

МРНТИ: 34.27.19, 34.27.23, 68.35.71, 62.09.37

Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, С.Т. ДАУГАЛИЕВА¹, Д.Д. БОКЕНОВ¹,
М.Г. САУБЕНОВА¹, А.Б. АЛТЕКЕЙ², А.А. АЙТЖАНОВА¹

¹ Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

² Южно-Казахстанский университет им. М. Ауэзова, Шымкент, Казахстан

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

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ - ЗАСОРИТЕЛЕЙ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ОТХОДОВ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.04

Аннотация

Вторичное лигноцеллюлозное сырье является самым крупномасштабным возобновляемым ресурсом на планете. Пожнивные остатки, в частности солома злаковых культур, повсеместно сжигаются, создавая угрозу экологии. Одним из способов использования вторичного лигноцеллюлозного сырья является культивирование высших грибов. Однако энергоемкость термической предобработки субстрата для выращивания грибов ограничивает их производство. В данной работе выделено 23 изолята плесневых грибов, засоряющих пшеничную, ячменную и овсяную солому. Выделено 2 штамма гриба *Trichoderma longibrahmatum*, являющегося патогеном высших целлюлозоразрушающих грибов. Изолировано два штамма *Pleurotus ostreatus* для дальнейшей работы по защите субстрата для культивирования с помощью микроорганизмов антагонистов.

Ключевые слова: возобновляемое лигноцеллюлозное сырье, культивирование съедобных грибов, плесневые грибы, вешенка обыкновенная, триходерма.

Лигноцеллюлозные отходы культивирования различных сельскохозяйственных культур являются самым распространенным возобновляемым целлюлозосодержащим сырьем на планете [1, 2]. Массовое сжигание пожнивных остатков на полях приводит к ухудшению экологической ситуации и потере ценных ресурсов. В мировой практике существуют различные направления использования лигноцеллюлозных отходов сельскохозяйственных культур, включая получение биотоплива [3-6], компостирование [7-9], применение в качестве биоудобрения для стимуляции роста растений и улучшения структуры почвы [10, 11], продукцию ценных соединений [12-14]. Постоянно продолжается поиск новых способов и работа над повышением экономической эффективности использования лигноцеллюлозных отходов для получения продуктов с высокой добавленной стоимостью.

Одним из путей утилизации целлюлозосодержащих отходов является производство высших целлюлозоразлагающих грибов, отличающееся быстрыми темпами отдачи урожая и большой популярностью продукции [15-18]. Высшие грибы не только являются высокопитательным и деликатесным продуктом питания, но также служат источником биологически активных веществ, используемых в медицине для лечения ряда заболеваний, в первую очередь в качестве противоопухолевых и иммуномодулирующих средств [19-21]. В последние годы доказано влияние грибных полисахаридов и на кишечную микробиоту, продуцирующую короткоцепочечные жирные кислоты [22, 23].

Производство высших грибов осуществляется методом твердофазной ферментации целлюлозосодержащего сырья [24]. Отработанный субстрат, представляющий собой биомассу, обогащенную белками, витаминами, гидролитическими ферментами и другими биологически активными веществами, может быть использован в качестве кормовых добавок [25-27].

Однако производство грибов ограничивает энергоемкость термической подготовки субстрата для их выращивания [28]. При несоблюдении правил асептики происходит бурное развитие конкурирующих микроорганизмов, преимущественно плесневых грибов, накапливающих микотоксины и подавляющих развитие высшего гриба вплоть до полной потери урожая. Поскольку экономические показатели производства высших грибов в значительной степени определяются энергетическими затратами на стерилизацию субстрата, для его биологической защиты могут быть использованы антагонистически активные штаммы микроорганизмов. Использование биопротекции не только уменьшает до минимума риск заражения субстрата конкурентными микроорганизмами, исключая необходимость соблюдения стерильных условий, но и позволяет получить качественную питательную селективную среду для грибов и повысить урожайность гриба [29, 30].

Для подбора антагонистов микромицетов-засорителей субстрата для культивирования гриба вешенка на первом этапе было произведено выделение плесневых грибов.

Объекты и методы исследования

Поскольку солома, преимущественно пшеничная, является основным субстратом, применяемым для культивирования высших грибов, для выделения микромицетов-засорителей использовали главным образом солому: 3 образца пшеничной соломы (2015 и 2020 годов сбора, а также старая солома со следами порчи), ячменную (2020 г.) и овсяную солому (2019 г.). Отобраны также два образца плодовых тел гриба вешенка обыкновенная и мицелий целлюлозоразрушающих грибов (2 образца) из полуразрушенной древесины.

Мицелий вешенки получали на сусло-агаре (Wort agar, TM Media, India). Плесневые грибы выделяли на среде Чапека (г/л): сахароза 30,0; NaNO_3 2,0; KH_2PO_4 1,0; MgSO_4 0,5; KCl 0,5; агар-агар 20,0; вода водопроводная. Стерилизация при 1 атм. (121 °C) – 20 мин.

Для изоляции грибов образцы соломы и части плодовых тел вешенки раскладывали на поверхности агаризованной среды в чашках Петри. Поверхность плодовых тел вешенки предварительно обрабатывали этиловым спиртом, стерильно разрезали и использовали внутренние части гриба для посева. Грибы культивировали при 28–30 °C до 7 суток. Затем грибы рассевали для получения чистых культур. Выделенные культуры хранили на скошенном агаре в холодильнике при 5 °C.

Видовую принадлежность грибов вешенка и триходерма определяли секвенированием ITS (Internal transcribed spacer) региона по методу Сенгера.

Для построения филогенетического дерева проводили сравнение ITS региона исследуемого образца с последовательностями референтных штаммов, размещенных в Международной базе данных Blast Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Построение дерева производили в программе Mega 11, последовательности выравнивали по ClustalW.

Результаты и обсуждение

При помещении различных образцов соломы на поверхность питательной среды было выявлено значительное разнообразие плесневых грибов. Для выделения были отобраны микромицеты четко различающейся морфологии с каждого исходного субстрата. Грибы были пересеяны неоднократно до получения чистой культуры. В целом, из образцов соломы выделено 23 изолята плесневых грибов: 14 - из пшеничной соломы, 5 - из ячменной и 4 - из овсяной (таблица 1, рисунок 1).

Особенности морфологии выделенных изолятов при росте на среде Чапека представлены в таблице 1. Наиболее частыми изолятами с различных образцов пшеничной соломы были микромицеты родов *Fusarium*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Ранее было показано, что грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium* являются основными засорителями различных растительных субстратов [31]. Присутствие плесневых грибов рода *Fusarium* по-видимому

Таблица 1 - Мицелиальные грибы с поверхности соломы – потенциальные засорители производства высших грибов

Источник выделения	Номер изолята	Субстратный мицелий	Воздушный мицелий	Продукция пигмента в среду	Примечание
1	2	3	4	5	6
Пшеничная солома 1 (урожай 2020 г)	Пш 1-1	Белый	Черный	Отсутствует	По морфологии роста и плодоношения соответствует <i>Aspergillus niger</i>
	Пш 1-2	Белый	Синевато-зеленый	Отсутствует	По морфологии роста и плодоношения соответствует <i>Penicillium</i> sp.
	Пш 1-3	Серовато-белый	Желтовато-белый	Еле заметный серовато-желтоватый	Предположительно <i>Fusarium</i> sp.
	Пш 1-4	Темно-бурый	Бурый	Отсутствует	-
	Пш 1-5	Темно-бурый или серый	Серо-бежевый равномерный с зеленовато-серыми хохлами	Черный	-
	Пш 1-6	Сероватый или темнее	Сероватый	Буровато-коричневый	Колонии мелкие, 5-7 мм диаметром, иногда с серыми или буроватыми кольцами и конденсатом.
Пшеничная солома 2 (порченная)	Пш 2-1	Сероватый, вид снизу буроватый	Зеленовато-серый	Бледно-бурый	-
	Пш 2-2	Белый	Серо-зеленый	Очень слабый желтоватый	По морфологии роста и плодоношения соответствует <i>Penicillium</i> sp.
	Пш 2-3	Кремовато-серовато-белый	Кремовато-серовато-белый	Отсутствует	Мицелий равномерный невысокий
	Пш 2-4	Серо-бурый, снизу бурый	Буровато-серый	Слабый серовато-бурый	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Пшеничная солома 3 (урожай 2015 г.)	Пш 3-1	Белый	Черный	Отсутствует	По морфологии роста и плодоношения соответствует <i>A. niger</i>
	Пш 3-2	Белый	Белый с темно-серыми конидиями	Отсутствует	Мицелий высокий, равномерный, предположительно <i>Mucor</i> sp.
	Пш 3-3	Белый	Серо-зеленый	Отсутствует	По морфологии роста и плодоношения соответствует <i>Penicillium</i> sp.
	Пш 3-4	Бежегато-белый	Бежегато-белый	Очень слабый желтоватый	Мицелий невысокий, равномерный
Ячменная солома	Яч-1	Белый, местами с розоватым оттенком	Белый	Слабый коричневатого-желтый	Воздушный мицелий равномерный, предположительно <i>Fusarium</i> sp.
	Яч-2	Белый	Серовато-бурый	Отсутствует	По морфологии роста и плодоношения соответствует <i>Aspergillus</i> sp.
	Яч-3	Черно-бурый	Серый	Отсутствует	-
	Яч-4	Молочно-белый	Белый	Очень слабый желтый	Воздушный мицелий равномерный, предположительно <i>Fusarium</i> sp.
	Яч-5	Черновато-оливковый	Серый с желтовато-зеленоватыми хохлами	Бурый	-
Овсяная солома	Ов-1	Белый	Белый	Отсутствует	Воздушный мицелий высокий, плотный, похож на комки ваты, предположительно <i>Fusarium</i> sp.
	Ов-2	Белый	Розовато-бежеватый	Отсутствует	Предположительно <i>Fusarium</i> sp.
	Ов-3	Сероватый	Сероватый	Светло-бурый	Мицелий не высокий
	Ов-4	Черноватый	Серый	Розовато-бурый	-

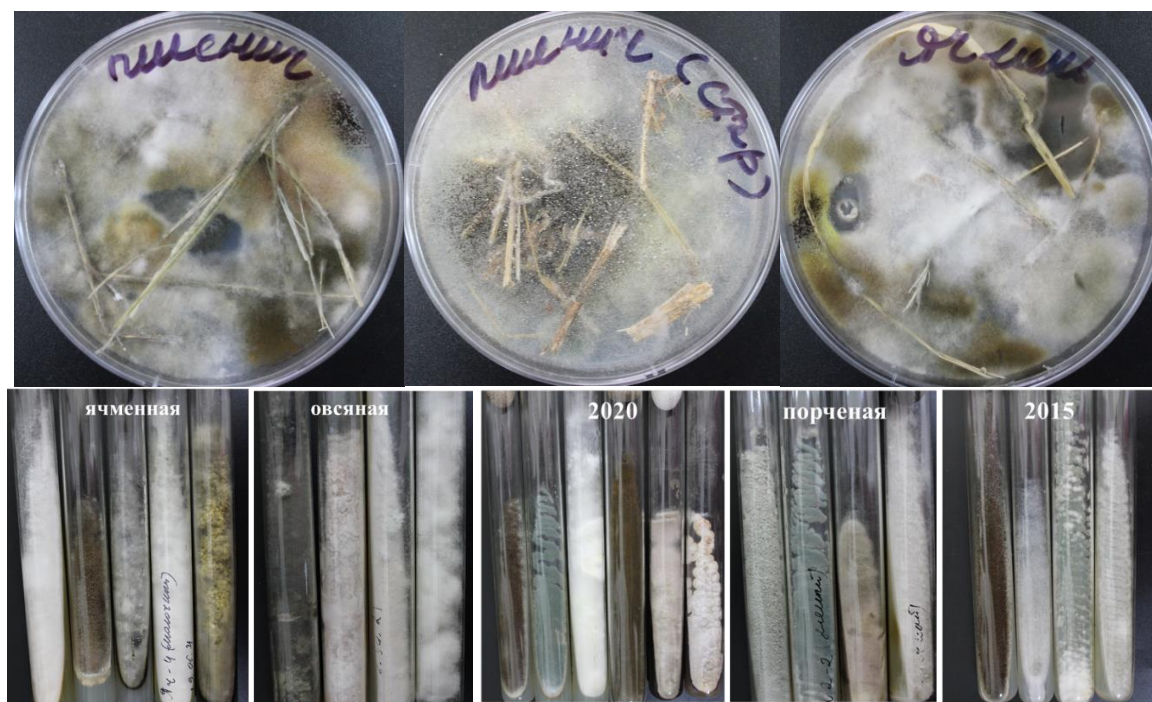
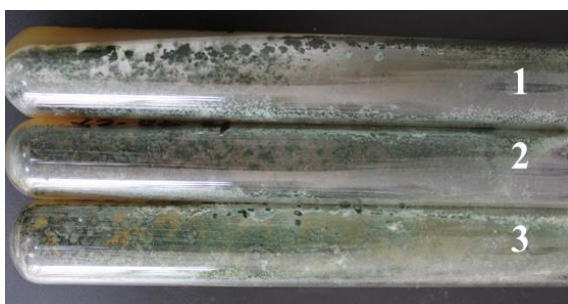


Рисунок 1 – Микромицеты-засорители различных образцов пшеничной, ячменной и овсяной соломы

объясняется их широким распространением в качестве фитопатогенов зерновых культур [32, 33]. Свежая солома характеризовалась более широким набором мицелиальных грибов различной родовой принадлежности. В ней встречались также грибы с серой, бурой и оливковой окраской мицелия. Однако при хранении количество плесневых грибов с такой пигментацией мицелия на поверхности соломы сокращалось, начинали доминировать роды *Penicillium*, *Aspergillus* и *Mucor*. Интересно, что грибы рода *Penicillium* не были выделены из ячменной и овсяной соломы, а *Fusarium* был представлен практически во всех образцах.

Из плодовых тел гриба вешенка и целлюлозоразрушающего гриба, изолированного из полуразрушенного пня, выделены изоляты мицелиальных грибов зеленой окраски, предположительно относящиеся к роду *Trichoderma*. Известно, что плесневые грибы рода *Trichoderma* вызывают потери урожая высших базидиальных грибов, в частности вешенки, во всем мире на протяжении последних 25 лет [34-37]. В нашем исследовании виды рода *Trichoderma* не были выявлены на поверхности пшеничной, ячменной или овсяной соломы, однако были выделены из плодовых тел и мицелия целлюлозоразрушающих грибов, в том числе из коммерчески доступных образцов вешенки обыкновенной.

На рисунке 2 показан рост изолятов *Trichoderma* из плодовых тел вешенки и мицелия целлюлозоразрушающего гриба.



Примечание – 1, 2 изоляты из плодового тела вешенки обыкновенной; 3 из мицелия целлюлозоразрушающего гриба.

Рисунок 2 – Изоляты гриба *Trichoderma* из целлюлозоразрушающих грибов

Проведен молекулярно-генетический анализ двух вариантов гриба вешенка обыкновенная (V1 и V2) и полученных из них изолятов *Trichoderma* sp. V и *Trichoderma* sp. VG.

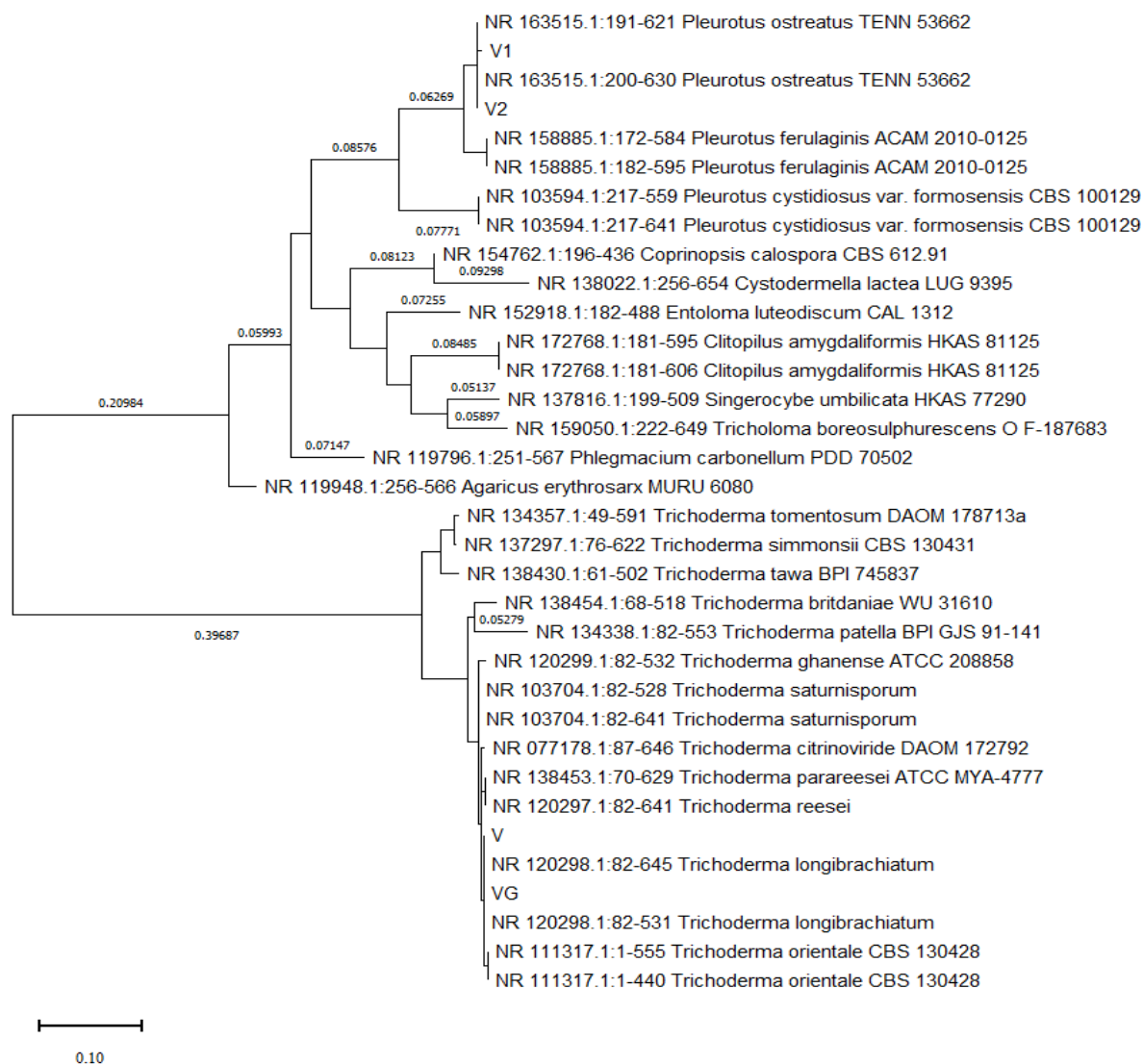


Рисунок 3 – Филогенетическое древо изолятов гриба вешенка обыкновенная (V1 и V2) и грибов рода триходерма (V и VG) из плодовых тел вешенки

Грибы рода *Trichoderma* отнесены к виду *Trichoderma longibrachiatum*. Из литературных данных известно, что *T. longibrachiatum* наряду с видом *Trichoderma harzianum* является причиной зеленой плесени при производстве различных высших грибов [35, 38].

Закключение

Таким образом, в целом было выделено 23 изолята плесневых грибов с поверхности различных образцов соломы: 14 изолятов - из пшеничной соломы, 5 - с ячменной, 4 - с овсяной соломы. Получено 2 штамма гриба *P. ostreatus* (вешенка обыкновенная) и 2 штамма гриба *T. longibrachiatum*, являющегося патогеном *P. ostreatus*.

Отобранные культуры микромицетов-засорителей и штаммы *T. longibrachiatum* будут использованы для выделения бактерий антагонистов при разработке комплексного метода утилизации соломы с применением высшего гриба *P. ostreatus*.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке КН МНВО РК (грант № AP09258654).

Литература:

- 1 Adhikari S., Nam H., Chakraborty J. P. Conversion of solid wastes to fuels and chemicals through pyrolysis // Waste Biorefinery. Eds: Bhaskar T., Pandey A., Mohan S.V., Lee D.J., Khanal S.K. - Amsterdam, Oxford, Cambridge: Elsevier, 2018. – P. 239-263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63992-9.00008-2>
- 2 Ali N., Zhang Q., Liu Z., Li F., Lu M., Fang X. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products // Appl Microbiol Biotechnol. – 2020. – Vol. 104(2). – P. 455-473. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10158-w>
- 3 Zhang J., Rentizelas A., Zhang X., Li J. Sustainable production of lignocellulosic bioethanol towards zero waste biorefinery // Sustainable Energy Technologies and Assessments. – 2022. – Vol. 53, Part C. – Art. ID 102627. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102627>
- 4 Bhujbal S.K., Ghosh P., Vijay V.K., Rathour R., Kumar M., Singh L., Kapley A. Biotechnological potential of rumen microbiota for sustainable bioconversion of lignocellulosic waste to biofuels and value-added products // Science of the Total Environment. – 2022. – Vol. 814. – Art. ID 152773. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152773>
- 5 Naik G.P., Poonia A.K., Chaudhari P.K. Pretreatment of lignocellulosic agricultural waste for delignification, rapid hydrolysis, and enhanced biogas production: A review // Journal of the Indian Chemical Society. – 2021. - Vol. 98, Issue 10. – Art. ID 100147. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100147>
- 6 Nahak B.K., Preetam S., Sharma D., Shukla S.K., Syväjärvi M., Toncu D.C., Tiwari A. Advancements in net-zero pertinency of lignocellulosic biomass for climate neutral energy production // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2022. – Vol. 161. – Art. ID 112393. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112393>
- 7 Greff B., Szigeti J., Nagy Á., Lakatos E., Varga L. Influence of microbial inoculants on co-composting of lignocellulosic crop residues with farm animal manure: A review // Journal of Environmental Management. – 2022. – Vol. 302, Part B. – Art. ID 114088. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114088>
- 8 Harindintwali J.D., Zhou J., Yu X. Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria: A novel tool for environmental sustainability // Science of the Total Environment. – 2020. – Vol. 715. – Art. ID 136912. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136912>
- 9 Jin X., Ai W., Zhang Y., Dong W. Application of functional microbial agent in aerobic composting of wheat straw for waste recycling // Life Sciences in Space Research. – 2022. – Vol. 33. – P. 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2022.02.002>
- 10 Shinde R., Shahi D.K., Mahapatra P., Naik S.K., Thombare N., Singh A.K. Potential of lignocellulose degrading microorganisms for agricultural residue decomposition in soil: A review // Journal of Environmental Management. – 2022. – Vol. 320. – Art. ID 115843. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115843>
- 11 Lin L., Zheng Z., Hua T., Ashraf U., Hamoud Y.A., Alaa Al Aasmi, Xiangru T., Meiyang D., Wang Zaiman, Shenggang P. Nitrogen deep placement combined with straw mulch cultivation enhances physiological traits, grain yield and nitrogen use efficiency in mechanical pot-seedling transplanting rice // Rice Science. – 2022. – Vol. 29, Issue 1. – P. 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2021.12.008>
- 12 Wang J., Liu S., Huang J., Qu Z. A review on polyhydroxyalkanoate production from agricultural waste Biomass: Development, Advances, circular Approach, and challenges // Bioresource Technology. – 2021. – Vol. 342. – Art. ID 126008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126008>
- 13 Son J., Joo J.C., Baritugo K.A., Jeong S., Lee J.Y., Lim H.J., Lim S.H., Yoo J.I., Park S.J. Consolidated microbial production of four-, five-, and six-carbon organic acids from crop residues: Current status and perspectives // Bioresour Technol. – 2022. – Vol. 351. – Art. ID 127001. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127001>
- 14 Safian M.T., Sekeri S.H., Yaqoob A.A., Serrà A., Jamudin M.D., Mohamad Ibrahim M.N. Utilization of lignocellulosic biomass: A practical journey towards the development of emulsifying agent // Talanta. – 2022. – Vol. 239. – Art. ID 123109. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123109>
- 15 Zhang H.L., Wei J.K., Wang Q.H., Yang R., Gao X.J., Sang Y.X., Cai P.P., Zhang G.Q., Chen Q.J. Lignocellulose utilization and bacterial communities of millet straw based mushroom (*Agaricus bisporus*) production // Sci Rep. – 2019. – Vol. 9. – P. 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37681-6>

16 Melanouri E.M., Dedousi M., Diamantopoulou P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase // Carbon Resour Convers. – 2022. – Vol. 5, Issue 1. – P. 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.004>

17 Raman J., Jang K., Oh Y., Oh M., Im J., Lakshmanan H., Sabaratnam V. Cultivation and nutritional value of prominent *Pleurotus* spp.: An overview // Mycobiology. – 2021. – Vol. 49, Issue 1. – P. 1-14. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1835142>

18 Ritota M., Manzi P. *Pleurotus* spp. cultivation on different agri-food by-products: Example of biotechnological application // Sustainability. – 2019. – Vol. 11, Issue 18. – Art. ID 5049. <https://doi.org/10.3390/su11185049>

19 Yadav D., Negi P.S. Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits // Food Research International. – 2021. – Vol. 148. – Art. ID 110599. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110599>

20 Motta F., Gershwil M.E., Selmi C. Mushrooms and immunity // Journal of Autoimmunity. – 2021. – Vol. 117. – Art. ID 102576. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102576>

21 Rizzo G., Goggi S., Giampieri F., Baroni L. A review of mushrooms in human nutrition and health // Trends in Food Science and Technology. – 2021. – Vol. 117. – P. 60-73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.025>

22 Li M., Yu L., Zhao J., Zhang H., Chen W., Zhai Q., Tian F. Role of dietary edible mushrooms in the modulation of gut microbiota // J Funct Foods. – 2021. – Vol. 83. – Art. ID 104538. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104538>

23 Yin C., Noratto G.D., Fan X., Chen Z., Yao F., Shi D., Gao H. The impact of mushroom polysaccharides on gut microbiota and its beneficial Effects to Host: A Review // Carbohydrate Polymers. – 2020. – Vol. 250. – Art. ID 116942. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116942>

24 Yafetto L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis // Heliyon. – 2022. – Vol. 8(3). – Art. ID e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>

25 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). – P. 191-202. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.014>

26 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. – Vol. 313. – Art. ID 127969. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127969>

27 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. – Vol. 344(A). – Art. ID 126157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126157>

28 Hernández D., Sánchez J.E., Yamasaki K. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation // Bioresource Technology. – 2003. – Vol. 90(2). – P. 145-150. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00118-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00118-4)

29 Saubenova M.G., Kuznetsova T.V., Oleinikova Y.A. The use of bacteria-producers of cellulose and organic acids for stimulation of growth of the mycelium of the oyster mushroom // Int J Appl Fundam Res. – 2017. – Vol. 10, Part 1. – P. 102-105. <https://applied-research.ru/en/article/view?id=11870>

30 Пат. 030400 ЕАПО, А01G 1/04 (2006.01). Способ подготовки субстрата для выращивания мицелия гриба вешенка / Саданов А.К., Саубенова М.Г., Кузнецова Т.В., Сулейменова Ж.Б.; заявитель и патентообладатель РГП на ПХВ "Институт микробиологии и вирусологии" КН МОН РК (KZ). – № 201500005; заявл. 2014.09.25; опубл. 2018.07.31, Бюл. №07. – 5 с.

31 Kosel J., Ropret P. Overview of fungal isolates on heritage collections of photographic materials and their biological potency // Journal of Cultural Heritage. – 2021. – Vol. 48. – P. 277-291. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.01.004>

32 Patel R., Mehta K., Prajapati J., Shukla A., Parmar P., Goswami D., Saraf M. An anecdote of mechanics for *Fusarium* biocontrol by plant growth promoting microbes // Biological Control. – 2022. – Vol. 174. – Art. ID 105012. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105012>

33 Martínez M., Biganzoli F., Arata A., Dinolfo M.I., Rojas D., Cristos D., Stenglein S. Warm nights increase *Fusarium* Head Blight negative impact on barley and wheat grains // Agricultural and Forest Meteorology. – 2022. – Vol. 318. – Art. ID 108909. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.108909>

34 Jayalal R.G.U., Adikaram N.K.B. Influence of *Trichoderma harzianum* metabolites on the development of green mould disease in the oyster mushroom // Cey. J. Sci. (Bio. Sci.). - 2007. – Vol. 36. – P. 53–60.

35 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. – Vol. 300. – P. 58-67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01765.x>.

36 Błaszczuk L., Siwulski M., Sobieralski K., Frużyńska-Jóźwiak D. Diversity of *Trichoderma* spp. causing *Pleurotus* green mould diseases in Central Europe // Folia Microbiol. (Praha). - 2013. – Vol. 58. – P. 325–333. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0214-6>

37 Innocenti G., Montanari M., Righini H., Roberti R. *Trichoderma* species associated with green mould disease of *Pleurotus ostreatus* and their sensitivity to prochloraz // Plant Pathology. – 2019. - Vol. 68, Issue2. – P. 392-398.

38 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. – Vol. 38, Issue 3. – P. 268-273. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.08.001>

Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, С.Т. ДАУГАЛИЕВА¹, Д.Д. БОКЕНОВ¹,
М.Г. САУБЕНОВА¹, А.Б. АЛТЕКЕЙ², А.А. АЙТЖАНОВА¹

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

² М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан университеті, Шымкент, Қазақстан
*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

ДӘНДІ ДАҚЫЛДАРДЫҢ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗА ҚАЛДЫҚТАРЫНАН ЛАСТУШЫ-МИКРОМИЦЕТТЕРІН БӨЛІП АЛУ

Түйін

Екіншілік лигноцеллюлоза шикізаты планетадағы ең ауқымды жаңартылатын ресурс болып табылады. Өсімдік қалдықтары, атап айтқанда дәнді дақылдардың сабаны әрдайым жағылып отыратындықтан экологияға қауіп төндіреді. Екіншілік лигноцеллюлоза шикізатын пайдаланудың бір жолы-жоғарғы сатыдағы саңырауқұлақтарды өсіру. Дегенмен, саңырауқұлақтарды өсіру үшін қолданылатын субстраттың термиялық өңдеудегі энергия сыйымдылығы олардың өндірісін шектейді. Бұл жұмыста бидай, арпа және сұлы сабанын ластайтын 23 зең саңырауқұлақтарының изоляты оқшауланған. Целлюлозаны бұзатын жоғарғы сатыдағы саңырауқұлақтардың патогені болып табылатын *Trichoderma longibrachiatum* саңырауқұлақтарының 2 штаммы оқшауланған. Антагонистік микроорганизмдердің көмегімен өсірілетін субстратты қорғау үшін *Pleurotus ostreatus* екі штаммы оқшауланған..

Кілтті сөздер: жаңартылатын лигноцеллюлоза шикізаты, жеуге жарамды саңырауқұлақтарды өсіру, зең саңырауқұлақтары, кәдімгі устрица саңырауқұлағы, триходерма.

IRSTI: 34.27.19, 34.27.23, 68.35.71, 62.09.37

Zh.N. YERMEKBAY¹, Ye.A. OLENIKOVA^{1*}, S.T. DAUGALIYEVA¹, D.D. BOKENOV¹,
M.G. SAUBENOVA¹, A.B. ALTEKEY², A.A. AITZHANOVA¹

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

²M. Auezov South Kazakhstan University, Shymkent, Kazakhstan

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

ISOLATION OF SPOILING MICROMYCETES IN LIGNOCELLULOSIC RESIDUES OF CEREAL CROPS

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.04

Abstract

Lignocellulosic secondary raw materials are the largest renewable resource on the planet. Crop residues, in particular cereals straws, are burned everywhere, creating a threat to the environment. One of the ways to use secondary lignocellulosic crop waste is the cultivation of higher fungi. However, the energy intensity of the thermal pretreatment of the substrate for growing mushrooms limits their production. This work identified 23 isolates of mold fungi that spoil wheat, barley, and oat straws. Two strains of the fungus *Trichoderma longibrahmatum*, a cellulose-destroying edible mushroom pathogen, have been isolated. Two strains of *Pleurotus ostreatus* were selected for further work on protecting the substrate for cultivation with antagonistic microorganisms.

Key words: renewable lignocellulosic raw materials, cultivation of edible mushrooms, molds, oyster mushroom, *Trichoderma*.

Lignocellulosic waste from the cultivation of various crops is the most common renewable cellulose-containing raw material on the planet [1, 2]. Mass burning of crop residues in the fields leads to environmental degradation and the loss of valuable resources. In world practice, there are various directions for the use of lignocellulosic agricultural wastes, including biofuel production [3-6], composting [7-9], use as a biofertilizer for promoting plant growth, and improving soil structure [10, 11], and the production of valuable compounds [12-14]. The search for new ways and work to improve the economic efficiency of using lignocellulosic waste to produce high-value-added products is constantly ongoing.

One of the ways to utilize cellulose-containing waste is the production of cellulose-decomposing higher fungi, which is characterized by a fast yield rate and high popularity of products [15-18]. Mushrooms are not only a highly nutritious and delicacy food product but also serve as a source of biologically active substances used in medicine for the treatment of several diseases, primarily as antitumor and immunomodulatory agents [19–21]. In recent years, the effect of fungal polysaccharides on the intestinal microbiota, which produces short-chain fatty acids, has also been proven [22, 23].

The production of mushrooms is carried out by the method of solid-phase fermentation of cellulose-containing raw materials [24]. The spent mushroom substrate, which is biomass enriched with proteins, vitamins, hydrolytic enzymes, and other biologically active substances, can be used as feed additives [25–27].

However, the energy intensity of the thermal preparation of the substrate for mushroom cultivation limits their production [28]. If the rules of asepsis are not observed, there is a rapid development of competing microorganisms, mainly mold fungi, accumulating mycotoxins and suppressing the development of a higher fungus, up to a complete loss of the crop. Since the economic indicators of the production of mushrooms are largely determined by the energy costs for the sterilization of the substrate, antagonistically active strains of microorganisms can be used for biological protection. The use of bioprotection not only minimizes the risk of substrate contamination with competitive microorganisms eliminating the need to comply with sterile

conditions but also makes it possible to obtain a high-quality selective medium and increase the yield of the mushroom [29, 30].

For the selection of antagonists of substrate spoiling micromycetes during cultivation of the oyster mushroom, mold fungi were isolated at the first stage.

Materials and methods

Since straw, mainly from wheat, is the main substrate used for the cultivation of mushrooms, it was mainly used to isolate spoiling micromycetes: three samples of wheat straw (collected in 2015 and 2020, as well as old straw with traces of spoilage), barley (2020) and oat straw (2019). Two samples of fruiting bodies of oyster mushrooms and mycelium of cellulose-destroying fungi (2 samples) from semi-decomposed wood were also selected.

Oyster mushroom mycelium was obtained on Wort agar (TM Media, India). Molds were isolated on Czapek's medium (g/l): sucrose 30.0; NaNO_3 2.0; KH_2PO_4 1.0; MgSO_4 0.5; KCl 0.5; agar-agar 20.0; tap water, sterilization at 1 atm. (121 °C) for 20 min.

To isolate fungi, samples of straw and parts of oyster mushroom fruiting bodies were laid out on the surface of an agar medium in Petri dishes. The surface of oyster mushroom fruit bodies was preliminarily treated with ethyl alcohol, and sterilely cut, and then the internal parts of the fungus were used for seeding. The cups were cultivated at 28-30 °C for up to 7 days. The fungi were then plated until pure cultures were obtained. The isolated cultures were stored on agar slants in a refrigerator at 5°C.

The species affiliation of oyster mushrooms and *Trichoderma* was determined by sequencing the ITS (Internal transcribed spacer) region according to the Sanger method.

To build a phylogenetic tree, the ITS of the region of the studied sample was compared with the sequences of reference strains located in the International Blast Database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The tree was built using the Mega 11 program; the sequences were aligned according to ClustalW.

Results and discussion

When straw samples were placed on the surface of the nutrient medium, a significant variety of mold fungi was revealed. For isolation, micromycetes of clearly different morphology were selected from each initial substrate. Mushrooms were reseeded several times until a pure culture was obtained. In total, 23 mold isolates were selected from various straw samples: 14 from wheat straw, 5 from barley straw, and 4 from oat straw (table 1, figure 1).

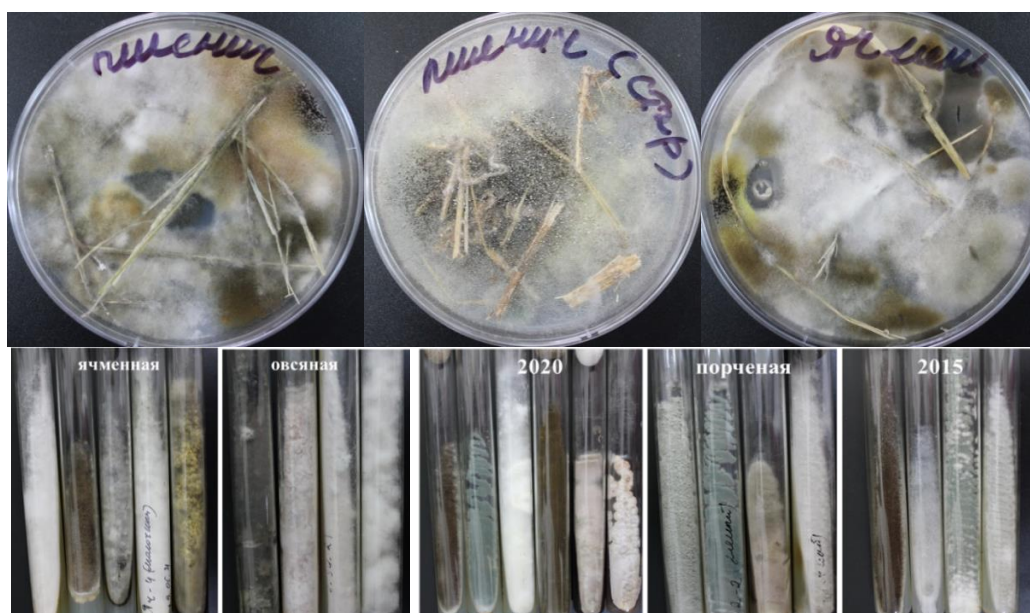


Figure 1 – Spoiling micromycetes of various samples of wheat, barley, and oat straw

Features of the morphology of selected isolates during growth on Czapek's medium are presented in Table 1. The most common isolates from various samples of wheat straw were micromycetes of the genera *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium*. It was previously shown that fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* are the main spoilers of various plant substrates [31]. The presence of mold fungi of the genus *Fusarium* is apparently due to their wide distribution as phytopathogens of grain crops [32, 33]. Fresh straw was characterized by a wider range of filamentous fungi of various genera. It also contained fungi with gray, brown, and olive colors of mycelium. However, during storage, the number of mold fungi with such pigmentation of the mycelium on the straw surface decreased, and the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Mucor* began to dominate. Interestingly, molds of the genus *Penicillium* were not isolated from barley and oat straw, while *Fusarium* was present in almost all samples.

Isolates of green mold presumably belonging to the genus *Trichoderma*, were selected from the fruiting bodies of the oyster mushroom and the cellulose-destroying fungus from a dilapidated stump. Molds of the genus *Trichoderma* have been known to cause crop losses of basidiomycetes, in particular oyster mushrooms, over the past 25 years throughout the world [34-37]. In our study, species of the genus *Trichoderma* were not found on the surface of wheat, barley, or oat straw but were isolated from the fruit bodies and mycelium of cellulose-decomposing fungi, including from commercially available samples of oyster mushrooms.

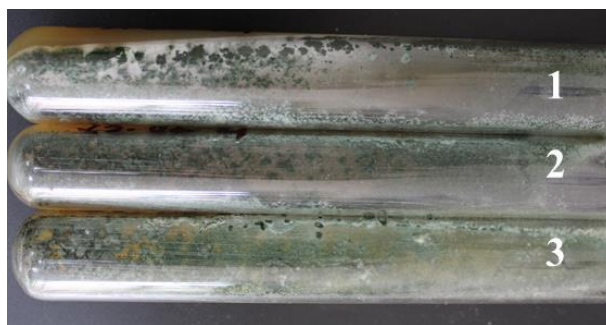
Figure 2 shows the growth of *Trichoderma* isolates from oyster mushroom fruiting bodies and mycelium of a cellulose-decomposing fungus.

Table 1 - Straw filamentous fungi - potential spoilers in the production of higher fungi

Selection source	Isolate number	Substrate mycelium	Aerial mycelium	Pigment production into a medium	Note
1	2	3	4	5	6
Wheat straw 1 (harvest 2020)	Wh 1-1	White	Black	No	According to the morphology of growth and fruiting corresponds to <i>Aspergillus niger</i>
	Wh 1-2	White	Bluish green	No	According to the morphology of growth and fruiting corresponds to <i>Penicillium</i> sp.
	Wh 1-3	Grayish white	Yellowish white	Barely noticeable grayish yellowish	Presumably <i>Fusarium</i> sp.
	Wh 1-4	Dark brown	Brown	No	-
	Wh 1-5	Dark brown or gray	Even gray-beige with greenish-gray fluffy parts	Black	-
	Wh 1-6	Grayish or darker	Grayish	Brown	Small colonies, 5-7 mm in diameter, sometimes with gray or brownish rings and condensate.
Wheat straw 2 (spoiled)	Wh 2-1	Greyish, brownish ventral view	Greenish gray	Pale brown	-
	Wh 2-2	White	Grey-green	Very faint yellowish	According to the morphology of growth and fruiting corresponds to <i>Penicillium</i> sp.
	Wh 2-3	Creamy grayish white	Creamy grayish white	No	Mycelium uniform and low
	Wh 2-4	Grey-brown, brown on the underside	Brownish gray	Weak grayish brown	-

Table 1 continued

1	2	3	4	5	6
Wheat straw 3 (harvest 2015)	Wh 3-1	White	Black	No	According to the morphology of growth and fruiting corresponds to <i>A. niger</i>
	Wh 3-2	White	White with dark gray conidia	No	Mycelium is high, uniform, presumably <i>Mucor</i> sp.
	Wh 3-3	White	Grey-green	No	According to the morphology of growth and fruiting corresponds to <i>Penicillium</i> sp.
	Wh 3-4	Beige white	Beige white	Very faint yellowish	Mycelium is low and uniform
Barley straw	Bl-1	White, sometimes with a pinkish tint	White	Weak brownish yellow	Aerial mycelium is uniform, presumably <i>Fusarium</i> sp.
	Bl-2	White	Grayish brown	No	According to the morphology of growth and fruiting corresponds to <i>Aspergillus</i> sp.
	Bl-3	Black brown	Gray	No	-
	Bl-4	Milky white	White	Very weak yellow	Aerial mycelium uniform, presumably <i>Fusarium</i> sp.
	Bl-5	Blackish olive	Gray with yellowish-greenish tufts	Brown	-
Oat straw	O-1	White	White	No	The aerial mycelium is high, dense, similar to cotton balls, presumably <i>Fusarium</i> sp.
	O-2	White	Pinkish beige	No	Presumably <i>Fusarium</i> sp
	O-3	Grayish	Grayish	Light brown	Mycelium is not tall
	O-4	Blackish	Gray	Pinkish brown	-



Note - 1, 2 isolates from the fruiting body of oyster mushroom; 3 from the mycelium of a cellulose-decomposing fungus.

Figure 2 - *Trichoderma* fungus isolates from cellulose-decomposing fungi

Molecular genetic analysis of two variants of the oyster mushroom (V1 and V2) and isolates of *Trichoderma* sp. V and *Trichoderma* sp. VG.

The oyster mushroom has been confirmed to belong to *Pleurotus ostreatus* (figure 3).

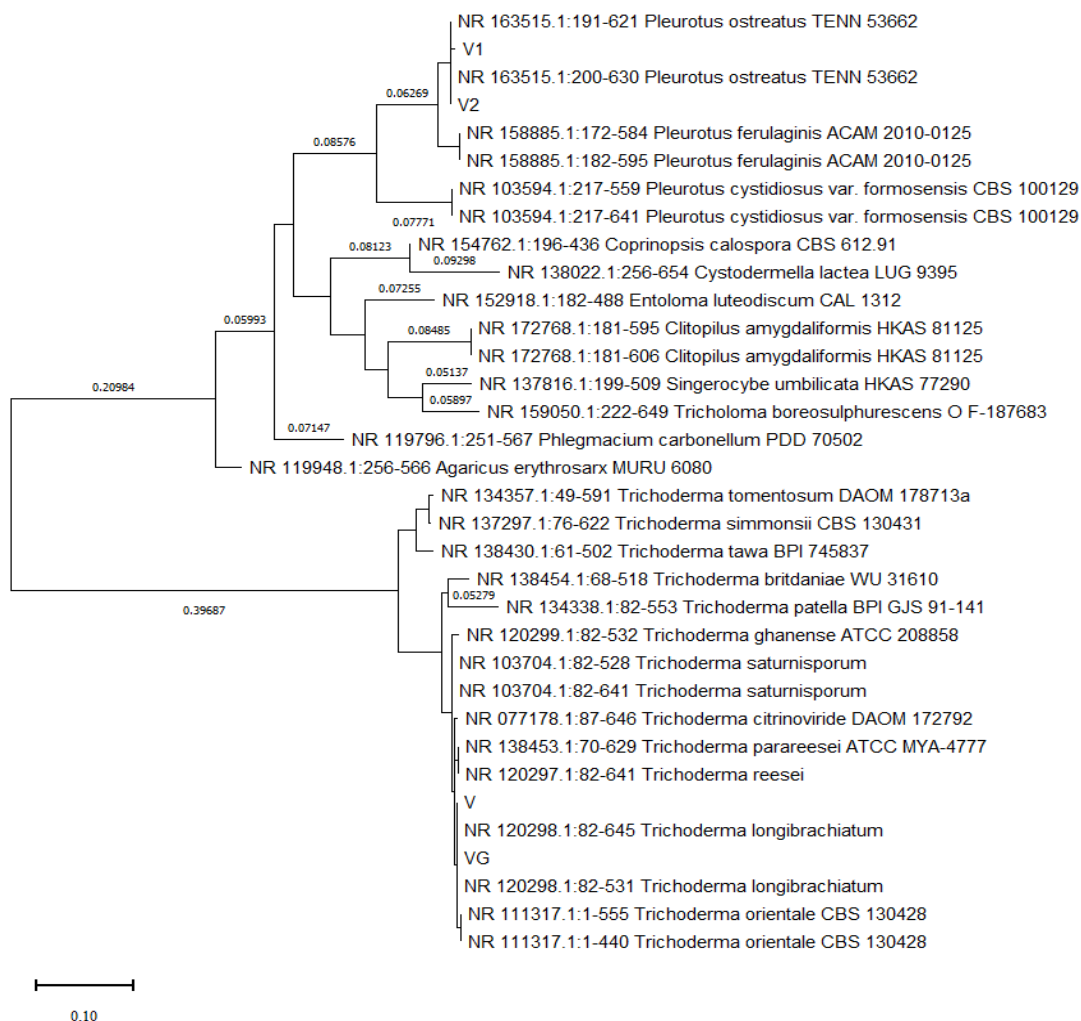


Figure 3 - Phylogenetic tree of oyster mushroom isolates (V1 and V2) and fungi of the genus *Trichoderma* (V and VG) from oyster mushroom fruiting bodies

Fungi of the genus *Trichoderma* were assigned to the species *Trichoderma longibrahiaium*. From the literature data, it is known that *T. longibrahiaium*, along with the species *Trichoderma harzianum*, is the cause of green mold disease in the production of various mushrooms [35, 38].

Conclusion

Thus, in total, 23 mold isolates were isolated from the surface of various straw samples: 14 isolates from wheat straw, 5 from barley straw, and 4 from oat straw. Two strains of *P. ostreatus* fungus (oyster mushroom) and two strains of *T. longibrahiaium* fungus, which is a pathogen of *P. ostreatus*, were obtained.

Selected cultures of spoiling micromycetes and strains of *T. longibrahiaium* will be used to isolate antagonistic bacteria for the development of an integrated method for straw utilization using the *P. ostreatus* mushroom.

Funding

This research is funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. AP092586540).

References:

- 1 Adhikari S., Nam H., Chakraborty J. P. Conversion of solid wastes to fuels and chemicals through pyrolysis. Waste Biorefinery. Eds: Bhaskar T., Pandey A., Mohan S.V., Lee D.J., Khanal S.K. - Amsterdam, Oxford, Cambridge: Elsevier, 2018. P. 239-263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63992-9.00008-2>
- 2 Ali N., Zhang Q., Liu Z., Li F., Lu M., Fang X. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products. Appl Microbiol Biotechnol. 2020. Vol. 104(2). P. 455-473. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10158-w>
- 3 Zhang J., Rentizelas A., Zhang X., Li J. Sustainable production of lignocellulosic bioethanol towards zero waste biorefinery. Sustainable Energy Technologies and Assessments. 2022. Vol. 53, Part C. Art. ID 102627. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102627>
- 4 Bhujbal S.K., Ghosh P., Vijay V.K., Rathour R., Kumar M., Singh L., Kapley A. Biotechnological potential of rumen microbiota for sustainable bioconversion of lignocellulosic waste to biofuels and value-added products. Science of the Total Environment. 2022. Vol. 814. Art. ID 152773. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152773>
- 5 Naik G.P., Poonia A.K., Chaudhari P.K. Pretreatment of lignocellulosic agricultural waste for delignification, rapid hydrolysis, and enhanced biogas production: A review. Journal of the Indian Chemical Society. 2021. Vol. 98, Issue 10. Art. ID 100147. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100147>
- 6 Nahak B.K., Preetam S., Sharma D., Shukla S.K., Syväjärvi M., Toncu D.C., Tiwari A. Advancements in net-zero pertinency of lignocellulosic biomass for climate neutral energy production. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2022. Vol. 161. Art. ID 112393. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112393>
- 7 Greff B., Szigeti J., Nagy Á., Lakatos E., Varga L. Influence of microbial inoculants on co-composting of lignocellulosic crop residues with farm animal manure: A review. Journal of Environmental Management. 2022. Vol. 302, Part B. Art. ID 114088. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114088>
- 8 Harindintwali J.D., Zhou J., Yu X. Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria: A novel tool for environmental sustainability. Science of the Total Environment. 2020. Vol. 715. Art. ID 136912. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136912>
- 9 Jin X., Ai W., Zhang Y., Dong W. Application of functional microbial agent in aerobic composting of wheat straw for waste recycling. Life Sciences in Space Research. 2022. Vol. 33. P. 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2022.02.002>
- 10 Shinde R., Shahi D.K., Mahapatra P., Naik S.K., Thombare N., Singh A.K. Potential of lignocellulose degrading microorganisms for agricultural residue decomposition in soil: A review. Journal of Environmental Management. 2022. Vol. 320. Art. ID 115843. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115843>
- 11 Lin L., Zheng Z., Hua T., Ashraf U., Hamoud Y.A., Alaa Al Aasmi, Xiangru T., Meiyang D., Wang Zaiman, Shenggang P. Nitrogen deep placement combined with straw mulch cultivation enhances

physiological traits, grain yield and nitrogen use efficiency in mechanical pot-seedling transplanting rice. *Rice Science*. 2022. Vol. 29, Issue 1. P. 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2021.12.008>

12 Wang J., Liu S., Huang J., Qu Z. A review on polyhydroxyalkanoate production from agricultural waste Biomass: Development, Advances, circular Approach, and challenges. *Bioresource Technology*. 2021. Vol. 342. Art. ID 126008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126008>

13 Son J., Joo J.C., Baritugo K.A., Jeong S., Lee J.Y., Lim H.J., Lim S.H., Yoo J.I., Park S.J. Consolidated microbial production of four-, five-, and six-carbon organic acids from crop residues: Current status and perspectives. *Bioresour Technol*. 2022. Vol. 351. Art. ID 127001. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127001>

14 Safian M.T., Sekeri S.H., Yaqoob A.A., Serrà A., Jamudin M.D., Mohamad Ibrahim M.N. Utilization of lignocellulosic biomass: A practical journey towards the development of emulsifying agent. *Talanta*. 2022. Vol. 239. Art. ID 123109. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123109>

15 Zhang H.L., Wei J.K., Wang Q.H., Yang R., Gao X.J., Sang Y.X., Cai P.P., Zhang G.Q., Chen Q.J. Lignocellulose utilization and bacterial communities of millet straw based mushroom (*Agaricus bisporus*) production. *Sci Rep*. 2019. Vol. 9. P. 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37681-6>

16 Melanouri E.M., Dedousi M., Diamantopoulou P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. *Carbon Resour Convers*. 2022. Vol. 5, Issue 1. P. 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.004>

17 Raman J., Jang K., Oh Y., Oh M., Im J., Lakshmanan H., Sabaratnam V. Cultivation and nutritional value of prominent *Pleurotus* spp.: An overview. *Mycobiology*. 2021. Vol. 49, Issue 1. P. 1-14. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1835142>

18 Ritota M., Manzi P. *Pleurotus* spp. cultivation on different agri-food by-products: Example of biotechnological application. *Sustain*. 2019. Vol. 11, Issue 18. Art ID 5049. <https://doi.org/10.3390/su11185049>

19 Yadav D., Negi P.S. Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits. *Food Research International*. 2021. Vol. 148. Art. ID 110599. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110599>

20 Motta F., Gershwin M.E., Selmi C. Mushrooms and immunity. *Journal of Autoimmunity*. 2021. Vol. 117. Art. ID 102576. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102576>

21 Rizzo G., Goggi S., Giampieri F., Baroni L. A review of mushrooms in human nutrition and health. *Trends in Food Science and Technology*. 2021. Vol. 117. P. 60-73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.025>

22 Li M., Yu L., Zhao J., Zhang H., Chen W., Zhai Q., Tian F. Role of dietary edible mushrooms in the modulation of gut microbiota. *J Funct Foods*. 2021. Vol. 83. Art. ID 104538. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104538>

23 Yin C., Noratto G.D., Fan X., Chen Z., Yao F., Shi D., Gao H. The impact of mushroom polysaccharides on gut microbiota and its beneficial Effects to Host: A Review. *Carbohydrate Polymers*. 2020. Vol. 250. Art. ID 116942. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116942>

24 Yafetto L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*. 2022. Vol. 8(3). Art. ID e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>

25 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). P. 191-202. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.014>

26 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. Vol. 313. Art. ID 127969. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127969>

27 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. Vol. 344(A). Art. ID 126157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126157>

28 Hernández D., Sánchez J.E., Yamasaki K. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. *Bioresource Technology*. 2003. Vol. 90(2). P. 145-150. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00118-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00118-4)

29 Saubenova M.G., Kuznetsova T.V., Oleinikova Y.A. The use of bacteria-producers of cellulose and organic acids for stimulation of growth of the mycelium of the oyster mushroom. Int J Appl Fundam Res. 2017. Vol. 10, Part 1. P. 102-105. <https://applied-research.ru/en/article/view?id=11870>

30 Pat. 030400 EАPO, A01G 1/04 (2006.01). Sposob podgotovki substrata dlja vyrashhivaniya micelija griba veshenka. Sadanov A.K., Saubenova M.G., Kuznetsova T.V., Sulejmenova Zh.B.; zajavitel' i patentoobladatel' RGP na PHV "Institut mikrobiologii i virusologii" KN MON RK (KZ). № 201500005; zajavl. 2014.09.25; opubl. 2018.07.31, Bjul. №07. – 5 s.

31 Kosel J., Ropret P. Overview of fungal isolates on heritage collections of photographic materials and their biological potency. Journal of Cultural Heritage. 2021. Vol. 48. P. 277-291. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.01.004>

32 Patel R., Mehta K., Prajapati J., Shukla A., Parmar P., Goswami D., Saraf M. An anecdote of mechanics for *Fusarium* biocontrol by plant growth promoting microbes. Biological Control. 2022. Vol. 174. Art. ID 105012. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105012>

33 Martínez M., Biganzoli F., Arata A., Dinolfo M.I., Rojas D., Cristos D., Stenglein S. Warm nights increase *Fusarium* Head Blight negative impact on barley and wheat grains. Agricultural and Forest Meteorology. 2022. Vol. 318. Art. ID 108909. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.108909>

34 Jayalal R.G.U., Adikaram N.K.B. Influence of *Trichoderma harzianum* metabolites on the development of green mould disease in the oyster mushroom. Cey. J. Sci. (Bio. Sci.). 2007. Vol. 36. P. 53–60.

35 Kredics L., Kocsubé S., Nagy L., Komoń-Zelazowska M., Manczinger L., Sajben E., Nagy A., Vágvolgyi 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. Vol. 300. P. 58-67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01765.x>.

36 Błaszczyk L., Siwulski M., Sobieralski K., Frużyńska-Jóźwiak D. Diversity of *Trichoderma* spp. causing *Pleurotus* green mould diseases in Central Europe. Folia Microbiol. (Praha). 2013. Vol. 58. P. 325–333. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0214-6>

37 Innocenti G., Montanari M., Righini H., Roberti R. *Trichoderma* species associated with green mould disease of *Pleurotus ostreatus* and their sensitivity to prochloraz. Plant Pathology. 2019. Vol. 68, Issue2. P. 392-398.

38 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. Vol. 38, Issue 3. P. 268-273. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.08.001>