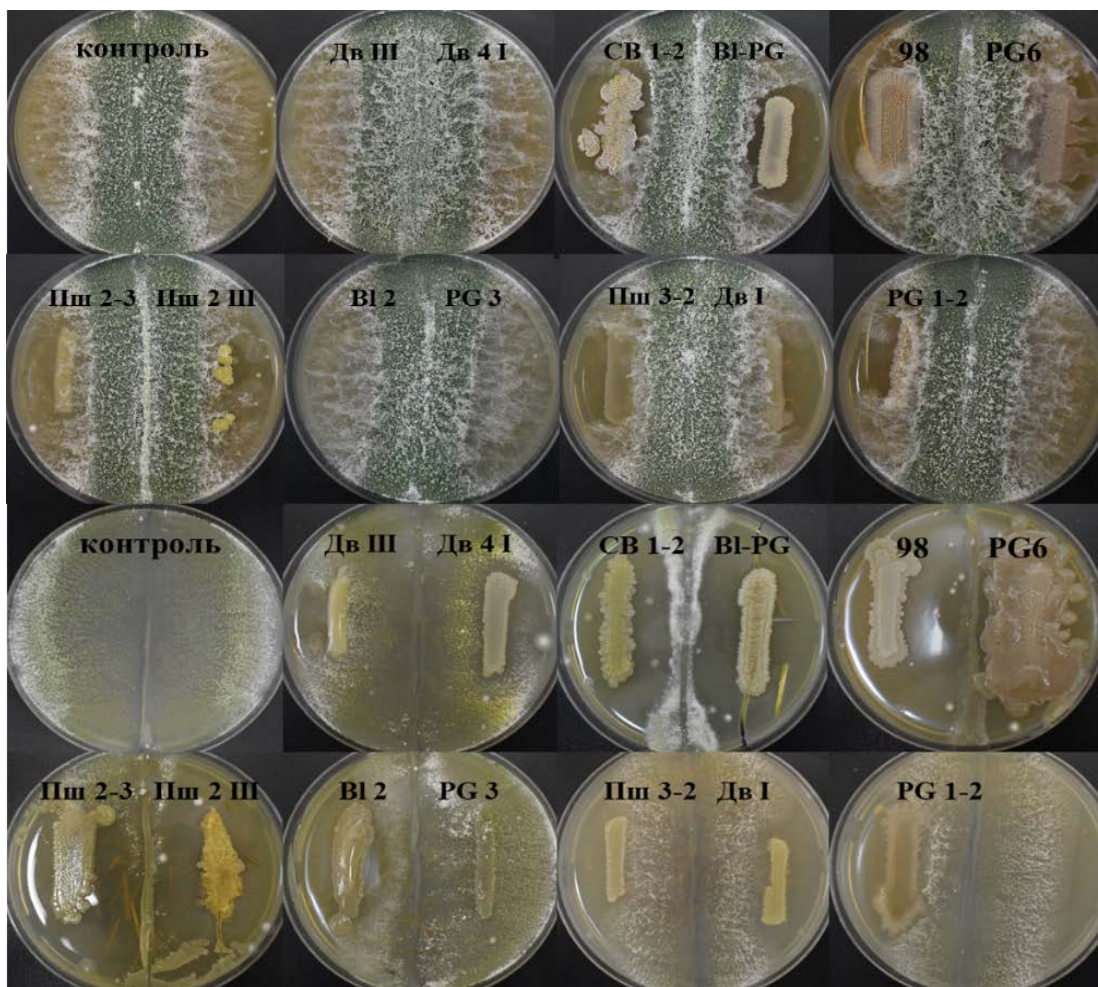


Рисунок 1 – Противогрибковая активность целлюлолитических бактерий в отношении *T. longibrachiatum* V (сверху) и *T. longibrachiatum* VG (снизу)

Заклучение

По результатам проведенных исследований отобрано 3 изолята вновь выделенных целлюлолитических бактерий и 5 изолятов из коллекции. Отобранные микроорганизмы обладают как выраженной целлюлолитической активностью, так и антагонизмом в отношении наиболее распространенных в целлюлозосодержащих отходах растениеводства плесневых грибов. Дальнейшая работа будет нацелена на исследование взаимоотношений отобранных микроорганизмов с высшим грибом вешенка обыкновенная и подбором микроорганизмов спутников для предварительной подготовки субстрата при культивировании гриба. Полученные данные внесут вклад в разработку комплексного метода переработки целлюлозосодержащих отходов растениеводства с использованием высших грибов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Комитета Науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № AP09258654).

Литература:

- 1 Саубенова М., Олейникова Е., Ермекбай Ж., Айтжанова А., Бокенов Д., Потороко И. Микробиологические аспекты выращивания высших грибов. *Микробиология және вирусология*, 2021, 3 (34): 4–36 (doi: 10.53729/MV-AS.2021.03.01)
- 2 Li C., Xu S. Edible mushroom industry in China: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2022, 106(11): 3949–3955 (doi: 10.1007/s00253-022-11985-0)
- 3 Sun Y., Zhang M., Fang Z. Efficient physical extraction of active constituents from edible fungi and their potential bioactivities: A review. *Trends Food. Sci. Technol.*, 2020, 105: 468–482 (doi: 10.1016/j.tifs.2019.02.026)
- 4 Martinez-Medina G.A., Chávez-González M.L., Verma D.K., Prado-Barragán L.A., Martínez-Hernández J.L., Flores-Gallegos A.C., Thakur M., Srivastav P.P., Aguilar C.N. Bio-funcional components in mushrooms, a health opportunity: Ergothionine and huitlacoche as recent trends. *J. Funct. Foods*, 2021, 77: 1-17 (doi: 10.1016/j.jff.2020.104326)
- 5 van Kuijk S.J.A., Sonnenberg A.S.M., Baars J.J.P., Hendriks W.H., Cone J.W. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review. *Biotechnol. Adv.*, 2015, 33(1): 191-202 (doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.014)
- 6 Ivarsson E., Grudén M., Södergren J., Hultberg M. Use of faba bean (*Vicia faba* L.) hulls as substrate for *Pleurotus ostreatus* – Potential for combined mushroom and feed production. *J. Clean Prod.*, 2021, 313: 127969 (doi: 10.1016/j.jclepro.2021.127969)
- 7 Leong Y.K., Ma T.W., Chang J.S., Yang F.C. Recent advances and future directions on the valorization of spent mushroom substrate (SMS): A review. *Biores. Technol.*, 2022, 344(A): 126157 (doi: 10.1016/j.biortech.2021.126157)
- 8 Saubenova M., Oleinikova Y., Sadanov A., Yermekbay Z., Bokenov D., Shorabaev Y. The input of microorganisms to the cultivation of mushrooms on lignocellulosic waste. *AIMS Agriculture and Food*, 2023, 8(1): 239-277 (doi: 10.3934/agrfood.2023014)
- 9 Ермекбай Ж., Олейникова Е., Даугалиева С., Бокенов Д., Саубенова М., Алтекей А., Айтжанова А. Выделение микромицетов засорителей лигноцеллюлозных отходов злаковых культур. *Микробиология және вирусология*, 2022, 4(39): 45–64 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.04)
- 10 Феофилова Е.П. Клеточная стенка грибов: современные представления о составе и биологической функции. *Микробиология*, 2010, 79(6): 723-733 (https://elibrary.ru/download/elibrary_15523903_39962136.pdf)
- 11 Рабинович М. Л., Мельник М. С. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биодegradации высокоупорядоченных форм целлюлозы. *Успехи современной биологии*, 2000, 40: 205-266 (<https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/10/rabinovich.pdf>)
- 12 Sindhu S.S., Dadarwal K.R. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiological Research*, 2001, 156(4): 353-358 (doi: 10.1078/0944-5013-00120)
- 13 Kredics L., Kocsubé S., Nagy L., Komoń-Zelazowska M., Manczinger L., Sajben E., Nagy A., Vágvölgyi C., Kubicek C.P., Druzhinina I.S., Hatvani L. Molecular identification of *Trichoderma* species

associated with *Pleurotus ostreatus* and natural substrates of the oyster mushroom. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, 300: 58-67 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01765.x)

14 Al-Ani B.M., Owaid M.N., Al-Saeedi S.S.S. Fungal interaction between *Trichoderma* spp. and *Pleurotus ostreatus* on the enriched solid media with licorice *Glycyrrhiza glabra* root extract. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(3): 268-273 (doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.08.001).

Д.Д. БОКЕНОВ^{1,2}, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ^{1,2},
Д.Е. АБДИЛЬМАНОВ^{1,2}, М.Г. САУБЕНОВА¹

¹Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

КҰРАМЫНДА ЦЕЛЛЮЛОЗА БАР СУБСТРАТТАРДАН ЛАСТАУШЫ МИКРОМИЦЕТТЕРГЕ ҚАРСЫ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИКАЛЫҚ БАКТЕРИЯЛАР МЕН АНТАГОНИСТЕРДІ ОҚШАУЛАУ ЖӘНЕ ТАҢДАУ

Түйін

Әлемде халық санының өсуі және азық-түлік пен жемшөп тапшылығы мәселесі қайталама жанартылатын ресурстарды, атап айтқанда, құрамында целлюлоза бар ауыл шаруашылығы мен қайта өңдеу өнеркәсібінің қалдықтарын пайдалану тиімділігін арттыратын тамақ өнеркәсібі мен жемшөп өндірісі саласындағы технологияларды дамытуды талап етеді. Тағамдық және жемшөп ақуыздары мен биологиялық белсенді қосылыстар үшін жоғары сатыдағы саңырауқұлақтарды өсіру өсімдік шаруашылығының лигноцеллюлоза қалдықтарын өндеудің ең ұтымды әдісі болып табылады. Жоғары сатыдағы саңырауқұлақтардың жемісті денелерін пайдалану ет өндірісіне деген қажеттілікті айтарлықтай төмендетіп, халықты жоғары сапалы және бағалы азық-түлік өнімімен қамтамасыз етеді. Бірақ құрамында целлюлоза бар шикізатта әртүрлі зең саңырауқұлақтарының болуы жоғары сатыдағы саңырауқұлақтардың дамуын тежейді, субстратты энергияны көп қажет ететін алдын ала дайындауды қажет етеді және бұл саланың дамуына кедергі келтіреді. Зең саңырауқұлақтарына қарсы целлюлолитикалық белсенділігі бар және антагонизмі бар микроорганизмдерді қолдану мәселенің перспективалы шешімі болып табылады. Бұл зерттеуде бидай, сұлы және арпа сабанынан, сондай-ақ бұзылған ағаштан целлюлолитикалық бактериялардың 49 изоляты бөлініп алынды. Бидай сабанының ұзақ уақыт сақталған үлгілерінен целлюлолитикалық микроорганизмдерді бөліп алудың ең жоғары тиімділігі көрсетілді. Ең жоғары целлюлолитикалық белсенділікке ие изоляттардың және микроорганизмдердің коллекциялық дақылдарының ішінен *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* тұқымдастарына жататын сабаннан бұрын бөлініп алынған микромицеттердің антагонистері таңдалды. Бөлінген микроорганизмдердің *Trichoderma longibrachiatum* жоғары саңырауқұлақтарының жасыл зеңінің негізгі қоздырғыштарының біріне антагонистік белсенділігі де анықталды. Құрамында екінші ретті целлюлоза бар шикізаттың микромицеттер арамшөптеріне қарсы неғұрлым айқын целлюлолитикалық белсенділігі және антагонизмі бар 8 изолят таңдалды. Таңдалған микроорганизмдер тағам өнеркәсібі, ауыл шаруашылығы, медицина және фармацевтика үшін жоғары сатыдағы саңырауқұлақтарды өсіруде лигноцеллюлозды қалдықтарды кешенді пайдалану әдісін әзірлеу бойынша одан әрі жұмыста пайдаланылатын болады.

Кілтті сөздер: целлюлолитикалық бактериялар, антагонизм, саңырауқұлаққа қарсы белсенділік, құрамында целлюлоза бар өсімдік қалдықтары, зең саңырауқұлақтары.

IRSTI: 34.27.39, 68.03.07

D.D. BOKENOV^{1,2}, Y.A. OLENIKOVA^{1*}, Z.N. YERMEKBAY^{1,2},
D.E. ABDILMANOV^{1,2}, M.G. SAUBENOVA¹

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

ISOLATION AND SELECTION OF CELLULOLYTIC BACTERIA AND ANTAGONISTS OF SPOILING MICROMYCETES FROM CELLULOSE-CONTAINING SUBSTRATES

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.05

Abstract

The growth of the world's population and the problem of food and feed shortages require the development of technologies in the field of food and feed production, which increase the efficiency of the use of secondary renewable resources, namely cellulose-containing waste from agriculture and the processing industry. The cultivation of mushrooms to obtain food and feed protein and biologically active compounds is the most rational way to process lignocellulosic crop waste. The use of mushroom fruiting bodies can significantly reduce the need for meat production and provide the population with a high-quality and valuable food product. However, the presence of various mold fungi in cellulose-containing raw materials inhibits the development of higher fungi, requires energy-intensive preliminary preparation of the substrate, and hinders the development of this industry. The use of microorganisms with cellulolytic activity and antagonism against molds is a promising solution to the problem. In this study, 49 isolates of cellulolytic bacteria were isolated from wheat, oat and barley straw, as well as degraded wood. The highest efficiency of isolation of cellulolytic microorganisms from long-term stored samples of wheat straw has been shown. Among isolates with the highest cellulolytic activity and collection cultures of microorganisms, antagonists of micromycetes previously isolated from straw belonging to the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Fusarium* were selected. The antagonistic activity of the isolated microorganisms to one of the main mushroom pathogens *Trichoderma longibrachiatum* was also determined. Eight isolates with the most pronounced cellulolytic activity and antagonism against micromycetes spoiling secondary cellulose-containing raw materials were selected. The selected microorganisms will be used in further work on the development of a method for the integrated use of lignocellulosic waste in the cultivation of higher fungi for the food industry, agriculture, medicine and pharmaceuticals.

Keywords: cellulolytic bacteria, antagonism, antifungal activity, cellulose-containing crop waste, mold fungi.

The lack of food due to the growth of the world's population is an urgent problem that is becoming more pronounced over time. The growing population of the Earth means that more and more people need food. According to UN reports, the world's population has exceeded 8.02 billion people and will reach 9.7 billion by 2050, with most of the growth coming from less developed countries [1]. This means that the need for food will continue to grow, and there are already food shortages in some regions. On the other hand, food shortages can be caused by a number of factors, such as climate change, soil degradation, depletion of natural resources, rising costs of food production and distribution, and limited opportunities for livestock and agriculture development.

The solution to the problem of food shortage can be achieved through the improvement of livestock and agricultural technologies and the efficiency of the use of secondary resources. An important role here is played by the development of innovations and scientific research, which can help increase productivity and improve the quality of food. The use of protein from higher fungi is a good alternative to increasing meat production [2]. At present, the production of mushrooms is considered one of the most intelligent solutions that can improve the quality of human life. For centuries, mushrooms have been used in the food, medical and cosmetic industries, as well as in

folk medicine to treat various diseases. The richness in nutrients and biologically active compounds makes mushrooms a valuable source of food and medical products [3,4]. The spent mushroom substrate containing mycelium and waste of mushrooms can be a valuable feed additive for animal husbandry due to its nutritional and biological value [5-7]. Moreover, mushroom production can be environmentally friendly and efficient in terms of land use. Mushroom cultivation can be carried out on a wide range of lignocellulosic agricultural waste [8], which can help reduce the amount of waste and the negative impact on the environment. In general, mushroom production is a promising direction for the development of not only agriculture, but also medicine, food and cosmetic industries, as well as ecology.

To ensure the stable growth of mushrooms, appropriate pretreatment of the substrate is required, aimed at suppressing the growth of contaminating micromycetes [8, 9]. One of the most promising solutions to this problem is the use of microorganisms that exhibit both cellulolytic and antagonistic activity. The presence of cellulolytic activity in such microorganisms will contribute to the pretreatment of the substrate for the cultivation of higher fungi, and the antagonism against contaminating and competing micromycetes will ensure the controllability of the cultivation process. The aim of this study was to isolate cellulolytic bacteria from natural substrates and obtain isolates with high cellulase and antagonistic activity for further use in the cultivation of higher fungi.

Materials and methods of research

For the isolation of cellulolytic bacteria, straw of cereal crops such as barley, oats and wheat, as well as wood destroyed by carpenter beetles, were used. The collection of cellulose-containing plant residues was carried out with sterile tweezers and placed in a sterile container. Cellulolytic bacteria were isolated on Getchinson's elective dense nutrient medium with Na-carboxymethylcellulose (Na-CMC) as the sole source of carbon and energy. To suppress the growth of fungal microorganisms, the antibiotic nystatin was added to the medium. For isolation on an agar medium, finely chopped pieces of straw were laid out on plates with a nutrient medium and cultivated in a thermostat at 37°C for 3 days. To obtain enrichment cultures, Getchinson's liquid medium with wheat straw was used and incubated for 14 days at a temperature of 37°C. Isolation of pure cultures of cellulolytic bacteria was carried out by seeding from serial dilutions of enrichment cultures on Getchinson's agar nutrient medium with the addition of Na-CMC. The purity of isolated cultures of microorganisms was checked visually and by microscopy.

For defining the cellulolytic activity, bacteria were cultivated in liquid Getchinson's medium with filter paper. The inoculated tubes were incubated in a thermostat at 30°C for up to 40 days. The degree of cellulose decomposition was determined visually as a percentage and expressed symbolically in accordance with table 1.

Table 1 - The level of cellulolytic activity of cellulose-destroying bacteria

Cellulolytic activity	Designation	Degree of decomposition of filter paper, %	Description
High	+++	50-70	The disintegration of the filter paper into small pieces, the formation of thick mud.
Medium	++	30-40	Significant decomposition while partly maintaining the integrity of the paper.
Weak	+	10-20	The formation of turbidity, the decomposition of part of the paper.
Very weak	±	<10	The formation of turbidity.

To determine the antagonistic activity of the selected isolates, contaminating micromycetes of the genera *Penicillium* sp. Psh 2-2, *Aspergillus niger* Psh 1-1 and *Fusarium* sp. Yach-1, isolated from various types of straw, as well as two strains of the green mold pathogen *Trichoderma*

longibrachiatum V and *T. longibrachiatum* VG, previously isolated from oyster mushrooms and an unidentified agaric fungus were used [9]. Antagonistic activity was determined both in new isolates of cellulolytic bacteria and in mycoorganisms from the collection of antagonists of the laboratory of food microbiology.

Determination of the antagonistic activity of associations was carried out by agar well diffusion assay and by co-cultivation on a surface of nutrient medium. For the lawn of the fungus, Czapek 7 medium was used. Mycelial fungi were preliminarily cultivated in Czapek 7 liquid medium on a piece of cotton wool at 30°C for 7 days. Sowing of test molds to obtain a lawn was carried out on the surface of a Petri dish. Further, wells 10 mm in diameter were prepared in the lawn, into which the culture liquids of the studied cellulolytic bacteria were introduced. The plates were incubated up to 5-7 days at 30°C. The experiments were repeated in 3 replications. The results were expressed as mean and error of the mean.

Co-cultivation was also used to detect antagonism of the isolates against *T. longibrachiatum*. A mixture of Wort Agar and Getchinson medium with Na-CMC (1:1) was used as a nutrient medium. *Trichoderma* was seeded in the middle of the plate by the stroke method, and cellulolytic bacteria antagonists were seeded along the edges of the cup at a distance of 2-3 cm from the *Trichoderma* streak. The plates were cultivated at 30°C for 7 days.

Results and discussion

Cellulolytic bacteria were isolated from enrichment cultures using various cellulose-containing substrates and from the surface of straw. A total of 49 isolates were obtained. 17 isolates were isolated from samples of wheat straw, 9 from barley straw, 10 from oat straw, and 13 isolates from destroyed wood and excretions of carpenter beetles.

The isolates from various sources differed significantly in the efficiency of cellulose decomposition. Of the 17 isolates from wheat straw, 6 had high cellulolytic activity, 6 - medium. Of the 9 isolates isolated from barley straw, only 2 showed moderate activity, while the rest weakly and very weakly decomposed filter paper cellulose (Table 2).

Only 1 out of 10 isolates from oat straw showed high cellulolytic activity. From the destroyed wood, 3 isolates with high cellulolytic activity were obtained. Overall, 20.4% of the isolates digested cellulose well.

The highest cellulolytic activity was noted in isolates Psh 2-2, Psh 2-3, Psh 2-4, Psh 2 III, Psh 3-1 and Psh 3-2 from wheat straw, isolate Ov 2 from oat straw, Dv 3 I, Dv III and Dv 4 I from destroyed wood. Isolates from barley and oat straw were characterized by the weakest cellulolytic activity, and from wheat – by the highest. These differences in the activity of isolates, apparently, are associated not with the different composition of wheat and barley straw, but with taking several samples of wheat straw for research, some of which were stored for a long time, which allowed cellulolytic bacteria to develop in these samples. Thus, the data presented in Table 2 show that all 7 isolates from a wheat sample with traces of spoilage showed high or medium cellulolytic activity. Two out of five isolates from the 2015 harvest straw had a high ability to decompose cellulose, and microorganisms with high cellulolytic activity were not detected in the 2020 straw sample. Isolates of highly active cellulolytic bacteria from degraded wood were also obtained from older samples of highly degraded wood. The isolate from the secretions of the carpenter beetle showed an average level of activity.

As a result of the study, 19 isolates of cellulolytic bacteria with high and medium cellulolytic activity were selected: 12 ones from the samples of wheat straw, 2 from barley straw, 1 from oat straw, and 4 from destroyed wood. These isolates were tested for the ability to suppress the growth of micromycetes spoiling substrates for mushroom cultivation.

The data on the investigation of the antifungal activity of selected isolates of cellulolytic bacteria and collection bacteria antagonists is shown in table 3.

Table 2 - Cellulolytic activity of isolated microorganisms

Selection source	Isolate	Level of cellulolytic activity	Isolate	Level of cellulolytic activity
Wheat straw, harvest 2020	Psh 1-1	+	Psh 1 I	+
	Psh 1-2	++	Psh 1 II	±
	Psh 1-3	++		
Wheat straw with traces of spoilage	Psh 2-1	++	Psh 2 I	++
	Psh 2-2	+++	Psh 2 II	++
	Psh 2-3	+++	Psh 2 III	+++
	Psh 2-4	+++		
Wheat straw, harvest 2015	Psh 3-1	+++	Psh 3 II	±
	Psh 3-2	+++	Psh 3 III	++
	Psh 3 I	±		
Barley straw, harvest 2020	Yach 1	++	Yach II	±
	Yach 2	++	Yach III	±
	Yach 3	+	Yach 3 I	±
	Yach 4	±	Yach 3 II	±
	Yach I	±		
Oat straw, harvest 2019	Ov 1	+	Ov 6	±
	Ov 2	+++	Ov 7	+
	Ov 3	±	Ov 8	±
	Ov 4	±	Ov 9	±
	Ov 5	+	Ov 10	+
Various samples of destroyed wood	Dv 1 I	±	Dv 3 I	+++
	Dv 1 II	±	Dv 3 II	±
	Dv I	±	Dv 3 III	±
	Dv 2 I	+	Dv III	+++
	Dv 2 II	±	Dv 4 I	+++
	Dv II	+	Dv 4 II	+
Excretions of the carpenter beetle	Dv 1	++	Control	-

As can be seen from the results presented in the table, antagonistic activity against all four test filamentous fungi was detected in 10 isolates, of which 4 are new and 6 are collection ones. Six new and one collection isolates suppressed three of the four fungal tests. The most pronounced antagonism was shown among the new isolates Psh 2-2, Psh 2-3, Psh 2 III, Psh 3-1, Psh 3-2, Bl 2, Dv 1, Dv III and Dv 4 I, seven of which had the highest cellulolytic activity, despite the fact that the presence of cellulose in the cell wall is not characteristic of ascomycete fungi [10]. The likely reason is the broader specificity of a number of glycosidase enzymes [11], as well as the complex composition of the cell walls of filamentous fungi, which include, in addition to chitin, also glucans and other polymers [10]. At the same time, the presence of lytic activity is not always a sign of the presence of antagonistic activity [12].

In the study of antagonism against *Trichoderma*, which are the main pathogens of the oyster mushroom [13,14], the highest antagonistic activity of new isolates Psh 2-3, Psh 2 III, Psh 3-2 was shown. Among the collection microorganisms, *Bacillus* sp CB 1-2, *Bacillus* sp. 98, and isolates Bl 2, PG 1-2 and PG 6 were the best. The effect of isolated and collection bacteria on the growth of *T. longibrachiatum* during co-cultivation on one Petri dish is shown in Figure 1. The results obtained demonstrate the dependence of the obtained results concerning the level of antagonistic activity of microorganisms on the research method used. Thus, when co-cultivated, isolates PG 3, Bl 2, and Dv 4 I did not show antagonism against *T. longibrachiatum* V, although positive results were obtained in the study of the effect by the method of delayed antagonism.

Table 3 - Antifungal activity of isolates of cellulolytic bacteria and collection antagonistic bacteria

No	Isolate	Diameter of growth/sporulation stunting zones*, mm			
		<i>Penicillium</i> sp. Psh 2-2	<i>Fusarium</i> sp. Yach-1	<i>Aspergillus</i> <i>niger</i> Psh 1-1	<i>T. longibrachiatum</i> V
1	Psh 1-2	0	0	14,0*±1,0	15,0*±1,0
2	Psh 1-3	13,0*±1,0	0	0	0
3	Psh 2-1	0	0	23,0*±1,0	0
4	Psh 2-2	12,0*±0,0	0	15,0*±0,0	28,0*±1,5
5	Psh 2-3	22,0*±1,0	12±1,0	30,0*±0,5	20,0±3,0 30,0*±5,0
6	Psh 2-4	0	0	12,0*±1,0	0
7	Psh 2 I	0	0	34,0*±4,0	11,0*±1,0
8	Psh 2 III	44,0±6,5	0	41,5*±1,5	32,0±8,0 37,0*±3,0
9	Psh 2 II	0	0	15,0*±0,0	11,0±1,0 12,5*±2,5
10	Psh 3-1	18,0±1,0	12,0*±0,0	19,0*±1,0	23,0*±1,5
11	Psh 3-2	12,0±0,0 17,0*±1,0	15,0*±0,0	23,0*±3,0	30,0*±1,0
12	Psh 3 III	0	0	0	0
13	Yach 1	20,0±0,0	0	0	28,0*±1,0
14	Yach 2	17,0±3,0	18,0±3,0	0	17,0±0,0 30,0*±1,0
15	Ov 2	0	0	0	0
16	Dv 1	25,0±5,0	12,0±1,0	21,0*±5,7	33,0±6,5
17	Dv 3 I	0	0	0	0
18	Dv III	20,0±5,0	0	30,0*±2,5	29,5*±2,5
19	Dv 4 I	12,5±2,5	0	15,0*±1,0	35,0±10,0
20	PG 1 cv.	0	22,0±3,5	13,0*±1,0	18,5±1,5
21	<i>Bacillus</i> sp. 98	27,5±3,0	35,6±2,7	28,5±1,5 40,0*±4,5	26,0±3,0
22	<i>Bacillus coagulans</i> 17	0	0	0	0
23	PG 1-2	30,2±4,5	27,5±1,5	35,0±3,0	25,0±2,5
24	PG 3	11,0*±1,0	23,5±0,5	15,0±1,0	16,2±2,1
25	PG 6	20,6±0,6	22,0±1,0	10,5*±0,5	22,0±1,0
26	PG	0	20,5±1,5	11,0*±1,0	15,0±1,5
27	<i>Bacillus</i> sp. CB 1-2	32,0±1,0	35,3±4,7	30,5±1,2	38,0±3,5
28	Bl 2	16,0±0,5	20,0±1,0	38,4±2,7	19,5±1,5

Conclusion

Based on the results of the studies, 3 isolates of newly selected cellulolytic bacteria and 5 isolates from the collection were picked out. The selected microorganisms had both a pronounced cellulolytic activity and antagonism against the most common molds of cellulose-containing crop wastes. Further work will be aimed at studying the relationship of selected microorganisms with the higher fungus oyster mushroom and the selection of satellite microorganisms for preliminary preparation of the substrate during the cultivation of the mushroom. The data obtained will contribute to the development of an integrated method for processing cellulose-containing crop waste using higher fungi.

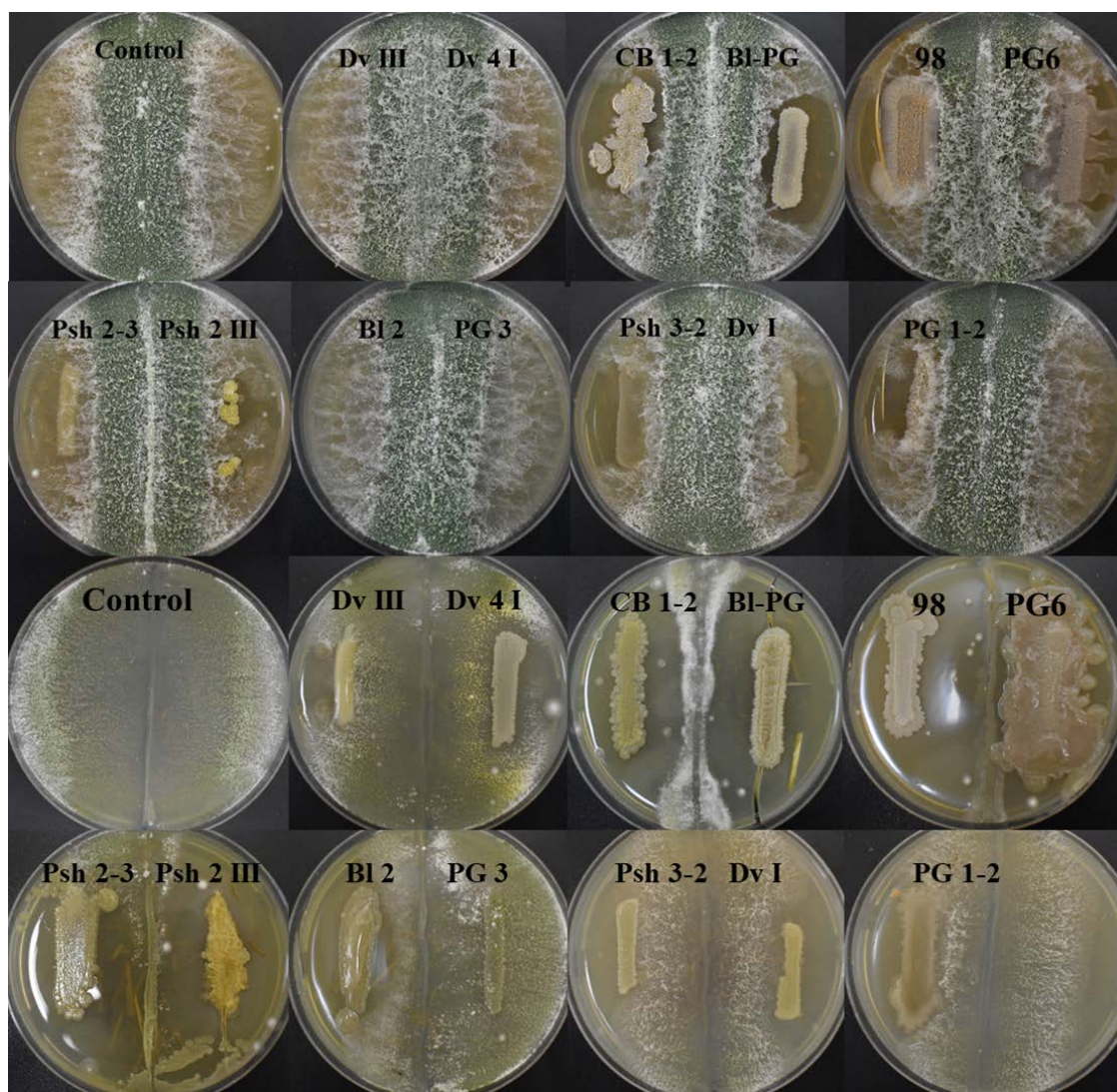


Figure 1 - Antifungal activity of cellulolytic bacteria against *T. longibrachiatum* V (top) and *T. longibrachiatum* VG (bottom)

Funding

This research was funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. AP09258654).

References:

- 1 Saubenova, M., Olejnikova, E., Ermekbaj, Zh., Ajtzhanova A., Bokenov, D., Potoroko, I. Mikrobiologicheskie aspekty vyrashhivaniya vysshih gribov. Mikrobiologiya zhәне virusologiya, 2021, 3 (34): 4–36 (doi: 10.53729/MV-AS.2021.03.01)
- 2 Li C., Xu S. Edible mushroom industry in China: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2022, 106(11): 3949-3955 (doi: 10.1007/s00253-022-11985-0)
- 3 Sun Y., Zhang M., Fang Z. Efficient physical extraction of active constituents from edible fungi and their potential bioactivities: A review. *Trends Food. Sci. Technol.*, 2020, 105: 468–482 (doi: 10.1016/j.tifs.2019.02.026)
- 4 Martinez-Medina G.A., Chávez-González M.L., Verma D.K., Prado-Barragán L.A., Martínez-Hernández J.L., Flores-Gallegos A.C., Thakur M., Srivastav P.P., Aguilar C.N. Bio-funcional components in mushrooms, a health opportunity: Ergothionine and huitlacoche as recent trends. *J. Funct. Foods*, 2021, 77: 1-17 (doi: 10.1016/j.jff.2020.104326)
- 5 van Kuijk S.J.A., Sonnenberg A.S.M., Baars J.J.P., Hendriks W.H., Cone J.W. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review. *Biotechnol. Adv.*, 2015, 33(1): 191-202 (doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.014)

6 Ivarsson E., Grudén M., Södergren J., Hultberg M. Use of faba bean (*Vicia faba* L.) hulls as substrate for *Pleurotus ostreatus* – Potential for combined mushroom and feed production. *J. Clean Prod.*, 2021, 313: 127969 (doi: 10.1016/j.jclepro.2021.127969)

7 Leong Y.K., Ma T.W., Chang J.S., Yang F.C. Recent advances and future directions on the valorization of spent mushroom substrate (SMS): A review. *Biores. Technol.*, 2022, 344(A): 126157 (doi: 10.1016/j.biortech.2021.126157)

8 Saubenova M., Oleinikova Y., Sadanov A., Yermekbay Z., Bokenov D., Shorabaev Y. The input of microorganisms to the cultivation of mushrooms on lignocellulosic waste. *AIMS Agriculture and Food*, 2023, 8(1): 239-277 (doi: 10.3934/agrfood.2023014)

9 Ermekbay Zh., Olejnikova E., Daugaljeva S., Bokenov D., Saubenova M., Altekej A., Ajtzhanova A. Vydelenie mikromicetov zasoritelej lignocelljuloznyh othodov zlakovyh kul'tur. *Mikrobiologija zhəne virusologija*, 2022, 4(39): 45–64 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.04)

10 Feofilova E.P. Kletochnaja stenka gribov: sovremennye predstavlenija o sostave i biologicheskoj funkcii. *Mikrobiologija*, 2010, 79(6): 723-733 (https://elibrary.ru/download/elibrary_15523903_39962136.pdf)

11 Rabinovich M. L., Mel'nik M. S. Progress v izuchenii celljuloliticheskikh fermentov i mehanizm biodegradacii vysokouporjadochennyh form celljulozy. *Uspehi sovremennoj biologii*, 2000, 40: 205-266 (<https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/10/rabinovich.pdf>)

12 Sindhu S.S., Dadarwal K.R. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiological Research*, 2001, 156(4): 353-358 (doi: 10.1078/0944-5013-00120)

13 Kredics L., Kocsubé S., Nagy L., Komoń-Zelazowska M., Manczinger L., Sajben E., Nagy A., Vágvölgyi C., Kubicek C.P., Druzhinina I.S., Hatvani L. Molecular identification of *Trichoderma* species associated with *Pleurotus ostreatus* and natural substrates of the oyster mushroom. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, 300: 58-67 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01765.x)

14 Al-Ani B.M., Owaid M.N., Al-Saeedi S.S.S. Fungal interaction between *Trichoderma* spp. and *Pleurotus ostreatus* on the enriched solid media with licorice *Glycyrrhiza glabra* root extract. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(3): 268-273 (doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.08.001)