



ISSN 2304-585X

ИНДЕКС 76057

2021

Microbiology and virology МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ



ВИРУСОЛОГИЯ

№3(34)

**«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы»
Жауапкершілігі шектеулі серіктестігі**

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

**Товарищество с ограниченной ответственностью
«Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»**

№ 3 (34)

ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

**АЛМАТЫ
2021**

ISSN 2304-585 X
МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ
№ 3(34)/2021

Научно-практический журнал
Журнал зарегистрирован в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан. Свидетельство о регистрации №12821-Ж от 12.06.2012 г.

УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ

© ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»

Редакционная коллегия

Саданов А.К. – доктор биологических наук, профессор, академик (главный редактор)
Айткельдиева С.А. – доктор биологических наук (заместитель главного редактора)
Балгимбаева А.С. – кандидат биологических наук (ответственный секретарь)
Dr. Azliati Azizan (USA) – PhD
Березин В.Э. – доктор биологических наук, профессор, член - корреспондент НАН РК
Богоявленский А.П. – доктор биологических наук, профессор
Гаврилова Н.Н. – доктор биологических наук, профессор
Головлева Л.А. (Россия) – доктор биологических наук, профессор
Кыдырманов А.И. – доктор ветеринарных наук
Магай Е.Б. (Узбекистан) – кандидат биологических наук
Мурадов П.З. (Азербайджан) – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Азербайджана
Науанова А.П. – доктор биологических наук, профессор
Ратникова И.А. – доктор биологических наук, доцент
Савицкая И.С. – доктор биологических наук, профессор
Dr. Sasan Fereidouni (Germany) – DVM, PhD
Саубенова М.Г. – доктор биологических наук, профессор
Смирнова И.Э. – доктор биологических наук

АДРЕС РЕДАКЦИИ 050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105, тел.+7(727) 291-84-97, 291-97-36
E-mail: imv_rk@list.ru

ПЕЧАТЬ

ТОО «Print Market.kz»
Адрес: г. Алматы, ул. Казыбек би, 125
Тел.: 8 (727) 328-14-67, 225-00-68
Территория распространения –
Республика Казахстан
Периодичность – 4 номера в год
Тираж 500 экземпляров

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

М.Г. Саубенова, Е.А. Олейникова, Ж.Н. Ермекбай, А.А. Айтжанова, Д.Д. Бокенов
Микробиологические аспекты выращивания высших грибов 4

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А.Т. Даугалиева, С.Т. Даугалиева, Б.С. Арынгазиев, Т.А. Лаврентьева
Исследование микробиома желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота породы абердин-ангус..... 37

М.Б. Ерденбекова, С.Д. Жантлесова, Ф.К. Алайдар, А.Д. Масирбаева
Исследование антагонистической активности молочнокислых бактерий против кишечной палочки *Escherichia coli* (*E.coli*).....61

О.Н. Шемшура, Ж.Б. Сулейменова, Ж.К. Рахметова, Ж.Н. Шемшеева, Э.Т. Исмаилова
Изучение биосовместимости мутантных штаммов клубеньковых бактерий и PGPR бактерий, перспективных в качестве основы микробных препаратов..... 68

МАЗМҰНЫ

ШОЛЫМА МАҚАЛАЛАР

М.Г. Саубенова, Е.А. Олейникова, Ж.Н. Ермекбай, А.А. Айтжанова, Д.Д. Бокенов
Жоғары сатыдағы саңырауқұлақтарды өсірудің микробиологиялық аспектілері..... 21

БІРТУМА МАҚАЛАЛАР

А.Т. Дәуғалиева¹, С.Т. Дәуғалиева², Б.С. Арыңғазиев¹, Т.А. Лаврентьева¹
Абердин-ангус тұқымды ірі қара малдың асқазан-ішек жолының микробиомасын зерттеу..... 46

М.Б. Ерденбекова, С.Д. Жантлессова, Ф.К. Алайдар, А.Д. Масирбаева
Сүтқышқылды бактериялар *Escherichia coli* (*E.coli*) ішек таяқшасына қарсы көрсететін антагонисттік қасиеттерін зерттеу.....55

О.Н. Шемшұра, Ж.Б. Сулейменова А, Ж.К. Рахметова, Ж.Н. Шемшеева, Э.Т. Исмаилова
Микробтық препараттардың негізі болып табылатын түйнек бактериялары мен рррг бактерияларының мутантты штамдарының биосәйкестігін зерттеу..... 73

CONTENTS

REVIEW RESEARCH PAPERS

M.G. Saubenova, Y.A. Oleinikova, Z.N. Yermekbay, A.A. Aitzhanova, D.D. Bokenov
Microbiological aspects of growing mushrooms..... 21

ORIGINAL RESEARCH PAPERS

A.T. Daugaliyeva¹, S.T. Daugaliyeva², B.S. Aryngazyev¹, T.A. Lavrentieva¹.
Research of the microbiom of the gastrointestinal tract of the aberdin-angus breed cattle.....46

M.B. Yerdenbekova, S.D. Zhantlessova, F.K. Alaidar, A.D. Masirbaeva
Study of the antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Escherichia coli* (*E.coli*) 62

O.N. Shemshura, ZH.B. Suleimenova, ZH.K. Rakhmetova, ZH. N. Shemsheeva, E.T. Ismailova
Study of the biocompatibility of mutant strains of root nodule and pgpr bacteria, promising as a basis of microbial preparations..... 73

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

МРНТИ: 34.27.19, 62.13.63

М.Г. САУБЕНОВА, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ, А.А. АЙТЖАНОВА,
Д.Д. БОКЕНОВ

ТОО «Научно – производственный центр микробиологии и вирусологии», г.
Алматы

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЫРАЩИВАНИЯ ВЫСШИХ
ГРИБОВ**

doi: 10.53729/MV-AS.2021.03.01

Аннотация

Рост численности населения земного шара, истощение природных ресурсов и связанная с этим нехватка продовольствия ставят вопрос о необходимости переработки производимых растительных отходов с целью защиты окружающей среды и получения альтернативных источников пищи. Использование целлюлозосодержащих пожнивных остатков для производства высших грибов является оптимальным решением указанных проблем. Высокая пищевая и лекарственная ценность высших грибов доказана многочисленными исследованиями. Однако процессы культивирования высших грибов сталкиваются с проблемой селективности субстрата, сдерживающей рост этой отрасли производства. К настоящему времени накапливаются данные о взаимодействии высших грибов и микроорганизмов, которое открывает возможности управляемого культивирования и направленного биосинтеза практически ценных метаболитов высших грибов. Статья посвящена различным аспектам воздействия микроорганизмов на процесс выращивания высших грибов.

Ключевые слова: высшие грибы, целлюлозосодержащие отходы растениеводства, компостирование, стимуляция роста, мутуалистические взаимоотношения, микосфера.

Численность населения земного шара неуклонно растет. Так, если в начале XX века в мире насчитывалось 1,6 миллиарда человек, то закончился он с 6,0 миллиардами. Согласно отчету UN World Population Prospects 2015 года, количество людей в мире на середину 2015 года составило 7,3 миллиарда, и прогнозируется, что к 2030 году оно достигнет 8,5 миллиарда, к 2050 году - 9,7 миллиарда, а к 2100 году - 11,2 миллиарда, причем большая часть роста будет приходиться на менее развитые страны. Увеличение населения примерно на 80 миллионов каждый год вызывает вполне обоснованные опасения относительно возможности обеспечения его необходимым количеством пищи и должным уровнем медицинской помощи, а также связанной с этим повышенной нагрузкой на глобальные экосистемы. Уже в настоящее время нехватка продовольствия, ухудшение состояния здоровья и качества окружающей среды являются серьезными проблемами, отрицательно влияющими на благосостояние человека.

Несмотря на постоянную разработку новых технологий и инноваций, решение вопроса упирается в ограниченную возможность интенсификации земледелия и животноводства, что сформулировано в отчете ZERI (Исследовательская инициатива по нулевым выбросам) Хаблуцеля: «мы не можем ожидать, что Земля будет производить больше - мы должны делать больше с тем, что Земля уже производит». Быстрое истощение традиционных ресурсов заставляет людей искать альтернативные источники пищи, удобрений и топлива. В этом плане остро встает необходимость более глубокой переработки различного рода отходов, вовлечение их в промышленный оборот в качестве вторичного сырья.

Наиболее распространенным отходом практической деятельности человека, загрязняющим окружающую среду, являются различные пожнивные остатки и другие целлюлозосодержащие побочные продукты сельскохозяйственной и промышленной деятельности человека, мировое производство которых составляет около 200 млрд т в год [1, 2], переработка и утилизация которых затруднена из-за их сложного химического состава. Широко распространенный прием избавления от них путем сжигания (особенно в странах Южной и Юго-Восточной Азии и Африки) в настоящее время подвергается строгому запрету из-за усугубления парникового эффекта, высокого уровня загрязнения воздуха, отрицательно влияющего на здоровье населения, гибели полезной микрофлоры в почве и других объективных причин.

Одним из наиболее приемлемых и даже оптимальных решений в этом плане в XXI веке представляется производство высших грибов, играющих важную роль во многих аспектах благосостояния человека, как доказано их многовековым использованием. У грибов есть два типа внеклеточных ферментативных систем; гидролитическая система, которая производит гидролазы, ответственные за разложение полисахаридов, и уникальная окислительная и внеклеточная лигнинолитическая система, которая разлагает лигнин и открывает фенильные кольца [3]. Без отрицательных правовых, этических и других последствий эта форма биоконверсии имеет не только благоприятные социально-экономические преимущества, заключающиеся в получении продуктов питания, но также увеличивает возможности трудоустройства населения и оказывает положительное воздействие на окружающую среду.

Пищевая и биологическая ценность высших грибов

Съедобные грибы широко потребляются во многих странах и являются ценными компонентами рациона из-за привлекательного вкуса, аромата и пищевой ценности, что возводит их в ранг деликатесных продуктов. С другой стороны, из-за невысокой стоимости производства и доступности для широких кругов населения их называют «мясом для бедных» [4]. Влажность плодовых тел свежих макрогрибов составляет около 90%. В перерасчете на сухое вещество они содержат от 50 до 65% углеводов, от 19 до 35% белков и сравнительно низкое количество жира от 2 до 6% [5, 6]. Благодаря высокому содержанию ненасыщенных жирных кислот (пальмитиновой, олеиновой и линолевой), биологически активных белков (ферментов, лектинов, эрготионеина и др.), фенольных соединений (фенольных кислот и полифенолов), витаминов (тиамина, рибофлавина, аскорбиновой кислоты, ниацина и токоферолов) и других биологически активных веществ, высшие грибы могут рассматриваться в качестве важного источника низкокалорийной функциональной пищи и нутрицевтиков [7]. Большим преимуществом грибов как продуктов питания является то, что они в больших количествах содержат диетические пищевые волокна [8] и антиоксиданты. Высокое содержание

антиоксидантных соединений, легко экстрагируемых нетоксичным растворителем, позволяет использовать экстракт *Agaricus brasiliensis* в пищевой промышленности в качестве природного антиоксиданта [9].

Именно стремление к сбалансированному питанию привело человечество к увеличению потребления продукции грибоводства во всем мире [10]. В Китае она составляет более 80% от мирового производства, во всем мире производство грибов также неуклонно возрастает (по данным FAO), особенно это актуально для развивающихся стран.

Одним из наиболее широко культивируемых грибов в западных странах является *Agaricus bisporus*, широко известный как белый шампиньон, занимающий экологические ниши, богатые лигноцеллюлозой. *A. bisporus* на протяжении более 200 лет был важным компонентом рациона человека. Он составляет большую часть от общего количества грибов, потребляемых в большинстве западных стран. Вторым по распространенности в мире является *Pleurotus* spp. - вешенка, так называемый устричный гриб. В Китае и ряде других Юго-восточных странах предпочтение отдается *Lentinus edodes* (шиитакэ), а также выращиваются *Flammulina velutipes* (зимние макрогрибы), *Auricularia auricula* (древесные макрогрибы) и *Volvariella volvacea* (соломенный гриб) [11-14]. Получили распространение также лекарственные макрогрибы, включая *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* [15], *Phellinus linteus*, *Antrodia cinnaomea* и *Xylaria nigripes* [12, 16].

Как показал многолетний опыт народной медицины юго-восточных стран — Китая, Японии, Кореи и др., плодовые тела многих макромицетов характеризуются рядом достоинств не только вкусового и пищевого, но и лечебного характера. Только в Китае отмечено свыше 270 видов грибов, имеющих медицинскую значимость, при этом макромицеты более чем 100 видов обычно используются в традиционной медицине.

Использование грибов полностью соответствует старой китайской поговорке: «Медицина и еда имеют общее происхождение». Это утверждение особенно применимо к грибам, питательные и лечебные свойства, а также тонизирующие эффекты которых в качестве нутрицевтиков или пищевых добавок, уже давно признаны [17].

Фенольные соединения, терпены, стероиды и полисахариды, содержащиеся в грибах, отличаются различной биологической активностью. Они обладают противовоспалительными [18], иммуностимулирующими [19-23], противовирусными [24, 25], гепатопротекторными, противоаллергенными, антибиотическими [26,27], антиоксидантными [28, 29], гипохолестеринемическими и антиатерогенными свойствами и используются для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, гипертонии, атеросклероза, диабета [30], последствий инфарктов и инсультов, болезни Паркинсона, Альцгеймера [31, 32], а также, благодаря противоопухолевым свойствам, для снижения вероятности инвазии и метастазирования рака [33-38]. Эти свойства подтверждены как *in vitro*, так и *in vivo* [21, 39-42].

Очень важным для современной медицины является то, что макрогрибы представляют собой неисчерпаемый источник полисахаридов (особенно Р-глюканов) и полисахарид-протеиновых комплексов, обладающих одновременно противовирусными, противораковыми и иммуностимулирующими свойствами [43-47], что позволяет разрабатывать лекарственные средства комплексного действия. Преимущества для здоровья человека грибных пищевых волокон заключаются в

укреплении иммунной системы, в связи противораковыми функциями, а также контролем уровня липидов и глюкозы в крови [8].

Повреждение или ослабление природных иммунологических реакций пациента, особенно при химиотерапии и радиотерапии, является главной проблемой при лечении онкологических заболеваний. Грибы способствуют улучшению качества жизни больных ввиду того, что они активируют природные иммунные ответы организма и могут использоваться как поддерживающая терапия и для профилактики рака [48]. Роль таких средств из базидиальных грибов возрастает в профилактике и лечении вирусных инфекций, а также, возможно, в предотвращении опухолевых процессов, которые могут «запускаться» в организме человека при воздействии вирусов.

Хотя активное действие грибных препаратов уступает таковому химически синтезированных, они имеют более низкую стоимость, чем их аналоги. Кроме того, биологически активные вещества грибов не оказывают токсического действия, которое отмечается при прохождении курса химиотерапии [49].

В последние десятилетия препараты из плодовых тел грибов успешно завоевывают фармацевтические рынки Европы, США и, особенно, Японии, где составляют до трети всех применяемых иммунокорректоров и онкостатиков. Новосибирскими специалистами из ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» были установлены наиболее перспективные штаммы грибов, активные в отношении ВИЧ-1, вирусов простого герпеса, Западного Нила, гриппа разных субтипов и ортопоксвирусов (натуральной оспы и др.), при этом некоторые из них оказались одновременно активны в отношении трех и более патогенов. Абсолютным рекордсменом стал широко известный березовый гриб, или чага, (плодовые тела трутовика скошенного): его экстракт подавлял абсолютно все исследованные вирусы. Высокую противовирусную активность показали и некоторые другие виды трутовиков, а также веселка обыкновенная, вешенки легочная и устричная [50].

Культивирование грибов

Преимущество грибов заключается в наличии у них способности вырабатывать группу сложных внеклеточных гидролитических ферментов, таких как лакказа и универсальные пероксидазы, обеспечивающих доступность лигноцеллюлозы для дальнейшего использования в качестве источника углеродного питания [51, 52]. Грибы можно выращивать с использованием традиционных методов ведения сельского хозяйства или с использованием высокоиндустриальных технологий в городских и пригородных условиях [53-55]. Продуктивность высших грибов при промышленных способах их получения достигает 120-150 кг с 1 м² полезной площади, что соответствует получению 4,8-6,2 т сухого белка с 1 га в год [56].

В последние годы оптимальным признан селективный субстрат, отличающийся от широко распространенного ранее стерильного субстрата отсутствием необходимости больших энергетических затрат, освобождающих его от плесневых грибов и других микроорганизмов, конкурирующих с грибами за источники питания. Наиболее распространенным и экономически оправданным способом получения селективного субстрата для культивирования макрогрибов является способ твердофазной микробной ферментации, иными словами компостирования, позволяющий утилизировать различные отходы. Таким образом, коммерческое производство грибов основано на серии стадий твердой ферментации в контролируемых условиях, в которых грибы совместно с бактериями

осуществляют обработку сырья, минимизируют развитие грибных конкурентов и стимулируют процесс плодоношения [57-61].

Для выращивания грибов могут быть использованы различные лигноцеллюлозные отходы агропромышленного комплекса - пшеничная и рисовая солома, другие пожнивные остатки, отруби, рисовая шелуха, кукурузные початки, побочные продукты лесного хозяйства, а также отходы оливковых заводов, кофейного производства, вегетативная часть топинамбура, стебли хлопчатника, ботва арахиса, солома сои, стебли, листья голубинового гороха и др. [62-66], в результате чего образуется высокопитательная экологически чистая биомасса.

Наиболее распространенным сырьем для производства грибов в Юго-Восточной Азии является рисовая солома. По данным Lin Wang с соавторами [67], при ее компостировании температура конвертируемой массы повышается значительно быстрее, чем при компостировании пшеничной соломы, а соотношение углерода к азоту снижается быстрее. Разнообразие бактериального сообщества компоста из рисовой соломы было большим по сравнению с компостом из пшеничной соломы на первых стадиях компостирования, затем разница сглаживалась. Соответственно компостирование рисовой соломы приводит к улучшенному разложению и ассимиляции продуктов распада грибом *A.bisporus*, что говорит о ее большей эффективности. Современными методами исследования установлено, что разнообразие бактерий, принимающих участие в процессе подготовки субстрата, значительно больше, чем сообщалось в исследованиях, основанных на методах, зависящих от культивирования. Их жизнедеятельность в большой мере зависит от условий компостирования. Так, порядок *Bacillales* показывает относительно более высокое содержание таксономических единиц при более высокой температуре пастеризации, что также было связано с измерениями высоких выбросов аммиака, что замедляет рост мицелия *Agaricus bisporus* [60]. Солома проса также является эффективным ресурсом для выращивания грибов, по урожайности не уступающим соломе пшеницы (до 20 кг/м²). На основании секвенирования гена 16S рРНК во время компостирования доминирующими типами были признаны актинобактерии: *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*. Ключевыми факторами окружающей среды для роста этих микроорганизмов были значение pH, содержание целлюлозы и гемицеллюлозы, азота, лигнина, а также влажность и зольность [68]. В целях защиты окружающей среды были исследованы различные по составу субстраты, и было показано, что для выращивания грибов *Pleurotus* могут быть использованы также и такие городские отходы как картон и кофейная гуща [69].

Процесс создания селективного субстрата для выращивания *A.bisporus* подразделяется на фазы, в ходе которых отмечена определенная последовательность бактериальных и грибковых сообществ, осуществляющих гидролитическое воздействие на сырье. Вначале происходит термобиологическая обработка, которая по существу является биоконверсией сырья. Сразу после процесса смачивания сырой смеси водой мезофильные организмы из родов *Solibacillus*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и *Sphingomonas* быстро потребляют легкодоступные питательные вещества, такие как свободные сахара и аминокислоты [58, 70]. В это время образуется аммиак, который стимулирует развитие микроорганизмов-конкурентов, таких как *Trichoderma* spp. [71]. Таким образом, важная роль местной микробиоты во время следующей фазы заключается в том, чтобы создать условия для его удаления из компоста [60]. В этот же период происходит развитие целлюлозоразрушающих актиномицетов и грибов, таких как *Thermopolyspora*, *Microbispora* и *Humicola*, обогащающих зрелый компост

продуктами разложения целлюлозы [72]. Преобладание разнообразных целлюлолитических микроорганизмов открывает большой потенциал для подготовки субстрата к дальнейшему выращиванию грибов.

Хотя грибы сосуществовали и взаимодействовали с бактериями с самых ранних стадий своей эволюции, все еще недостаточно сведений об этих взаимодействиях. С помощью современных методов исследования установлено, что в естественных условиях отобранная грибами микробиота располагается вдоль поверхности мицелия и в непосредственной близости от него [73]. Среда внутри грибов и вокруг них, иногда называемая микосферой, влияет как сама на бактерии, так и находится под сильным влиянием бактериальных сообществ до такой степени, что многие макрогрибы неспособны производить плодовые тела в стерильной среде [74].

В работе Irshad Ul Haq с соавторами [75] приведены доказательства того, что гифы как микоризных, так и сапротрофных грибов в результате выделения ими углеродсодержащих соединений в почве с очень низким содержанием углерода создают экологические возможности роста и процветания гетеротрофных бактерий. Микосфера представляет собой арену переноса генов, в которой множество генов, включая локально адаптивные, постоянно обмениваются между резидентными микробными сообществами [76]. При этом в качестве ускорителей эволюции в микосфере решающую роль играют плазмиды, выступая в качестве горизонтального генофонда и, следовательно, предоставляя факторы компетентности, как местным бактериям, так и грибам. Недавние исследования показывают, что перенос генов от бактерий к грибам поддается обнаружению и имеет эволюционное значение. Большой генофонд, присутствующий в микосфере, в сочетании с вероятностью межклеточного контакта между обитателями микосферы позволяет увеличить частоту рекомбинации, и поэтому организмы отбираются локально для повышения приспособленности.

На примере гриба *Rhizopus microspores*, вызывающего фитофтороз риса, показано, что в отсутствии эндосимбионта гриб-хозяин даже теряет способность к вегетативному размножению, и образование спорангиев и спор восстанавливается только при повторном внедрении эндобактерий. Это показывает, что симбионт производит факторы, необходимые для жизненного цикла гриба [77]. Интересной моделью для изучения трехкомпонентных микробных симбионтов и их эволюции является грибно-бактериально-вирусная система, показавшая влияние нарновирусов на биологию грибов [78].

Польза для грибов от формирования мутуалистических взаимоотношений с бактериями заключается в их улучшенном питании за счет совместного разложения сложных полиуглеводов, в потреблении ими летучих органических соединений, синтезируемых микроорганизмами, а также в секреции микроорганизмами антибиотиков, подавляющих рост конкурирующих микромицетов и обеспечивающих защиту от паразитов. В случае эктомикоризных грибов (трюфели или сморчки) бактерии способствуют их ассоциациям с растительными симбионтами [71, 79-84]. Кроме того, грибы способны также потреблять биомассу бактерий, ассимилируя бактериальный углерод и азот в качестве источника питательных веществ [58, 82]. Со своей стороны бактерии успешно используют в своем метаболизме грибковые экссудаты [85], а также могут вызывать широкий спектр заболеваний, а значит и значительные потери урожая [86, 87].

Существуют данные о том, что наличие полезных микроорганизмов в субстратах для выращивания грибов стимулирует их рост и образование плодовых тел [88, 89], улучшая качество и однородность продукции [90]. В некоторых

случаях это связано с синтезом и секрецией биологически активных метаболитов, таких как фитогормоны (ауксин, цитокинин и этилен), а также индоловой кислоты [91, 92]. Kertesz и Thai [58] исследовали ряд штаммов бактерий и грибов, способствующих росту культивируемых видов *Agaricus* и *Pleurotus* и включающий бактерии из родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Bradyrhizobium*. В процессе выращивания грибов они воздействовали на почву, субстрат, оболочку или мицелий гриба, повышая урожай, и сокращая время выращивания. Взаимодействия «микроорганизмы – грибы», описанные на сегодняшний день, включают стимуляцию роста микоризных грибов с одновременным установлением симбиотических взаимодействий [79], сокращение времени компостирования и улучшение качества субстрата [60], синергетический эффект стимуляции развития мицелия за счет высвобождения питательных веществ [82, 93], а также плодоношения грибов, то есть переключение с формирования вегетативной ткани на репродуктивную [94, 95].

Сведений о бактериях, способствующих росту грибов, относительно немного. Сообщалось, что два штамма *Pseudomonas putida*, выделенные из покровных слоев *A. bisporus*, можно применять при выращивании грибов для увеличения урожайности [96, 97]. Некоторые флуоресцентные штаммы *Pseudomonas*, обитающие на поверхности мицелия *Pleurotus ostreatus*, способствуют образованию примordia и ускоряют развитие базидиома. При исследовании разнообразия, стимулирующей способности и антагонистической активности бактериальных изолятов из плодовых тел *A. bisporus* было выявлено: 36 изолятов, продуцирующих индолилуксусную кислоту (как известно, являющуюся стимулятором роста высших растений); 19 изолятов, солибилизирующих фосфаты; и 29 изолятов, обладающих целлюлазной активностью. Около 40 изолятов проявили антагонистическую активность в отношении одного или нескольких патогенов [11]. В этом исследовании культивируемые бактерии, выделенные из плодового тела *A. bisporus*, были представлены семью бактериальными семействами. Пятью из шестнадцати секвенированных штаммов были *Bacillus* spp., показавшими высокую антимикробную активность в отношении патогенных бактерий, в частности, *B. cereus*-подобный изолят DY17, ингибировавший все тестируемые индикаторные патогены, что делает его перспективным для дальнейших исследований. Антимикробную активность проявили также штаммы *Streptomyces*. В сельскохозяйственных почвах повсеместно распространены *Pseudomonas* spp., некоторые виды которых способствуют росту *P. ostreatus* и *A. bisporus* [97]. Флуоресцирующие *Pseudomonas* spp. составляли 14–41% от общего количества бактерий, присутствующих в покровном слое, их популяция увеличивалась во время культивирования *A. bisporus*, что положительно сказывалось на урожайности гриба [96, 98].

В исследованиях Yan Jun Ma и др. [99] в бактериальном сообществе плодового тела гриба *Shiraia* sp. S9 также преобладали *Bacillus* и *Pseudomonas*. Некоторые изоляты *Pseudomonas*, такие как *P. fulva*, *P. putida* и *P. parafulva*, стимулировали накопление в грибах гиалуроновой кислоты. Обработка бактериями *P. fulva* SB1 примерно в 3,25 раза активировала экспрессию фермента и генов-переносчиков, необходимых для ее биосинтеза и экссудации. С другой стороны, *B. cereus* проявил способность уменьшать ее токсичность для грибов. Стимулирующая активность штаммов из родов *Bacillus* и *Pseudomonas* на рост высших грибов отмечена также и другими авторами [88, 96, 97, 99, 101]. Выявлено, что виды *Bacillus* spp., в частности *P. polymyxa*, участвуют в повышении селективности субстратов для культивирования как путем ингибирования роста

триходермы (*Trichoderma harzianum*), так и вследствие защиты гриба *P. ostreatus* за счет индукции лакказ. Таким образом, управление микробными сообществами во время культивирования *P.ostreatus*, например подготовка субстрата для поддержки роста *P.polymyxa* и других *Bacillus* spp., может быть способом оптимизации производства и иного использования грибов [102]. Интересно отметить, что максимальную антагонистическую активность против *T. harzianum* MTCC 3178, а также других патогенов, продемонстрировали *Bacillus* spp., выделенные из солончаковых почв Гоа. Это позволило рекомендовать их в качестве натурального фунгицида, альтернативного синтетическим фунгицидам, используемым при выращивании грибов [103].

Таким образом, новое направление исследований, основанное на использовании микроорганизмов, способствующих росту грибов, дополняя естественную микробиоту, покрывающую дефицит питательных веществ и осуществляющих защитную функцию, рассматриваются в качестве полезного руководства для оценки потребностей высших грибов и для разработки новых формул для коммерческих добавок [91].

Заключение

В заключение следует отметить, что польза от выращивания высших грибов не исчерпывается лишь пищевой и биологической ценностью их плодовых тел. Пронизанный мицелием субстрат, оставшийся после их культивирования, представляет собой биомассу, превышающую произведенную продукцию грибов по весу не менее, чем в 5 раз [52], обогащенную белками, в составе которых преобладают незаменимые аминокислоты - лейцин, треонин и лизин, что позволяет использовать его в качестве кормовой добавки [56, 104-108]. Для Казахстана он может представлять особую ценность, поскольку в животноводстве республики ощущается дефицит кормового белка при всего лишь 20% обеспеченности комбикормами [109]. В настоящее время от 80% до 85% всех пищевых и лекарственных грибных продуктов получают из плодовых тел и только 15% их основаны на экстрактах мицелия. Между тем, применение экстракта мицелия в качестве пищевого биоингредиента может представлять собой инновационную стратегию предотвращения и/или уменьшения негативных последствий микробной порчи пищевых продуктов и иметь большое значение для пищевой и фармацевтической промышленности [110].

Субстрат может быть использован также в качестве твердого удобрения в растениеводстве [111]. Отработанный грибной компост - это отходы, которые можно рециркулировать в качестве субстрата для поддержки нового коммерчески жизнеспособного цикла сельскохозяйственных культур при внесении в него необходимых добавок [91, 112]. Кроме того, возможно его применение и для производства упаковочных и строительных материалов, биотоплива и ферментов [113]. Наличие у некоторых базидиомицетов широкого спектра противомикробной активности в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, являющихся опасными контаминантами пищевых продуктов, позволило предложить использовать их в качестве основы для полимерного покрытия, обладающего противомикробными свойствами для защиты пищевых продуктов от порчи. Высокая гидролитическая активность грибов позволяет, кроме того, применять их для биоразложения органических загрязнителей, ксенобиотиков и промышленных загрязнителей [114].

Биотехнологический потенциал производства высших грибов имеет большие перспективы. Прогресса в этом направлении следует ожидать от разработки

способов управления биосинтеза грибами вторичных метаболитов, проявляющих наиболее высокую биологическую активность. При искусственном выращивании, отличающимся от существования в природных условиях, в отсутствие естественной конкуренции между пулом обнаруженных метаболитов и возможностями генома отмечается большой разрыв, объясняющийся наличием «молчащих» генов [115-116]. Вклад микробиомов растений и животных в «расширенный фенотип» своих хозяев, хорошо изучен, тогда как исследования микробиомов грибов только начаты. Уже показано, что количество биоактивных метаболитов грибов, полученных из культивируемого гриба, выращенного искусственным методом, намного меньше, чем количество, полученное из диких плодовых тел [117]. Дикie грибы считаются также более перспективным источником β -глюкана, используемого в пищевой промышленности и в медицинских целях [118]. Это свидетельствует в пользу совместного культивирования грибов с другими организмами, в частности, с бактериями, которое позволит не только раскрыть механизмы межвидовых взаимоотношений, но также даст возможность управляемого биосинтеза искомым вторичных метаболитов и ферментов макрогрибов [116, 119-121].

Стратегия сокультивирования, имитирующая симбиотические отношения организмов в их естественной среде обитания, является весьма эффективным подходом к выявлению и использованию мощного ресурса получения вторичных грибных метаболитов (низкомолекулярных, полисахаридов, полипептидов), проявляющих антимикробную, противоопухолевую и антиоксидантную активность, столь необходимую в настоящее время.

Финансирование

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

Литература:

- 1 Будаева В.В., Макарова Е.И., Скиба Е.А., Сакович Г.В. Ферментативный гидролиз продуктов гидротермобарической обработки мискантуса и плодовых оболочек овса // Катализ в промышленности. – 2013. - Vol.3. – P. 60-66.
- 2 Ali N., Zhang Q., Liu Z.Y., Li F.L., Lu M., Fang X.C. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products // Appl Microbiol Biotechnol. – 2020. – Vol. 104(2). – P. 455-473.
- 3 Sánchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi // Biotechnology Advances. – 2009. – Vol. 27, Issue 2. – P. 185-194.
- 4 Dimitrijevic M.V., Mitic V.D., Jovanovic O.P., Stankov Jovanovic V.P., Nikolic J.S., Petrovic G.M., Stojanovic G.S. Comparative study of fatty acids profile in eleven wild mushrooms of boletacea and russulaceae families // Chemistry & Biodiversity. - 2018. – Vol. 15(1). – Art. ID e1700434. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700434>
- 5 Rathore H., Prasad S., Sharma S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review // PharmaNutrition. - 2017. – Vol. 5(2). – P. 35–46.
- 6 Wang X.M., Zhang J., Wu L.H., Zhao Y.L., Li T., Li J.Q., Wang Y.Z., Liu H.G. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China // Food Chemistry. – 2014. – Vol. 151. – P. 279– 285.
- 7 Rathore H., Prasad S., Kapri M., Tiwari A., Sharma S. Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications // Journal of Functional Foods. – 2019. – Vol. 56. – P. 182– 193.

8 Cheung P.C.K. Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits // Food Science and Human Wellness. – 2013. – Vol. 2, Issues 3–4. – P. 162-166.

9 Bach F., Zielinski A.A.F., Helm C.V., Maciel G.M., Pedro A.C., Stafussa A.P., Avila S., Haminiuk C.W.I. Bio compounds of edible mushrooms: In vitro antioxidant and antimicrobial activities // LWT. – 2019. – Vol. 107. – P. 214– 220.

10 Wasser S.P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms // Applied Microbiology and Biotechnology. - 2011. – Vol. 89(5). – P. 1323–1332.

11 Xiang Q., Luo L., Liang Y., Chen Q., Zhang X., Gu Y. The Diversity, growth promoting abilities and anti-microbial activities of bacteria isolated from the fruiting body of *Agaricus bisporus* // Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists. – 2017. – Vol. 66(2). – P. 201-207.

12 Chang S.T., Wasser S.P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2012. – Vol. 14(2). – P. 95-134.

13 Bellettini M.B., Fiorda F.A., Maieves H.A., Teixeira G.L., Avila S., Hornung P.S., Maccari Júnior A., Ribani R.H. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2019. – Vol. 26(4). – P. 633– 646.

14 Kabel M.A., Jurak E., Mäkelä M.R., de Vries R.P. Occurrence and function of enzymes for lignocellulose degradation in commercial *Agaricus bisporus* cultivation // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2017. – Vol. 101(11). – P. 4363– 4369.

15 Govorushko S., Rezaee R., Dumanov J., Tsatsakis A. Poisoning associated with the use of mushrooms: A review of the global pattern and main characteristics // Food and Chemical Toxicology. – 2019. – Vol. 128. – P. 267-279.

16 Friedman M. Mushroom polysaccharides: Chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans // Foods. – 2016. – Vol. 5(4). – Art. ID 80. <https://doi.org/10.3390/foods5040080>

17 Вассер С.П. Наука о лекарственных шляпочных грибах: современные перспективы, достижения, доказательства и вызовы // Биосфера. - 2015. - №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/nauka-o-lekarstvennyh-shlyapochnyh-gribah-sovremennye-perspektivy-dostizheniya-dokazatelstva-i-vyzovy> (дата обращения: 17.09.2021).

18 Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. - Vol.60. – P. 258-274.

19 Liu Y., Bastiaan-Net S., Wichers H.J. Current understanding of the structure and function of fungal immunomodulatory proteins // Front Nutr. – 2020. – Vol. 7. – Art. ID 132. doi: 10.3389/fnut.2020.00132. eCollection 2020.

20 Zhao S., Gao Q., Rong C., Wang S., Zhao Z., Liu Y., Xu J. Immunomodulatory effects of edible and medicinal mushrooms and their bioactive immunoregulatory products // J Fungi (Basel). – 2020. – Vol. 6(4). – Art. ID 269. doi: 10.3390/jof6040269.

21 Wu H., Tao N., Liu X., Li X., Tang J., Ma C., Xu X., Shao H., Hou B., Wang H., Qin Z. Polysaccharide from *Lentinus edodes* inhibits the immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells // PLoS One. – 2012. - Vol.7 (12). – P. 51-57.

22 Feofilova E.P. Mycelial fungi as a source for obtaining new medical products with immunomodulating, antitumoral, and wound healing activities // Immun. Allerg. Infect. – 2004. - Vol.1. – P. 27-33.

23 Terry A.O., Kola O.J. Anti-leukemic and immunomodulatory effects of fungal metabolites of *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus ostreatus* on benzene-induced leukemia in Wister rats –Korean // J. Hematol. – 2012. - Vol.47 (1). – P. 67-73.

24 Patel S., Goyal A. Recent developments in mushrooms as anticancer therapeutics: a review // Biotech. – 2012. - Vol.2 (1). – P. 1-15.

25 Филиппова Е.И., Мазуркова Н.А., Кабанов А.С., Теплякова Т.В., Ибрагимова Ж.Б., Макаревич Е.В., Мазурков О.Ю., Шишкина Л.Н. Противовирусные свойства водных экстрактов, выделенных из высших базидиомицетов, в отношении пандемического вируса гриппа А(Н1N1)2009 // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 2. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=8920> (Дата обращения: 23.09.2021).

26 Bender S., Lonergan G.T., Backhaus J., Cross R.F., Dumitrach-Anghel C.N., Baker W.L. The antibiotic activity of the edible and medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing // Int. J. Med. Mushr. - 2001. - Vol.3 (1-2). - P.118.

27 Aramabašić Jovanović J., Mihailović M., Uskoković A., Grdović N., Dinić S., Vidaković M. The effects of major mushroom bioactive compounds on mechanisms that control blood glucose level // J Fungi (Basel). – 2021. – Vol. 7(1). – Art. ID 58. doi: 10.3390/jof7010058

28 Özyürek M., Bener M., Güglü K., Apak R. Antioxidant/antiradical properties of microwave-assisted extracts of three wild edible mushrooms // Food Chem. – 2014. - Vol.157. – P. 323-331.

29 Lou H., Guo X., Zhang X., Guo L. Optimization of cultivation conditions of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) for the highest antioxidant activity and antioxidant content // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2019. – Vol. 21(4). – P. 353-366.

30 Feeney M.J., Dwyer J., Hasler-Lewis C.M., Milner J.A., Noakes M., Rowe S., Wach M., Beelman R.B., Caldwell J., Cantorna M.T., Castlebury L.A., Chang S.T., Cheskin L.J., Clemens R., Drescher G., Fulgoni III V.L., Haytowitz D.B., Hubbard V.S., Law D., Miller A.M., Minor B., Percival S.S., Riscuta G., Schneeman B., Thornsby S., Toner C.D., Woteki C.E., Wu D. Mushrooms and Health Summit Proceedings // J Nutr. – 2014. – Vol. 144(7). – P. 1128S–1136S.

31 Phan C.W., David P., Naidu M., Wong K.H., Sabaratnam V. Therapeutic potential of culinary-medicinal mushrooms for the management of neurodegenerative diseases: diversity, metabolite, and mechanism // Crit. Rev. Biotechnol. – 2015. -Vol.35 (3). – P. 355-368.

32 Yadav S.K., Ir R., Jeewon R., Doble M., Hyde K.D., Kaliappan I., Jeyaraman R., Reddi R.N., Krishnan J., Li M., Durairajan S.S.K. A Mechanistic review on medicinal mushrooms-derived bioactive compounds: potential mycotherapy candidates for alleviating neurological disorders // Planta Med. – 2020. – Vol. 86(16). – P. 1161-1175.

33 Dai R., Liu M., Nabil W.N.N., Xi Z., Xu H. Mycomedicine: A unique class of natural products with potent anti-tumour bioactivities // Review Molecules. – 2021. – Vol. 26(4). – Art. ID 1113. doi: 10.3390/molecules26041113.

34 Wasser S.P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges // Biomed J. – 2014. – Vol. 37(6). – P. 345-356.

35 Zhang M., Zhang Y., Zhang L., Tian Q. Mushroom polysaccharide lentinan for treating different types of cancers: A review of 12 years clinical studies in China // Progress in Molecular Biology and Translational Science/ L. Zhang (Ed.). – Cambridge, MA: Academic Press, 2019. - Vol. 163. - P. 297– 328.

36 Liu K., Wang J., Zhao L., Wang Q. Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava* // Food and Chemical Toxicology. – 2013. – Vol. 58. – P. 375-380.

37 A. Krakowska, P. Zięba, A. Włodarczyk, K. Kała, K. Sułkowska-Ziaja, E. Bernaś, A. Sękara, B. Ostachowicz, B. Muszyńska. Selected edible medicinal mushrooms from *Pleurotus* genus as an answer for human civilization diseases // Food Chem. – 2020. – Vol. 327. – Art. ID 127084. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127084.

38 Jeitler M., Michalsen A., Frings D., Hübner M., Fischer M., Koppold-Liebscher D.A., Murthy V., Kessler C.S. Significance of medicinal mushrooms in integrative oncology: A narrative review // Front Pharmacol. – 2020. – Vol. 11. – Art. ID 580656. doi: 10.3389/fphar.2020.580656.

39 Mu H., Zhang A., Zhang W., Cui G., Wang S., Duan J. Antioxidative properties of crude polysaccharides from *Inonotus obliquus* // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol.13 (7). – P. 9194-9206.

40 Теплякова Т.В., Косогова Т.А., Ананько Г.Г., Бардашева А.В., Ильичева Т.Н. Противовирусная активность базидиальных грибов // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т.16 (2). – С.15-25.

41 Zhang M., Cui S.W., Cheung P.S.K. and Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity // Trends in Food Science and Technology. - 2007. - Vol.18. - P. 4-19

42 Ren D., Wang N., Guo J., Yuan L., Yang X. Chemical characterization of *Pleurotus eryngii* polysaccharide and its tumor-inhibitory effects against human hepatoblastoma HepG-2 cells // Carbohydr. Polym. – 2016. - Vol.138. – P. 123-133.

43 Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А., Ибрагимова Ж.Б., Юрганова И.А., Кабанов А.С., Пучкова Л.И., Бормотов Н.И., Бардашева А.В. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении ортопоксвирусов // Проблемы особо опасных инфекций. - 2012. - Вып. 3 (113). - С. 99-101.

44 Adotey G., Quarcoo A., Holliday J.C., et al. Effect of immunomodulating and antiviral agent of medicinal mushrooms (immune assist 24/7) on CD4+ T-lymphocyte counts of HIV-infected patients // International Journal of Medicinal Mushrooms. - 2011. - Vol. 13, № 2. - P. 109-113.

45 Ren L., Perera C., Hemar Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review // Food and function. - 2012. - Vol. 3. - P. 1118-1130.

46 Technical Report. The Use of Mushroom-Derived Dietary Supplements as Immunomodulating agents: An Overview of Evidence-Based Clinical Trials and the Mechanisms and Actions of Mushroom Constituents // Point Institute, Stevens Point, Wisconsin. 2013. – 16 p.

47 Rahi D.K., Malik D. Diversity of mushrooms and their metabolites of nutraceutical and therapeutic significance // Journal of Mycology. – 2016. - Vol. 2016. - Article ID 7654123. <https://doi.org/10.1155/2016/7654123>

48 Li Q.Z., Zheng Y.Z., Zhou X.W. Fungal immunomodulatory proteins: characteristic, potential antitumor activities and their molecular mechanisms // Drug Discov Today. – 2019. – Vol. 24(1). – P. 307-314.

49 Бабицкая В.Г. Биологически активная добавка к пище / В.Г. Бабицкая, А.Г. Лобанок, Л.В. Пленина // Успехи медицинской микологии, 2015. - 359 с.

50 Природная фармакология: грибы против вирусов // Наука из первых рук. 29.04.2020. URL: <https://scfh.ru/news/prirodnaya-farmakologiya-griby-protiv-virusov/> (Дата обращения 02.09.2021)

51 Chang S.T., Wasser S.P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health // *Int J Med Mushrooms*. – 2012. – Vol. 14(2). – P. 95-134.

52 Raman J., Jang K.Y., Oh Y.L., Oh M., Im J.H., Lakshmanan H., Sabaratnam V. Cultivation and nutritional value of prominent *Pleurotus* spp.: An Overview // *Mycobiology*. – 2020. – Vol. 49(1). – P. 1-14.

53 Chang S., Wasser S. The cultivation and environmental impact of mushrooms // *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*.
<https://oxfordre.com/environmentalscience/view/10.1093/acrefore/9780199389414.001.0001/acrefore-9780199389414-e-231>. (Дата обращения 21.09.2021)

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

55 Alvarez L.V., Bautista A.B. Growth and yield performance of *Pleurotus* on selected lignocellulosic wastes in the vicinity of PUP main campus, Philippines // *Indian Journal of Science and Technology*. – 2021. – Vol. 14, Issue 3. – P. 259-269.

56 Алексеева К.Л. Научные основы культивирования и защиты съедобных грибов от вредителей и болезней: дисс. ... докт. с.-х. наук: 06.01.06. – М., 2002. – 320 с.

57 Пат. RU2409019C2 Российская Федерация. Способ бациллярной термоанаэробной подготовки качественного соломистого субстрата для интенсивного нестерильного культивирования вешенки обыкновенной / Анненков Б. Г., Азарова В.А. - №RU2008128106/21А; заявл. 09.07.2008; опубл. 20.01.2011, Бюл. №2. – 10 с.

58 Kertesz M.A., Thai M. Compost bacteria and fungi that influence growth and development of *Agaricus bisporus* and other commercial mushrooms // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2018. – Vol. 102(4). – P. 1639-1650.

59 McGee C.F. Microbial ecology of the *Agaricus bisporus* mushroom cropping process // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2018. – Vol. 102. – P. 1075–1083.

60 Vieira F.R., Pecchia J.A. An exploration into the bacterial community under different pasteurization conditions during substrate preparation (Composting-Phase II) for *Agaricus bisporus* // *Cultivation Microb Ecol*. – 2018. – Vol. 75(2). – P. 318-330.

61 Patent EA30400-B1 Method of preparation of substrate for cultivation of oyster mushroom mycelium, involves pre-processing raw materials by solid phase fermentation using cellulolytic bacteria / Sadanov A.K., Saubenova M.G., Kuznetsova T.V., Sulejmenova Zh.B.; Appl. 25 Sept. 2014; Publ. 31 Jul 2018.

62 Ramos M., Burgos N., Barnard A., Evans G., Preece J., Graz M., Ruthes A.C., Jiménez-Quero A., Martínez-Abad A., Vilaplana F., Ngoc L.P., Brouwer A., der Burg B., del Carmen Garrigósa M., Jiménez A. *Agaricus bisporus* and its by-products as a source of valuable extracts and bioactive compounds // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 292. – P. 176-187.

63 Sánchez C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2010. – Vol. 85. – P. 1321–1337

64 Zhang B.B., Guan Y.Y., Hu P.F., Chen L., Xu G.R., Liu L., Cheung P.C.K. Production of bioactive metabolites by submerged fermentation of the medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea*: Recent advances and future development // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2019. – Vol. 39(4). – P. 541– 554.

65 Koutrotsios G., Zervakis G.I. Comparative examination of the olive mill wastewater biodegradation process by various wood-rot macrofungi // *BioMed Research International*. – 2014. – Art. ID 482937. <https://doi.org/10.1155/2014/482937>

66 Тарнопольская В.В., Алаудинова Е.В., Миронов П.В. Перспективы использования базидиальных грибов для получения кормовых продуктов // Хвойные бореальной зоны. – 2016. – №5-6. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/perspektivy-ispolzovaniya-bazidialnyh-gribov-dlya-polucheniya-kormovyh-produktov> (дата обращения: 23.09.2021).

67 Wang L., Mao J., Zhao H., Li M., Wei Q., Zhou Y., Shao H. Comparison of characterization and microbial communities in rice straw- and wheat straw-based compost for *Agaricus bisporus* production // J Ind Microbiol Biotechnol. – 2016. – Vol. 43(9). – P. 1249-1260.

68 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(1). – Art. ID 1151. doi: 10.1038/s41598-018-37681-6.

69 Nguyen T.M., Ranamukhaarachchi S.L. Effect of different culture media, grain sources and alternate substrates on the mycelial growth of *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus* // Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2020. – Vol. 23(3). – P. 223–230.

70 Kertesz M., Safianowicz K., Bell T. New insights into the microbial communities and biological activities that define mushroom compost // Proceedings of the 19th International Society for Mushroom Science (ISMS) Conference. – Baars, J.J.P., Sonnenberg, A.S.M., ISMS, 2016. – P. 161–165.

71 Pudielko K. Effect of forced ventilation during composting on *Agaricus bisporus* substrate selectivity // Int Biodeter Biodegr. – 2014. – Vol. 93. – P. 153–161.

72 Zhang X., Zhong Y., Yang S., Zhang W., Xu M., Ma A., Zhuang G., Chen G., Liu W. Diversity and dynamics of the microbial community on decomposing wheat straw during mushroom compost production // Bioresour Technol. – 2014. – Vol. 170. – P. 183-195.

73 Halsey J.A., Silva M.D.C.P., Andreote F.D. Bacterial selection by mycospheres of Atlantic rainforest mushrooms // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2016. – Vol. 109. – P. 1353–1365.

74 Noble R., Fermor T.R., Lincoln S., Dobrovin-Pennington A., Evered C., Mead A., Li R. Primordia initiation of mushroom (*Agaricus bisporus*) strains on axenic casing materials // Mycologia. – 2003. – Vol. 95. – P. 620–629.

75 Haq I.U., Zhang M., Yang P., van Elsas J.D. The interactions of bacteria with fungi in soil: emerging concepts // Adv Appl Microbiol. – 2014. – Vol. 89. – P. 185-215.

76 Zhang M.Z., Pereira e Silva M. de C., De Mares M.C., van Elsas J.D. The mycosphere constitutes an arena for horizontal gene transfer with strong evolutionary implications for bacterial-fungal interactions // FEMS Microbiol Ecol. – 2014. – Vol. 89(3). – P. 516-526.

77 Partida-Martinez L.P., Monajembashi S., Greulich K.O., Hertweck C. Endosymbiont-dependent host reproduction maintains bacterial-fungal mutualism // Curr Biol. – 2007. – Vol. 17(9). – P. 773-777.

78 Espino-Vázquez A.N., Bermúdez-Barrientos J.R., Cabrera-Rangel J.F., Córdova-López G., Cardoso-Martínez F., Martínez-Vázquez A., Camarena-Pozos D.A., Mondo S.J., Pawlowska T.E., Abreu-Goodger C., Partida-Martínez L.P. Narnaviruses: Novel players in fungal-bacterial symbioses // The ISME Journal. – 2020. – Vol. 14. – P. 1743–1754.

79 Sbrana C., Agnolucci M., Bedini S., Lepera A., Toffanin A., Giovannetti M., Nuti M.P. Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii*

ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth // FEMS Microbiol Lett. – 2002. – Vol. 211. – P. 195–201.

80 Pion M., Spangenberg J.E., Simon A., Bindschedler S., Flury C., Chatelain A., Bshary R., Job D., Junier P. Bacterial farming by the fungus *Morchella crassipes* // Proc R Soc Lond B Biol Sci. – 2013. – Vol. 280(1773). – Art. ID 20132242. doi: 10.1098/rspb.2013.2242

81 Antunes L.P., Martins L.F., Pereira R.V., Thomas A.M., Barbosa D., Lemos L.N., G.M. Machado Silva, L.M. Silva Moura, G.W. Condomitti Epamino, L.A. Digiampietri, K.C. Lombardi, P.L. Ramos, R.B. Quaggio, J.C.F. de Oliveira, R.C. Pascon, J.B. da Cruz, A.M. da Silva, J.C. Setubal. Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – Art. ID 38915. <https://doi.org/10.1038/srep38915>

82 Vos A.M., Heijboer A., Boschker H.T.S., Bonnet B., Lugones L.G., Wösten H.A.B. Microbial bio- mass in compost during colonization of *Agaricus bisporus* // AMB Express. – 2017. – Vol. 7. – Art. ID 12. doi: 10.1186/s13568-016-0304-y

83 Pandin C., Le Coq D., Deschamps J., Védie R., Rousseau T., Aymerich S., Briandet R. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* QST713: a biocontrol agent that protects *Agaricus bisporus* crops against the green mould disease // J Biotechnol. – 2018. – Vol. 278. – P. 10–19.

84 Pandin C., Védie R., Rousseau T., Le Coq D., Aymerich S., Briandet R. Dynamics of compost microbiota during the cultivation of *Agaricus bisporus* in the presence of *Bacillus velezensis* QST713 as biocontrol agent against *Trichoderma aggressivum* // Biol Control. – 2018. – Vol. 127. – P. 39–54.

85 Warmink J.A., Van Elsas J.D. Migratory response of soil bacteria to *Lyophyllum* sp. strain Karsten in soil micro-cosms // Appl Environ Microbiol. – 2009. – Vol. 75. – P. 2820–2830.

86 Frey-Klett P., Burlinson P., Deveau A., Barret M., Tarkka M., Sarniguet A. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists // Microbiol Mol Biol Rev. – 2011. – Vol. 75. – P. 583–609.

87 Gea F.J., Navarro M.J. Mushroom diseases and control // Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications / Cunha D., Pardo-Gimenez A. (eds). - Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2017. - P. 239–259.

88 Kim M.K., Math R.K., Cho K.M., Shin K.J., Kim J.O., Ryu J.S., Y.H. Lee, H.D. Yun. Effect of *Pseudomonas* sp. P7014 on the growth of edible mushroom *Pleurotus eryngii* in bottle culture for commercial production // Bioresour Technol. – 2008. – Vol. 99. – P. 3306–3308.

89 Zagryadskaya Y.A., Lysak L.B., Chernov I.Y. Bacterial communities in the fruit bodies of ground basidiomycetes // Eurasian Soil Sci. – 2015. – Vol. 48. – P. 620–626.

90 Kaneko M, Tanimoto E. Auxin-regulation of hyphal elongation and spore germination in arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* // International Symposium “Root Research and Applications” Root RAP, 2009 September 2–4; Boku, Vienna, Austria. – 2 p.

91 Carrasco J., Zied D.C., Pardo J.E., Preston G.M., Pardo-Giménez A. Supplementation in mushroom crops and its impact on yield and quality // AMB Exp. – 2018. – Vol. 8. – P. 146–154.

92 Лощинина Е.А. Влияние внешних факторов бактериальной, индольной и селенорганической природы на рост и развитие ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes*: дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.03. - Саратов – 2011. - 169 с.

93 Pratiksha K., Narute T.K., Surabhi S., Ganesh A., Sujoy S. Effect of liquid biofertilizers on the yield of button mushroom // J Mycopathol Res. – 2017. – Vol. 55. – P. 135–141.

94 Chen S., Qiu C., Huang T., Zhou W., Qi Y., Gao Y., Shen J., Qiu L. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing bacteria on the hyphal growth and primordium initiation of *Agaricus bisporus* // Fungal Ecol. – 2013. – Vol. 6. – P. 110–118.

95 Colauto N.B., Fermor T.R., Eira A.F., Linde G.A. *Pseudomonas putida* stimulates primordia on *Agaricus bitorquis* // Curr Microbiol. – 2016. – Vol. 72(4). – P. 482–488.

96 Zarenejad F., Yakhchali B., Rasooli I. Evaluation of indigenous potent mushroom growth promoting bacteria (MGPB) on *Agaricus bisporus* production // World J Microbiol Biotechnol. – 2012. – Vol. 28. – P. 99–104.

97 Cho Y.S., Kim J.S., Crowley D.E., Cho B.G. Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads // FEMS Microbiol Lett. – 2003. – Vol. 218. – P. 271–276.

98 Siyoum N.A., Surridge K., Korsten L. Bacterial profiling of casing materials for white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) using denaturing gradient gel electrophoresis // Sth Afr J Sci. – 2010. – Vol. 106(9/10). – P. 49–54.

99 Ma Y.J., Zheng L.P., Wang J.W. Bacteria associated with *Shiraia* fruiting bodies influence fungal production of hypocrellin A // Front Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – Art ID 2023. doi: 10.3389/fmicb.2019.02023

100 Ebadi A., Alikhani H.A., Rashtbari M. Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) on the morpho physiological properties of button mushroom *Agaricus bisporus* in two different culturing beds // Int Res J Basic Appl Sci. – 2012. – Vol. 3. – P. 203–212.

101 Potočnik I., Rekanović E., Todorović B., Luković J., Paunović D., Stanojević O., Milijašević-Marčić S. The effects of casing soil treatment with *Bacillus subtilis* Ch-13 biofungicide on green mould control and mushroom yield // Pestic Phytomed (Belgrade). – 2019. – Vol. 34. – P. 53–60.

102 Velázquez-Cedeño M., Farnet A.M., Mata G., Savoie J.M. Role of *Bacillus* spp. in antagonism between *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzianum* in heat-treated wheat-straw substrates // Bioresource Technology. – 2008. – Vol. 99(15). – P. 6966–6973

103 Fernandes M.S., Kerkar S. Halotolerant *Bacillus* sp. as a source of antifungal agents against major mushroom pathogens // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – 2019. – Vol. 8, No. 5. – P. 1125–1129.

104 Рубцов А.А. Усовершенствование элементов технологии приготовления субстрата для выращивания вешенки: дисс. ... канд. с-х. наук: 06.01.06. – М., 2007. – 157 с.

105 Романенко Е.С., Шарипова О.В., В Мурадян В.Р. Половинкина В. Переработка соломистых отходов производства гриба вешенки // Международный журнал экспериментального образования. – 2010. – Т. 8. – С. 131–132.

106 Жилинская Н.В. Противомикробные свойства базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (VILL.: FR.) BOND. ET SING., *Fomitopsis pinicola* (SW.: FR) P. KARST. И *Trametes versicolor* (L.: FR.) LLOYD: оценка перспектив использования в технологии пищевых продуктов: дисс. ... канд. биол. наук. – М., 2015. – 194 с.

107 Alabid I., Glaeser S.P., Kogel K.H. Endofungal bacteria increase fitness of their host fungi and impact their association with crop plants // Curr Issues Mol Biol. – 2019. – Vol. 30. – P. 59–74.

108 Economou C.N., Philippoussis A.N., Diamantopoulou P.A. Spent mushroom substrate for a second cultivation cycle of *Pleurotus mushrooms* and dephenolization of agro-industrial wastewaters // FEMS Microbiol Lett. – 2020. – Vol. 367(8). – Art. ID fnaa060. doi: 10.1093/femsle/fnaa060.

109 Алимкулов Ж.С., Жумалиева Г.Е., Сапарова У.Ж., Шаулиева К.Т. Использование отходов переработки масличных культур при кормлении сельскохозяйственных животных // «Аграрий Казахстана» Казахская сельскохозяйственная газета. URL: <http://abkaz.kz/ispolzovanie-otxodov-pererabotki-maslichnyx-kultur-pri-kormlenii-selskoxozyajstvennyx-zhivotnyx/> (дата обращения 23.09.2021)

110 Llauro G., Morris H.J., Ferrera L., Camacho M., Castán L., Lebeque Y., Beltrán Y., Cos P., Bermúdez R.C. In-vitro antimicrobial activity and complement/macrophage stimulating effects of a hot-water extract from mycelium of the oyster mushroom *Pleurotus* sp. // Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2015. – Vol. 30. – P. 177-183

111 Шахсеванимуджарад Л.А., Гасымов Ш.Н., Аттатгусейни М.Ю., Мурадов П.З., Алиева В.Д. Грибные биотехнологии в медицине и промышленности // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. - Т.1. – С. 274.

112 Zied D.C., Sánchez J.E., Noble R., Pardo-Giménez A. Use of spent mushroom substrate in new mushroom crops to promote the transition towards a circular economy // Agronomy. – 2020. – Vol. 10(9). – Art. ID 1239; <https://doi.org/10.3390/agronomy10091239>

113 Grimm D., Wösten H.A.B. Mushroom cultivation in the circular economy // Appl Microbiol Biotechnol. – 2018. – Vol. 102(18). – P. 7795-7803.

114 Cohen R., Persky L., Hadar Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus* // Appl Microbiol Biotechnol. – 2002. – Vol. 58(5). – P. 582-594.

115 Moody S.C. Microbial co-culture: harnessing intermicrobial signaling for the production of novel antimicrobials // Future Microbiol. – 2014. – Vol. 9(5). – P. 575-578.

116 Shen X.T., Mo X.H., Zhu L.P., Tan L.L., Du F.Y., Wang Q.W., Zhou Y.M., Yuan X.J., Qiao B., Yang S. Unusual and highly bioactive sesterterpenes synthesized by *Pleurotus ostreatus* during coculture with *Trametes robiniophila* // Murr Appl Environ Microbiol. – 2019. – Vol. 85(14). – Art. ID e00293-19. doi: 10.1128/AEM.00293-19.

117 Zhang B.B., Guan Y.Y., Hu P.F., Chen L., Xu G.R., Liu L., Cheung P.C.K. Production of bioactive metabolites by submerged fermentation of the medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea*: recent advances and future development // Review Crit Rev Biotechnol. – 2019. – Vol. 39(4). – P. 541-554.

118 Mirończuk-Chodakowska I., Witkowska A.M. Evaluation of Polish wild mushrooms as beta-glucan sources // Int J Environ Res Public Health. – 2020. – Vol. 17(19). – Art. ID 7299. doi: 10.3390/ijerph17197299.

119 Essig A., Hofmann D., Münch D., Gayathri S., Kunzler M., Kallio P.T., Sahl H.G., Wider G., Schneider T., Aebi M. Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis // Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 289(50). – P. 34953–34964.

120 Kumar A., Arora S., Jain K.K., Sharma K.K. Metabolic coupling in the co-cultured fungal-yeast suite of *Trametes ljubarskyi* and *Rhodotorula mucilaginosa* leads to hypersecretion of laccase isozymes // Fungal Biology. – 2019. – Vol. 123(12). – P. 913-926.

121 Yu G., Sun Y., Han H., Yan X., Wang Y., Ge X., Qiao B., Tan L. Coculture, an efficient biotechnology for mining the biosynthesis potential of macrofungi via

interspecies interactions // Front. Microbiol. – 2021. – Vol. 12. – Art. ID 663924.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663924>

М.Г. САУБЕНОВА, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ, А.А. АЙТЖАНОВА,
Д.Д. БОКЕНОВ

Товарищество с ограниченной ответственностью «Научно – производственный
центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы

ЖОҒАРЫ САТЫДАҒЫ САҢЫРАУҚҰЛАҚТАРДЫ ӨСІРУДІҢ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ АСПЕКТІЛЕРІ

Түйін

Жер шарындағы халық санының өсуі, табиғи ресурстардың сарқылуы және осыған байланысты азық-түліктің жетіспеуі қоршаған ортаны қорғау және балама тамақ көздерін алу мақсатында өндірілетін өсімдік қалдықтарын қайта өңдеу қажеттілігі туралы мәселе туғызады. Жоғары сатыдағы саңырауқұлақтарды өндіру үшін құрамында целлюлоза бар өсімдік қалдықтарын пайдалану осы мәселелердің оңтайлы шешімі болып табылады. Жоғары сатыдағы саңырауқұлақтардың жоғары тағамдық және дәрілік құндылығы көптеген зерттеулермен дәлелденді. Алайда, жоғары сатыдағы саңырауқұлақтарды өсіру процестері осы саланың өсуін тежейтін субстраттың селективтілігі проблемасына тап болады. Қазіргі уақытта жоғары сатыдағы саңырауқұлақтар мен микроорганизмдердің өзара әрекеттесуі туралы мәліметтер жинақталады, бұл жоғары сатыдағы саңырауқұлақтардың іс жүзінде құнды метаболиттерінің басқарылатын өсіру және бағытталған биосинтезіне мүмкіндік береді. Мақала микроорганизмдердің жоғары сатыдағы саңырауқұлақтарды өсіру процесіне әсерінің әртүрлі аспектілеріне арналған.

Кілтті сөздер: жоғары сатыдағы саңырауқұлақтар, өсімдік шаруашылығының целлюлозасы бар қалдықтары, компосттау, өсуді ынталандыру, мутуалистік қатынастар, микосфера.

IRSTI: 34.27.19, 62.13.63

M.G. SAUBENOVA, Y.A. OLENIKOVA, Z.N. YERMEKBAY, A.A. AITZHANOVA,
D.D. BOKENOV

Limited Liability Company “Research and Production Center for Microbiology and
Virology”, Almaty

MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF GROWING MUSHROOMS

doi: 10.53729/MV-AS.2021.03.01

Summary

The growing population of the world, the depletion of natural resources and the associated food shortage raise the question of recycling the plant waste produced to protect the environment and obtain alternative food sources. The use of cellulose-containing crop residues for the production of mushrooms is the optimal solution to these problems. The high nutritional and medicinal value of mushrooms has been proven by numerous studies. However, the processes of cultivation of higher fungi are faced with the problem of substrate selectivity, which inhibits the growth of this industry. To date,

data are accumulating on the interaction of higher fungi and microorganisms, which opens up possibilities for controlled cultivation and directed biosynthesis of practically valuable metabolites of higher fungi. The article is devoted to various aspects of the influence of microorganisms on the process of growing mushrooms.

Key words: higher fungi, cellulose-containing crop waste, composting, growth stimulation, mutualistic relationships, mycosphere.

The world's population is growing steadily. So, if at the beginning of the twentieth century there were 1.6 billion people in the world, then it ended with 6.0 billion. According to the 2015 UN World Population Prospects report, the number of people in the world in mid-2015 was 7.3 billion, and it is projected that by 2030 it will reach 8.5 billion, by 2050 - 9.7 billion, and by 2100 - 11.2 billion, with most of the growth coming from less developed countries. An increase in the population of about 80 million each year raises well-founded concerns about the possibility of providing it with the necessary amount of food and an adequate level of medical care, as well as about the associated increased pressure on global ecosystems. Already, food shortages, deteriorating health and environmental quality are serious problems that negatively affect human well-being.

Despite the constant development of new technologies and innovations, the solution to the issue is limited by the restricted opportunity to intensify agriculture and livestock, as stated in the ZERI (Zero Emission Research Initiative) report by Habluzel: "We cannot expect the Earth to produce more - we must do more with what the Earth is already producing. " The rapid depletion of traditional resources is forcing people to seek alternative sources of food, fertilizer and fuel. In this regard, there is an acute need for deeper processing of various types of waste, their involvement in industrial circulation as secondary raw materials.

The most common waste of practical human activities that pollute the environment are various crop residues and other cellulose-containing by-products of agricultural and industrial human activities, the world production of which is about 200 billion tons per year [1, 2], the processing and disposal of which is difficult due to for their complex chemical composition. The widespread method of getting rid of them by burning (especially in the countries of South and Southeast Asia and Africa) is currently subject to a strict ban due to the aggravation of the greenhouse effect, high levels of air pollution that adversely affect public health, the death of beneficial microflora in the soil, and other objective reasons.

One of the most acceptable and even optimal solutions in this regard in the 21st century is the production of higher mushrooms, which play an important role in many aspects of human well-being, as proven by their centuries-old use. Fungi have two types of extracellular enzymatic systems; a hydrolytic system that produces hydrolases responsible for the degradation of polysaccharides; and a unique oxidative and extracellular ligninolytic system that degrades lignin and opens phenyl rings [3]. Without negative legal, ethical and other consequences, this form of bioconversion has not only beneficial socio-economic benefits in obtaining food, but also increases the employment opportunities of the population and has a positive impact on the environment.

Nutritional and biological value of mushrooms

Edible mushrooms are widely consumed in many countries and are valuable components of the diet due to their attractive taste, aroma and nutritional value, which makes them a gourmet food. On the other hand, due to the low cost of production and accessibility for the general population, they are called "meat for the poor" [4]. The moisture content of the fruit bodies of fresh macrofungi is about 90%. In terms of dry

matter, they contain 50 to 65% carbohydrates, 19 to 35% proteins, and a relatively low amount of fat from 2 to 6% [5, 6]. Due to the high content of unsaturated fatty acids (palmitic, oleic and linoleic), biologically active proteins (enzymes, lectins, ergothioneine, etc.), phenolic compounds (phenolic acids and polyphenols), vitamins (thiamine, riboflavin, ascorbic acid, niacin and tocopherols) and other biologically active substances, mushrooms can be considered as an important source of low-calorie functional food and nutraceuticals [7]. The great food benefit of mushrooms is that they contain high levels of dietary fiber [8] and antioxidants. The high content of antioxidant compounds, easily extracted with a non-toxic solvent, allows the use of *Agaricus brasiliensis* extract in the food industry as a natural antioxidant [9].

It is the desire for a balanced diet that has led humanity to an increase in the consumption of mushroom products all over the world [10]. In China, it accounts for more than 80% of world production; worldwide, mushroom production is also steadily increasing (according to FAO), this is especially true for developing countries.

One of the most widely cultivated mushrooms in Western countries is *Agaricus bisporus*, commonly known as white champignon, which occupies ecological niches rich in lignocellulose. *A. bisporus* has been an important component of the human diet for over 200 years. It accounts for most of the total mushrooms consumed in most western countries. The second most common in the world is *Pleurotus* spp - the so-called oyster mushroom. In China and a number of other Southeast countries, preference is given to *Lentinus edodes* (shiitake), and also *Flammulina velutipes* (winter macro mushrooms), *Auricularia auricula* (woody macro mushrooms) and *Volvariella volvacea* (straw mushroom) are grown [11-14]. Medicinal macro mushrooms have also become widespread, including *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* [15], *Phellinus linteus*, *Antrodia cinnaomea*, and *Xylaria nigripes* [12, 16].

As the long-term experience of traditional medicine in the southeastern countries - China, Japan, Korea, etc., has shown, the fruit bodies of many macromycetes are characterized by a number of advantages not only of gustatory and nutritional, but also therapeutic nature. In China alone, over 270 species of mushrooms of medical importance have been recorded, with more than 100 macromycetes commonly used in traditional medicine.

The use of mushrooms is completely in line with the old Chinese saying: "Medicine and food have a common origin." This statement is especially applicable to mushrooms, the nutritional and medicinal properties and tonic effects, which have long been recognized as nutraceuticals or dietary supplements [17].

Phenolic compounds, terpenes, steroids and polysaccharides contained in mushrooms have different biological activities. They have anti-inflammatory [18], immunostimulating [19-23], antiviral [24, 25], hepatoprotective, antiallergenic, antibiotic [26, 27], antioxidant [28, 29], hypocholesterolemic and antiatherogenic properties and are used to treat cardiovascular diseases, hypertension, atherosclerosis, diabetes [30], the consequences of heart attacks and strokes, Parkinson's disease, Alzheimer's [31, 32], and also, due to antitumor properties, to reduce the likelihood of cancer invasion and metastasis [33-38]. These properties have been confirmed both *in vitro* and *in vivo* [21, 39-42].

It is very important for modern medicine that macrofungi are an inexhaustible source of polysaccharides (especially P-glucans) and polysaccharide-protein complexes that simultaneously possess antiviral, anticancer and immunostimulating properties [43-47], which makes it possible to develop drugs with complex action. The health benefits of mushroom dietary fiber include strengthening the immune system, in relation to anti-cancer functions, and controlling blood lipids and glucose [8].

Damaging or weakening the patient's natural immunological responses, especially with chemotherapy and radiotherapy, is a major problem in the treatment of cancer. Mushrooms help to improve the quality of life of patients due to the fact that they activate the body's natural immune responses and can be used as supportive therapy and for the prevention of cancer [48]. The role of such agents from basidiomycetes is increasing in the prevention and treatment of viral infections, as well as, possibly, in the prevention of tumor processes that can be "triggered" in the human body when exposed to viruses.

Although the active effect of mushroom preparations is inferior to that of chemically synthesized ones, they have a lower cost than their counterparts. In addition, biologically active substances of fungi do not have a toxic effect, which is noted during the course of chemotherapy [49].

In recent decades, preparations from the fruiting bodies of mushrooms have successfully conquered the pharmaceutical markets of Europe, the USA and, especially, Japan, where they account for up to a third of all used immunocorrectors and oncostatics. Novosibirsk specialists from the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" have identified the most promising strains of fungi that are active against HIV-1, herpes simplex viruses, West Nile, influenza of various subtypes and orthopoxviruses (smallpox, etc.), and some of them turned out to be simultaneously active against three or more pathogens. The well-known birch mushroom, or chaga (fruit bodies of the mown tinder fungus), became the absolute record holder: its extract suppressed absolutely all the viruses studied. Some other species of tinder fungus, as well as common stinkhorn, lung oyster, and oyster mushroom have shown high antiviral activity [50].

Mushroom cultivation

The advantage of fungi lies in their ability to produce a group of complex extracellular hydrolytic enzymes, such as laccase and universal peroxidases, which ensure the availability of lignocellulose for further use as a source of carbon nutrition [51, 52]. Mushrooms can be grown using traditional farming methods or using highly industrial technologies in urban and suburban settings [53–55]. The productivity of mushrooms with industrial methods of their production reaches 120-150 kg per 1 m² of usable area, which corresponds to the production of 4.8-6.2 tons of dry protein per hectare per year [56].

In recent years, a selective substrate has been recognized as optimal, which differs from the widespread early sterile substrate by the absence of the need for large energy costs, freeing it from mold fungi and other microorganisms that compete with mushrooms for food sources. The most widespread and economically viable method of obtaining a selective substrate for cultivating macrofungi is the method of solid-phase microbial fermentation, in other words, composting, which makes it possible to dispose of various wastes. Thus, the commercial production of mushrooms is based on a series of stages of solid fermentation under controlled conditions, in which the fungi, together with bacteria, process raw materials, minimize the development of fungal competitors, and stimulate the fruiting process [57–61].

For growing mushrooms, various lignocellulosic wastes of the agro-industrial complex can be used - wheat and rice straw, other crop residues, bran, rice husks, corn cobs, forestry by-products, as well as waste from olive plants, coffee production, vegetative part of Jerusalem artichoke, cotton stalks, peanut tops, soybean straw, stems, leaves of pigeon peas, etc. [62-66], resulting in the formation of highly nutritious ecologically clean biomass.

The most common raw material for mushroom production in Southeast Asia is rice straw. According to Lin Wang et al. [67], when composting, the temperature of the

converted mass rises much faster than when composting wheat straw, and the ratio of carbon to nitrogen decreases faster. The diversity of the bacterial community of rice straw compost was large compared to wheat straw compost in the early stages of composting, and then the difference was smoothed out. Accordingly, composting rice straw leads to improved decomposition and assimilation of decay products by the *A. bisporus* fungus, which indicates its greater efficiency. Modern research methods have found that the diversity of bacteria involved in the preparation of the substrate is significantly greater than reported in studies based on methods dependent on cultivation. Their livelihoods to a large extent depend on the composting conditions. Thus, the *Bacillales* order shows a relatively higher content of taxonomic units at a higher pasteurization temperature, which was also associated with measurements of high ammonia emissions, which slows down the growth of *A. bisporus* mycelium [60]. Millet straw is also an effective resource for growing mushrooms, which is not inferior in yield to wheat straw (up to 20 kg/m²). Based on the 16S rRNA gene sequencing during composting, actinobacteria, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, and *Proteobacteria* were recognized as dominant types. The key environmental factors for the growth of these microorganisms were the pH value, the content of cellulose and hemicellulose, nitrogen, lignin, as well as moisture and ash content [68]. In order to protect the environment, substrates of various compositions have been investigated, and it has been shown that urban waste such as cardboard and coffee grounds can also be used to grow *Pleurotus* mushrooms [69].

The process of creating a selective substrate for the cultivation of *A. bisporus* is subdivided into phases, during which a definite sequence of bacterial and fungal communities, which hydrolytically affect the raw material, is marked. First, there is a thermobiological treatment, which is essentially a bioconversion of the raw material. Immediately after the process of wetting the crude mixture with water, mesophilic organisms from the genera *Solibacillus*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, and *Sphingomonas* rapidly consume readily available nutrients such as free sugars and amino acids [58, 70]. During this time, ammonia is formed, which stimulates the development of competing microorganisms such as *Trichoderma* spp. [71]. Thus, an important role for the local microbiota during the next phase is to create conditions for its removal from the compost [60]. During the same period, the development of cellulose-degrading actinomycetes and fungi, such as *Thermopolyspora*, *Microbispora*, and *Humicola*, enriches the mature compost with cellulose decomposition products [72]. The predominance of a variety of cellulolytic microorganisms opens up great potential for preparing the substrate for further mushroom cultivation.

Although fungi have coexisted and interacted with bacteria from the earliest stages of their evolution, there is still insufficient information about these interactions. With the help of modern research methods, it has been established that under natural conditions, the microbiota selected by fungi is located along the surface of the mycelium and in the immediate vicinity of it [73]. The environment inside and around fungi, sometimes called the mycosphere, affects both bacteria itself and is strongly influenced by bacterial communities to such an extent that many macrofungi are unable to produce fruiting bodies in a sterile environment [74].

Irshad Ul Haq et al. [75] provide evidence that the hyphae of both mycorrhizal and saprotrophic fungi, as a result of their release of carbon-containing compounds in soil with a very low carbon content, create ecological opportunities for the growth and prosperity of heterotrophic bacteria. The microsphere is a gene transfer arena in which many genes, including locally adaptive ones, are constantly exchanged between resident microbial communities [76]. At the same time, plasmids play a decisive role as accelerators of evolution in the mycosphere, acting as a horizontal gene pool and,

therefore, providing competence factors for both local bacteria and fungi. Recent research shows that gene transfer from bacteria to fungi is detectable and has evolutionary implications. The large gene pool present in the mycosphere, combined with the likelihood of intercellular contact between the inhabitants of the mycosphere, allows an increase in the frequency of recombination, and therefore organisms are selected locally to improve fitness.

Using the example of the fungus *Rhizopus* microspores, which causes late blight in rice, it has been shown that in the absence of endosymbiont, the host fungus even loses its ability to vegetatively reproduce, and the formation of sporangia and spores is restored only upon repeated introduction of endobacteria. This shows that the symbiont produces the factors necessary for the life cycle of the fungus [77]. An interesting model for studying three-component microbial symbionts and their evolution is the fungal-bacterial-viral system, which showed the effect of narnoviruses on the biology of fungi [78].

The benefits for fungi from the formation of mutualistic relationships with bacteria lie in their improved nutrition due to the joint decomposition of complex polycarbohydrates, in their consumption of volatile organic compounds synthesized by microorganisms, as well as in the secretion of antibiotics by microorganisms that suppress the growth of competing micromycetes and provide protection against parasites. In the case of ectomycorrhizal fungi (truffles or morels), bacteria contribute to their associations with plant symbionts [71, 79-84]. In addition, mushrooms are also able to consume bacterial biomass by assimilating bacterial carbon and nitrogen as a source of nutrients [58, 82]. For their part, bacteria successfully use fungal exudates in their metabolism [85], but can also cause a wide range of diseases, and hence significant crop losses [86, 87].

There is evidence that the presence of beneficial microorganisms in substrates for growing mushrooms stimulates their growth and the formation of fruit bodies [88, 89], improving the quality and uniformity of products [90]. In some cases, this is associated with the synthesis and secretion of certain biologically active metabolites, such as phytohormones (auxin, cytokinin, and ethylene), as well as indolic acid [91, 92]. Kertesz and Thai [58] studied a number of bacterial and fungal strains promoting the growth of cultivated *Agaricus* and *Pleurotus* species and including bacteria from the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Bradyrhizobium*. In the process of growing mushrooms, they acted on the soil, substrate, shell or mycelium of the fungus, increasing the yield and shortening the growing time. The interactions "microorganisms - mushrooms" described to date include stimulating the growth of mycorrhizal fungi with the simultaneous establishment of symbiotic interactions [79], reducing composting time and improving the quality of the substrate [60], a synergistic effect of stimulating mycelium development due to the release of nutrients [82, 93], as well as the fruiting of fungi, that is, switching from the formation of vegetative tissue to reproductive tissue [94, 95].

There is relatively little information on the bacteria that promote the growth of mushrooms. It was reported that two strains of *Pseudomonas putida* isolated from the casing layers of *A. bisporus* can be used for growing mushrooms to increase the yield [96, 97]. Some fluorescent *Pseudomonas* strains living on the surface of the *Pleurotus ostreatus* mycelium promote the formation of primordium and accelerate the development of basidioma. Studying the diversity, stimulating ability and antagonistic activity of bacterial isolates from *A. bisporus* fruiting bodies revealed: 36 isolates producing indoleacetic acid (which is known to stimulate the growth of higher plants); 19 isolates solubilizing phosphates; and 29 isolates with cellulase activity. About 40 isolates showed antagonistic activity against one or several pathogens [11]. In this study, cultured bacteria isolated from the fruiting body of *A. bisporus* were represented by seven bacterial families. Five of the sixteen sequenced strains were *Bacillus* spp., which showed high

antimicrobial activity against pathogenic bacteria, in particular, *B. cereus*-like isolate DY17, which inhibited all tested indicator pathogens, which makes it promising for further research. Strains of *Streptomyces* also showed antimicrobial activity. *Pseudomonas* spp. is ubiquitous in agricultural soils, some of which promote the growth of *P. ostreatus* and *A. bisporus* [97]. Fluorescent *Pseudomonas* spp. accounted for 14–41% of the total number of bacteria present in the casing layer, their population increased during the cultivation of *A. bisporus*, which had a positive effect on the yield of the fungus [96, 98].

In studies by Yan Jun Ma et al. [99] in the bacterial community of the fruiting body of the fungus *Shiraia* sp. S9 was also dominated by *Bacillus* and *Pseudomonas*. Some *Pseudomonas* isolates, such as *P. fulva*, *P. putida*, and *P. parafulva*, stimulated the accumulation of hyaluronic acid in fungi. Treatment with *P. fulva* SB1 bacteria approximately 3.25 times activated the expression of the enzyme and carrier genes necessary for its biosynthesis and exudation. On the other hand, *B. cereus* has shown the ability to reduce its fungal toxicity. The stimulating activity of strains from the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* on the growth of higher fungi was also noted by other authors [88, 96, 97, 99, 101]. It was revealed that *Bacillus* spp. species, in particular *P. polymyxa*, are involved in increasing the selectivity of substrates for cultivation both by *inhibiting the growth of Trichoderma (Trichoderma harzianum)* and by *protecting the fungus P. ostreatus* due to the induction of laccases. Thus, the management of microbial communities during the cultivation of *P. ostreatus*, for example, preparation of a substrate to support the growth of *P. polymyxa* and other *Bacillus* spp., Can be a way to optimize the production and other use of fungi [102]. It is interesting to note that the maximum antagonistic activity against *T. harzianum* MTCC 3178, as well as other pathogens, was demonstrated by *Bacillus* spp. Isolated from the saline soils of Goa. This made it possible to recommend them as a natural fungicide alternative to synthetic fungicides used in mushroom cultivation [103].

Thus, a new line of research based on the use of microorganisms that promote fungal growth, supplementing the natural microbiota, covering nutritional deficiencies and performing a protective function, is considered as a useful guide for assessing the needs of mushrooms and for the development of new formulas for commercial supplements [91].

Conclusion

In conclusion, it should be noted that the benefits of growing higher fungi are not limited to the nutritional and biological value of their fruit bodies. The substrate permeated with mycelium, remaining after their cultivation, is a biomass that exceeds the production of fungi by weight not less than 5 times [52], enriched with proteins, which are dominated by essential amino acids - leucine, threonine and lysine, which makes it possible to use it as a feed additive [56, 104-108]. For Kazakhstan, it can be of particular value, since there is a shortage of fodder protein in the republic's animal husbandry, with only 20% of the provision with compound fodders [109]. Currently, from 80% to 85% of all food and medicinal mushroom products are obtained from fruit bodies, and only 15% of them are based on mycelium extracts. Meanwhile, the use of mycelium extract as a food bio-ingredient may represent an innovative strategy to prevent and/or reduce the negative consequences of microbial spoilage of food and be of great importance for the food and pharmaceutical industries [110].

The substrate can also be used as a solid fertilizer in crop production [111]. Spent mushroom compost is a waste that can be recycled as a substrate to support a new commercially viable crop cycle with the addition of the necessary additives [91, 112]. In

addition, it can be used for the production of packaging and construction materials, biofuels and enzymes [113]. The presence in some basidiomycetes of a wide spectrum of antimicrobial activity against opportunistic and pathogenic microorganisms, which are dangerous contaminants of food, made it possible to propose their use as a basis for a polymer coating with antimicrobial properties to protect food from spoilage. The high hydrolytic activity of fungi also makes it possible to use them for the biodegradation of organic pollutants, xenobiotics, and industrial pollutants [114].

The biotechnological potential for the production of mushrooms has great prospects. Progress in this direction should be expected from the development of methods for controlling the biosynthesis of secondary metabolites by fungi that exhibit the highest biological activity. In artificial cultivation, which differs from existence in natural conditions, in the absence of natural competition between the pool of detected metabolites and the capabilities of the genome, there is a large gap, which is explained by the presence of "silent" genes [115-116]. The contribution of plant and animal microbiomes to the "extended phenotype" of their hosts is well studied, while research on fungal microbiomes has just begun. It has already been shown that the amount of bioactive metabolites of fungi obtained from a cultivated fungus grown by an artificial method is much less than the amount obtained from wild fruit bodies [117]. Wild mushrooms are also considered to be a more promising source of β -glucan used in the food industry and for medicinal purposes [118]. This testifies in favor of co-cultivation of fungi with other organisms, in particular, with bacteria, which will not only reveal the mechanisms of interspecies relationships, but also provide an opportunity for controlled biosynthesis of the desired secondary metabolites and enzymes of macrofungi [116, 119-121].

A co-cultivation strategy that mimics the symbiotic relationship of organisms in their natural habitat is a very effective approach to identifying and using a powerful resource for obtaining secondary fungal metabolites (low molecular weight, polysaccharides, polypeptides) exhibiting antimicrobial, antitumor, and antioxidant activity, which is so necessary at present.

Funding

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

References:

- 1 Budaeva V.V., Makarova E.I., Skiba E.A., Sakovich G.V. Fermentativnyj gidroliz produktov gidrotermobaricheskoy obrabotki miskantusa i plodovyh obolochek ovsa. Kataliz v promyshlennosti. 2013. Vol.3. P. 60-66.
- 2 Ali N., Zhang Q., Liu Z.Y., Li F.L., Lu M., Fang X.C. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products. Appl Microbiol Biotechnol. 2020. Vol. 104(2). P. 455-473.
- 3 Sánchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnology Advances. 2009. Vol. 27, Issue 2. P. 185-194.
- 4 Dimitrijevic M.V., Mitic V.D., Jovanovic O.P., Stankov Jovanovic V.P., Nikolic J.S., Petrovic G.M., Stojanovic G.S. Comparative study of fatty acids profile in eleven wild mushrooms of boletacea and russulaceae families. Chemistry & Biodiversity. 2018. Vol. 15(1). Art. ID e1700434. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700434>
- 5 Rathore H., Prasad S., Sharma S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. PharmaNutrition. 2017. Vol. 5(2). P. 35-46.

6 Wang X.M., Zhang J., Wu L.H., Zhao Y.L., Li T., Li J.Q., Wang Y.Z., Liu H.G. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. *Food Chemistry*. 2014. Vol. 151. P. 279– 285.

7 Rathore H., Prasad S., Kapri M., Tiwari A., Sharma S. Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications. *Journal of Functional Foods*. 2019. Vol. 56. P. 182– 193.

8 Cheung P.C.K. Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*. 2013. Vol. 2, Issues 3–4. P. 162-166.

9 Bach F., Zielinski A.A.F., Helm C.V., Maciel G.M., Pedro A.C., Stafussa A.P., Avila S., Haminiuk C.W.I. Bio compounds of edible mushrooms: In vitro antioxidant and antimicrobial activities. *LWT*. 2019. Vol. 107. P. 214– 220.

10 Wasser S.P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011. Vol. 89(5). P. 1323–1332.

11 Xiang Q., Luo L., Liang Y., Chen Q., Zhang X., Gu Y. The Diversity, growth promoting abilities and anti-microbial activities of bacteria isolated from the fruiting body of *Agaricus bisporus*. / Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists. 2017. Vol. 66(2). P. 201-207.

12 Chang S.T., Wasser S.P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2012. Vol. 14(2). P. 95-134.

13 Bellettini M.B., Fiorda F.A., Maieyes H.A., Teixeira G.L., Avila S., Hornung P.S., Maccari Júnior A., Ribani R.H. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2019. Vol. 26(4). P. 633– 646.

14 Kabel M.A., Jurak E., Mäkelä M.R., de Vries R.P. Occurrence and function of enzymes for lignocellulose degradation in commercial *Agaricus bisporus* cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017. Vol. 101(11). P. 4363– 4369.

15 Govorushko S., Rezaee R., Dumanov J., Tsatsakis A. Poisoning associated with the use of mushrooms: A review of the global pattern and main characteristic. *Food and Chemical Toxicology*. 2019. Vol. 128. P. 267-279.

16 Friedman M. Mushroom polysaccharides: Chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. *Foods*. 2016. Vol. 5(4). Art. ID 80. <https://doi.org/10.3390/foods5040080>

17 Vasser C.P. Nauka o lekarstvennyh shljapochnyh gribah: sovremennye perspektivy, dostizheniya, dokazatel'stva i vyzovy. *Biosfera*. 2015. №2. Retrieved from URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/nauka-o-lekarstvennyh-shljapochnyh-gribah-sovremennye-perspektivy-dostizheniya-dokazatel'stva-i-vyzovy> (17.09.2021).

18 Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. Vol.60. P. 258-274.

19 Liu Y., Bastiaan-Net S., Wichers H.J. Current understanding of the structure and function of fungal immunomodulatory proteins. *Front Nutr.* 2020. Vol. 7. Art. ID 132. doi: 10.3389/fnut.2020.00132. eCollection 2020.

20 Zhao S., Gao Q., Rong C., Wang S., Zhao Z., Liu Y., Xu J. Immunomodulatory effects of edible and medicinal mushrooms and their bioactive immunoregulatory products. *J Fungi (Basel)*. 2020. Vol. 6(4). Art. ID 269. doi: 10.3390/jof6040269.

21 Wu H., Tao N., Liu X., Li X., Tang J., Ma C., Xu X., Shao H., Hou B., Wang H., Qin Z. Polysaccharide from *Lentinus edodes* inhibits the immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells. *PLoS One*. 2012. Vol.7 (12). P. 51-57.

22 Feofilova E.P. Mycelial fungi as a source for obtaining new medical products with immunomodulating, antitumoral, and wound healing activities. *Immun. Allerg. Infect.* 2004. Vol.1. P. 27-33.

23 Terry A.O., Kola O.J. Anti-leukemic and immunomodulatory effects of fungal metabolites of *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus ostreatus* on benzene-induced leukemia in Wister rats –Korean. *J. Hematol.* 2012. Vol.47 (1). P. 67-73.

24 Patel S., Goyal A. Recent developments in mushrooms as anticancer therapeutics: a review. *Biotech.* 2012. Vol.2 (1). P. 1-15.

25 Filippova E.I., Mazurkova N.A., Kabanov A.S., Tepljakova T.V., Ibragimova Zh.B., Makarevich E.V., Mazurkov O.Ju., Shishkina L.N. Protivovirusnye svoystva vodnyh jekstraktov, vydelennyh iz vysshih bazidiomicetov, v otnoshenii pandemicheskogo virusa grippa A(H1N1)2009. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013. № 2. Retrieved from URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=8920> (23.09.2021).

26 Bender S., Lonergan G.T., Backhaus J., Cross R.F., Dumitrach-Anghel C.N., Baker W.L. The antibiotic activity of the edible and medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Int. J. Med. Mushr.* 2001. Vol.3 (1-2). P.118.

27 Aramabašić Jovanović J., Mihailović M., Uskoković A., Grdović N., Dinić S., Vidaković M. The effects of major mushroom bioactive compounds on mechanisms that control blood glucose level. *J Fungi (Basel)*. 2021. Vol. 7(1). Art. ID 58. doi: 10.3390/jof7010058

28 Özyürek M., Bener M., Güglü K., Apak R. Antioxidant/antiradical properties of microwave-assisted extracts of three wild edible mushrooms. *Food Chem.* 2014. Vol.157. P. 323-331.

29 Lou H., Guo X., Zhang X., Guo L. Optimization of cultivation conditions of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (*Agaricomycetes*) for the highest antioxidant activity and antioxidant content. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2019. Vol. 21(4). P. 353-366.

30 Feeney M.J., Dwyer J., Hasler-Lewis C.M., Milner J.A., Noakes M., Rowe S., Wach M., Beelman R.B., Caldwell J., Cantorna M.T., Castlebury L.A., Chang S.T., Cheskin L.J., Clemens R., Drescher G., Fulgoni III V.L., Haytowitz D.B., Hubbard V.S., Law D., Miller A.M., Minor B., Percival S.S., Riscuta G., Schneeman B., Thornsbury S., Toner C.D., Woteki C.E., Wu D. Mushrooms and Health Summit Proceedings. *J Nutr.* 2014. Vol. 144(7). P. 1128S–1136S.

31 Phan C.W., David P., Naidu M., Wong K.H., Sabaratnam V. Therapeutic potential of culinary-medicinal mushrooms for the management of neurodegenerative diseases: diversity, metabolite, and mechanism. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2015. Vol.35 (3). P. 355-368.

32 Yadav S.K., Ir R., Jeewon R., Doble M., Hyde K.D., Kaliappan I., Jeyaraman R., Reddi R.N., Krishnan J., Li M., Durairajan S.S.K. A Mechanistic review on medicinal mushrooms-derived bioactive compounds: potential mycotherapy candidates for alleviating neurological disorders. *Planta Med.* 2020. Vol. 86(16). P. 1161-1175.

33 Dai R., Liu M., Nabil W.N.N., Xi Z., Xu H. Mycomedicine: A unique class of natural products with potent anti-tumour bioactivities. *Review Molecules*. 2021. Vol. 26(4). Art. ID 1113. doi: 10.3390/molecules26041113.

34 Wasser S.P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed J.* 2014. Vol. 37(6). P. 345-356.

35 Zhang M., Zhang Y., Zhang L., Tian Q. Mushroom polysaccharide lentinan for treating different types of cancers: A review of 12 years clinical studies in China.

Progress in Molecular Biology and Translational Science/ L. Zhang (Ed.). Cambridge, MA: Academic Press, 2019. Vol. 163. P. 297– 328.

36 Liu K., Wang J., Zhao L., Wang Q. Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava*. Food and Chemical Toxicology. 2013. Vol. 58. P. 375-380.

37 A. Krakowska, P. Zięba, A. Włodarczyk, K. Kała, K. Sułkowska-Ziaja, E. Bernaś, A. Sękara, B. Ostachowicz, B. Muszyńska. Selected edible medicinal mushrooms from *Pleurotus* genus as an answer for human civilization diseases. Food Chem. 2020. Vol. 327. Art. ID 127084. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127084.

38 Jeitler M., Michalsen A., Frings D., Hübner M., Fischer M., Koppold-Liebscher D.A., Murthy V., Kessler C.S. Significance of medicinal mushrooms in integrative oncology: A narrative review. Front Pharmacol. 2020. Vol. 11. Art. ID 580656. doi: 10.3389/fphar.2020.580656.

39 Mu H., Zhang A., Zhang W., Cui G., Wang S., Duan J. Antioxidative properties of crude polysaccharides from *Inonotus obliquus*. Int. J. Mol. Sci. 2012. Vol.13 (7). P. 9194-9206.

40 Tepljakova T.V., Kosogova T.A., Anan'ko G.G., Bardasheva A.V., Il'icheva T.N. Protivovirusnaja aktivnost' bazidial'nyh gribov. Problemy medicinskoj mikologii. 2014. T.16 (2). S.15-25.

41 Zhang M., Cui S.W., Cheung P.S.K. and Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Trends in Food Science and Technology. 2007. Vol.18. P. 4-19

42 Ren D., Wang N., Guo J., Yuan L., Yang X. Chemical characterization of *Pleurotus eryngii* polysaccharide and its tumor-inhibitory effects against human hepatoblastoma HepG-2 cells. Carbohydr. Polym. 2016. Vol.138. P. 123-133.

43 Tepljakova T.V., Bulychev L.E., Kosogova T.A., Ibragimova Zh.B., Jurganova I.A., Kabanov A.S., Puchkova L.I., Bormotov N.I., Bardasheva A.V. Protivovirusnaja aktivnost' jekstraktov iz bazidial'nyh gribov v otnoshenii ortopoksvirusov. Problemy osobo opasnyh infekcij. 2012. Vyp. 3 (113). S. 99-101.

44 Adotey G., Quarcoo A., Holliday J.C., et al. Effect of immunomodulating and antiviral agent of medicinal mushrooms (immune assist 24/7) on CD4+ T-lymphocyte counts of HIV-infected patients. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2011. Vol. 13, № 2. P. 109-113.

45 Ren L., Perera C., Hemar Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. Food and function. 2012. Vol. 3. P. 1118-1130.

46 Technical Report. The Use of Mushroom-Derived Dietary Supplements as Immunomodulating agents: An Overview of Evidence-Based Clinical Trials and the Mechanisms and Actions of Mushroom Constituents. Point Institute, Stevens Point, Wisconsin. 2013. 16 p.

47 Rahi D.K., Malik D. Diversity of mushrooms and their metabolites of nutraceutical and therapeutic significance. Journal of Mycology. 2016. Vol. 2016. Article ID 7654123. <https://doi.org/10.1155/2016/7654123>

48 Li Q.Z., Zheng Y.Z., Zhou X.W. Fungal immunomodulatory proteins: characteristic, potential antitumor activities and their molecular mechanisms. Drug Discov Today. 2019. Vol. 24(1). P. 307-314.

49 Babickaja V.G. Biologicheskij aktivnaja dobavka k pishhe / V.G. Babickaja, A.G. Lobanok, L.V. Plenina. Uspehi medicinskoj mikologii, 2015. 359 s.

50 Prirodnaja farmakologija: griby protiv virusov. Nauka iz pervyh ruk. 29.04.2020. Retrieved from URL: <https://scfh.ru/news/prirodnaya-farmakologiya-griby-protiv-virusov/> (02.09.2021)

51 Chang S.T., Wasser S.P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *Int J Med Mushrooms*. 2012. Vol. 14(2). P. 95-134.

52 Raman J., Jang K.Y., Oh Y.L., Oh M., Im J.H., Lakshmanan H., Sabaratnam V. Cultivation and nutritional value of prominent *Pleurotus* spp.: An Overview. *Mycobiology*. 2020. Vol. 49(1). P. 1-14.

53 Chang S., Wasser S. The cultivation and environmental impact of mushrooms. *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*. Retrieved from URL: <https://oxfordre.com/environmentalscience/view/10.1093/acrefore/9780199389414.001.0001/acrefore-9780199389414-e-231>. (21.09.2021)

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

55 Alvarez L.V., Bautista A.B. Growth and yield performance of *Pleurotus* on selected lignocellulosic wastes in the vicinity of PUP main campus, Philippines. *Indian Journal of Science and Technology*. 2021. Vol. 14, Issue 3. P. 259-269.

56 Alekseeva K.L. Nauchnye osnovy kul'tivirovaniya i zashhity s#edobnyh gribov ot vreditel'ej i boleznej: diss. ... dokt. s.-h. nauk: 06.01.06. M., 2002. 320 s.

57 Pat. RU2409019C2 Rossijskaja Federacija. Spособ bacilljarnoj termoanajerobnoj podgotovki kachestvennogo solomistogo substrata dlja intensivnogo nesteril'nogo kul'tivirovaniya veshenki obyknovennoj. Annenkov B. G., Azarova V.A. №RU2008128106/21A; zajavl. 09.07.2008; opubl. 20.01.2011, Bjul. №2. 10 s.

58 Kertesz M.A., Thai M. Compost bacteria and fungi that influence growth and development of *Agaricus bisporus* and other commercial mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018. Vol. 102(4). P. 1639-1650.

59 McGee C.F. Microbial ecology of the *Agaricus bisporus* mushroom cropping process. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018. Vol. 102. P. 1075–1083.

60 Vieira F.R., Pecchia J.A. An exploration into the bacterial community under different pasteurization conditions during substrate preparation (Composting-Phase II) for *Agaricus bisporus*. *Cultivation Microb Ecol*. 2018. Vol. 75(2). P. 318-330.

61 Patent EA30400-B1 Method of preparation of substrate for cultivation of oyster mushroom mycelium, involves pre-processing raw materials by solid phase fermentation using cellulolytic bacteria. Sadanov A.K., Saubenova M.G., Kuznetsova T.V., Sulejmenova Zh.B.; Appl. 25 Sept. 2014; Publ. 31 Jul 2018.

62 Ramos M., Burgos N., Barnard A., Evans G., Preece J., Graz M., Ruthes A.C., Jiménez-Quero A., Martínez-Abad A., Vilaplana F., Ngoc L.P., Brouwer A., der Burg B., del Carmen Garrigósa M., Jiménez A. *Agaricus bisporus* and its by-products as a source of valuable extracts and bioactive compounds. *Food Chemistry*. 2019. Vol. 292. P. 176-187.

63 Sánchez C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010. Vol. 85. P. 1321–1337

64 Zhang B.B., Guan Y.Y., Hu P.F., Chen L., Xu G.R., Liu L., Cheung P.C.K. Production of bioactive metabolites by submerged fermentation of the medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea*: Recent advances and future development. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2019. Vol. 39(4). P. 541– 554.

65 Koutrotsios G., Zervakis G.I. Comparative examination of the olive mill wastewater biodegradation process by various wood-rot macrofungi. *BioMed Research International*. 2014. Art. ID 482937. <https://doi.org/10.1155/2014/482937>

66 Tarnopol'skaja V.V., Alaudinova E.V., Mironov P.V. Perspektivy ispol'zovaniya bazidial'nyh gribov dlja poluchenija kormovyh produktov. Hvojnye boreal'noj zony.

2016. №5-6. Retrieved from URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/perspektivy-ispolzovaniya-bazidialnyh-gribov-dlya-polucheniya-kormovyh-produktov> (23.09.2021).

67 Wang L., Mao J., Zhao H., Li M., Wei Q., Zhou Y., Shao H. Comparison of characterization and microbial communities in rice straw- and wheat straw-based compost for *Agaricus bisporus* production. J Ind Microbiol Biotechnol. 2016. Vol. 43(9). P. 1249–1260.

68 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(1). Art. ID 1151. doi: 10.1038/s41598-018-37681-6.

69 Nguyen T.M., Ranamukhaarachchi S.L. Effect of different culture media, grain sources and alternate substrates on the mycelial growth of *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2020. Vol. 23(3). P. 223–230.

70 Kertesz M., Safianowicz K., Bell T. New insights into the microbial communities and biological activities that define mushroom compost. Proceedings of the 19th International Society for Mushroom Science (ISMS) Conference. Baars, J.J.P., Sonnenberg, A.S.M., ISMS, 2016. P. 161–165.

71 Pudółko K. Effect of forced ventilation during composting on *Agaricus bisporus* substrate selectivity. Int Biodeter Biodegr. 2014. Vol. 93. P. 153–161.

72 Zhang X., Zhong Y., Yang S., Zhang W., Xu M., Ma A., Zhuang G., Chen G., Liu W. Diversity and dynamics of the microbial community on decomposing wheat straw during mushroom compost production. Bioresour Technol. 2014. Vol. 170. P. 183–195.

73 Halsey J.A., Silva M.D.C.P., Andreote F.D. Bacterial selection by mycospheres of Atlantic rainforest mushrooms. Antonie Van Leeuwenhoek. 2016. Vol. 109. P. 1353–1365.

74 Noble R., Fermor T.R., Lincoln S., Dobrovin-Pennington A., Evered C., Mead A., Li R. Primordia initiation of mushroom (*Agaricus bisporus*) strains on axenic casing materials. Mycologia. 2003. Vol. 95. P. 620–629.

75 Haq I.U., Zhang M., Yang P., van Elsas J.D. The interactions of bacteria with fungi in soil: emerging concepts. Adv Appl Microbiol. 2014. Vol. 89. P. 185–215.

76 Zhang M.Z., Pereira e Silva M. de C., De Mares M.C., van Elsas J.D. The mycosphere constitutes an arena for horizontal gene transfer with strong evolutionary implications for bacterial-fungal interactions. FEMS Microbiol Ecol. 2014. Vol. 89(3). P. 516–526.

77 Partida-Martinez L.P., Monajembashi S., Greulich K.O., Hertweck C. Endosymbiont-dependent host reproduction maintains bacterial-fungal mutualism. Curr Biol. 2007. Vol. 17(9). P. 773–777.

78 Espino-Vázquez A.N., Bermúdez-Barrientos J.R., Cabrera-Rangel J.F., Córdova-López G., Cardoso-Martínez F., Martínez-Vázquez A., Camarena-Pozos D.A., Mondo S.J., Pawlowska T.E., Abreu-Goodger C., Partida-Martínez L.P. Narnaviruses: Novel players in fungal-bacterial symbioses. The ISME Journal. 2020. Vol. 14. P. 1743–1754.

79 Sbrana C., Agnolucci M., Bedini S., Lepera A., Toffanin A., Giovannetti M., Nuti M.P. Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth. FEMS Microbiol Lett. 2002. Vol. 211. P. 195–201.

80 Pion M., Spangenberg J.E., Simon A., Bindschedler S., Flury C., Chatelain A., Bshary R., Job D., Junier P. Bacterial farming by the fungus *Morchella crassipes*. Proc R

Soc Lond B Biol Sci. 2013. Vol. 280(1773). Art. ID 20132242. doi: 10.1098/rspb.2013.2242

81 Antunes L.P., Martins L.F., Pereira R.V., Thomas A.M., Barbosa D., Lemos L.N., G.M. Machado Silva, L.M. Silva Moura, G.W. Condomitti Epamino, L.A. Digiampietri, K.C. Lombardi, P.L. Ramos, R.B. Quaggio, J.C.F. de Oliveira, R.C. Pascon, J.B. da Cruz, A.M. da Silva, J.C. Setubal. Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics. Sci Rep. 2016. Vol. 6. Art. ID 38915. <https://doi.org/10.1038/srep38915>

82 Vos A.M., Heijboer A., Boschker H.T.S., Bonnet B., Lugones L.G., Wösten H.A.B. Microbial bio- mass in compost during colonization of *Agaricus bisporus*. AMB Express. 2017. Vol. 7. Art. ID 12. doi: 10.1186/s13568-016-0304-y

83 Pandin C., Le Coq D., Deschamps J., Védie R., Rousseau T., Aymerich S., Briandet R. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* QST713: a biocontrol agent that protects *Agaricus bisporus* crops against the green mould disease. J Biotechnol. 2018. Vol. 278. P. 10–19.

84 Pandin C., Védie R., Rousseau T., Le Coq D., Aymerich S., Briandet R. Dynamics of compost microbiota during the cultivation of *Agaricus bisporus* in the presence of *Bacillus velezensis* QST713 as biocontrol agent against *Trichoderma aggressivum*. Biol Control. 2018. Vol. 127. P. 39–54.

85 Warmink J.A., Van Elsas J.D. Migratory response of soil bacteria to *Lyophyllum* sp. strain Karsten in soil micro-cosms. Appl Environ Microbiol. 2009. Vol. 75. P. 2820–2830.

86 Frey-Klett P., Burlinson P., Deveau A., Barret M., Tarkka M., Sarniguet A. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. Microbiol Mol Biol Rev. 2011. Vol. 75. P. 583–609.

87 Gea F.J., Navarro M.J. Mushroom diseases and control. In: Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications. Cunha D., Pardo-Gimenez A. (eds). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2017. P. 239–259.

88 Kim M.K., Math R.K., Cho K.M., Shin K.J., Kim J.O., Ryu J.S., Y.H. Lee, H.D. Yun. Effect of *Pseudomonas* sp. P7014 on the growth of edible mushroom *Pleurotus eryngii* in bottle culture for commercial production. Bioresour Technol. 2008. Vol. 99. P. 3306–3308.

89 Zagryadskaya Y.A., Lysak L.B., Chernov I.Y. Bacterial communities in the fruit bodies of ground basidiomycetes. Eurasian Soil Sci. 2015. Vol. 48. P. 620–626.

90 Kaneko M, Tanimoto E. Auxin-regulation of hyphal elongation and spore germination in arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. International Symposium “Root Research and Applications” Root RAP, 2009 September 2–4; Boku, Vienna, Austria. 2 p.

91 Carrasco J., Zied D.C., Pardo J.E., Preston G.M., Pardo-Giménez A. Supplementation in mushroom crops and its impact on yield and quality. AMB Exp. 2018. Vol. 8. P. 146–154.

92 Loshhinina E.A. Vliyanie vneshnih faktorov bakterial'noj, indol'noj i selenorganicheskoy prirody na rost i razvitie ksilotrofnogo bazidiomiceta *Lentinus edodes*: diss. ... kand. biol. nauk: 03.02.03. Saratov 2011. 169 s.

93 Pratiksha K., Narute T.K., Surabhi S., Ganesh A., Sujoy S. Effect of liquid biofertilizers on the yield of button mushroom. J Mycopathol Res. 2017. Vol. 55. P. 135–141.

94 Chen S., Qiu C., Huang T., Zhou W., Qi Y., Gao Y., Shen J., Qiu L. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing bacteria on the hyphal

growth and primordium initiation of *Agaricus bisporus*. Fungal Ecol. 2013. Vol. 6. P. 110–118.

95 Colauro N.B., Fermor T.R., Eira A.F., Linde G.A. *Pseudomonas putida* stimulates primordia on *Agaricus bitorquis*. Curr Microbiol. 2016. Vol. 72(4). P. 482–488.

96 Zarenejad F., Yakhchali B., Rasooli I. Evaluation of indigenous potent mushroom growth promoting bacteria (MGPB) on *Agaricus bisporus* production. World J Microbiol Biotechnol. 2012. Vol. 28. P. 99–104.

97 Cho Y.S., Kim J.S., Crowley D.E., Cho B.G. Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. FEMS Microbiol Lett. 2003. Vol. 218. P. 271–276.

98 Siyoum N.A., Surridge K., Korsten L. Bacterial profiling of casing materials for white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) using denaturing gradient gel electrophoresis. Sth Afr J Sci. 2010. Vol. 106(9/10). P. 49–54.

99 Ma Y.J., Zheng L.P., Wang J.W. Bacteria associated with *Shiraia* fruiting bodies influence fungal production of hypocrellin A. Front Microbiol. 2019. Vol. 10. Art ID 2023. doi: 10.3389/fmicb.2019.02023

100 Ebadi A., Alikhani H.A., Rashtbari M. Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) on the morpho physiological properties of button mushroom *Agaricus bisporus* in two different culturing beds. Int Res J Basic Appl Sci. 2012. Vol. 3. P. 203–212.

101 Potočnik I., Rekanović E., Todorović B., Luković J., Paunović D., Stanojević O., Milijašević-Marčić S. The effects of casing soil treatment with *Bacillus subtilis* Ch-13 biofungicide on green mould control and mushroom yield. Pestic Phytomed (Belgrade). 2019. Vol. 34. P. 53–60.

102 Velázquez-Cedeño M., Farnet A.M., Mata G., Savoie J.M. Role of *Bacillus* spp. in antagonism between *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzianum* in heat-treated wheat-straw substrates. Bioresource Technology. 2008. Vol. 99(15). P. 6966–6973

103 Fernandes M.S., Kerkar S. Halotolerant *Bacillus* sp. as a source of antifungal agents against major mushroom pathogens. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2019. Vol. 8, No. 5. P. 1125–1129.

104 Rubcov A.A. Usovershenstvovanie jelementov tehnologii prigotovlenija substrata dlja vyrashhivaniya veshenki: diss. ... kand. s-h. nauk: 06.01.06. M., 2007. 157 s.

105 Romanenko E.S., Sharipova O.V., V Muradjan V.R. Polovinkina V. Pererabotka solomistyh othodov proizvodstva griba veshenki. Mezhdunarodnyj zhurnal jeksperimental'nogo obrazovaniya. 2010. T. 8. S. 131–132.

106 Zhilinskaja N.V. Protivomikrobnnye svojstva bazidiomicetov Fomitopsis officinalis (VILL.: FR.) BOND. ET SING., Fomitopsis pinicola (SW.: FR.) P. KARST. I Trametes versicolor (L.: FR.) LLOYD: ocenka perspektiv ispol'zovaniya v tehnologii pishhevyh produktov: diss. ... kand. biol. nauk. M., 2015. 194 s.

107 Alabid I., Glaeser S.P., Kogel K.H. Endofungal bacteria increase fitness of their host fungi and impact their association with crop plants. Curr Issues Mol Biol. 2019. Vol. 30. P. 59–74.

108 Economou C.N., Philippoussis A.N., Diamantopoulou P.A. Spent mushroom substrate for a second cultivation cycle of *Pleurotus mushrooms* and dephenolization of agro-industrial wastewaters. FEMS Microbiol Lett. 2020. Vol. 367(8). Art. ID fnaa060. doi: 10.1093/femsle/fnaa060.

109 Alimkulov Zh.S., Zhumalieva G.E., Saparova U.Zh., Shaulieva K.T. Ispol'zovanie othodov pererabotki maslichnyh kul'tur pri kormlenii sel'skohozhajstvennyh

zhivotnyh. «Agrarij Kazahstana» Kazahstanskaja sel'skohozjajstvennaja gazeta. Retrieved from URL: <http://abkaz.kz/ispolzovanie-otxodov-pererabotki-maslichnyx-kultur-pri-kormlenii-selskoxozjajstvennyx-zhivotnyx/> (23.09.2021)

110 Llauro G., Morris H.J., Ferrera L., Camacho M., Castán L., Lebeque Y., Beltrán Y., Cos P., Bermúdez R.C. In-vitro antimicrobial activity and complement/macrophage stimulating effects of a hot-water extract from mycelium of the oyster mushroom *Pleurotus* sp. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2015. Vol. 30. P. 177-183

111 Shahsevanimudzhara L.A., Gasymov Sh.N., Attargusejni M.Ju., Muradov P.Z., Alieva V.D. Gribnye biotekhnologii v medicine i promyshlennosti. Immunopatologija, allergologija, infektologija. 2010. T.1. S. 274.

112 Zied D.C., Sánchez J.E., Noble R., Pardo-Giménez A. Use of spent mushroom substrate in new mushroom crops to promote the transition towards a circular economy. Agronomy. 2020. Vol. 10(9). Art. ID 1239; <https://doi.org/10.3390/agronomy10091239>

113 Grimm D., Wösten H.A.B. Mushroom cultivation in the circular economy. Appl Microbiol Biotechnol. 2018. Vol. 102(18). P. 7795-7803.

114 Cohen R., Persky L., Hadar Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Appl Microbiol Biotechnol. 2002. Vol. 58(5). P. 582-594.

115 Moody S.C. Microbial co-culture: harnessing intermicrobial signaling for the production of novel antimicrobials. Future Microbiol. 2014. Vol. 9(5). P. 575-578.

116 Shen X.T., Mo X.H., Zhu L.P., Tan L.L., Du F.Y., Wang Q.W., Zhou Y.M., Yuan X.J., Qiao B., Yang S. Unusual and highly bioactive sesterterpenes synthesized by *Pleurotus ostreatus* during coculture with *Trametes robiniophila*. Murr Appl Environ Microbiol. 2019. Vol. 85(14). Art. ID e00293-19. doi: 10.1128/AEM.00293-19.

117 Zhang B.B., Guan Y.Y., Hu P.F., Chen L., Xu G.R., Liu L., Cheung P.C.K. Production of bioactive metabolites by submerged fermentation of the medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea*: recent advances and future development. Review Crit Rev Biotechnol. 2019. Vol. 39(4). P. 541-554.

118 Mirończuk-Chodakowska I., Witkowska A.M. Evaluation of Polish wild mushrooms as beta-glucan sources. Int J Environ Res Public Health. 2020. Vol. 17(19). Art. ID 7299. doi: 10.3390/ijerph17197299.

119 Essig A., Hofmann D., Münch D., Gayathri S., Kunzler M., Kallio P.T., Sahl H.G., Wider G., Schneider T., Aebi M. Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis. Journal of Biological Chemistry. 2014. Vol. 289(50). P. 34953–34964.

120 Kumar A., Arora S., Jain K.K., Sharma K.K. Metabolic coupling in the co-cultured fungal-yeast suite of *Trametes ljubarskyi* and *Rhodotorula mucilaginosa* leads to hypersecretion of laccase isozymes. Fungal Biology. 2019. Vol. 123(12). P. 913-926.

121 Yu G., Sun Y., Han H., Yan X., Wang Y., Ge X., Qiao B., Tan L. Coculture, an efficient biotechnology for mining the biosynthesis potential of macrofungi via interspecies interactions. Front. Microbiol. 2021. Vol. 12. Art. ID 663924. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663924>

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МРНТИ: 34.15.23; 68.39.29

А.Т. ДАУГАЛИЕВА¹, С.Т. ДАУГАЛИЕВА², Б.С. АРЫНГАЗИЕВ¹, Т.А.
ЛАВРЕНТЬЕВА¹

¹ТОО «Казахский научно-исследовательский институт животноводства и
кормопроизводства», г. Алматы.

²ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г.
Алматы.

**ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОМА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПОРОДЫ АБЕРДИН-АНГУС**
doi: 10.53729/MV-AS.2021.03.02

Аннотация

Целью исследования было определение таксономической структуры микробиома кишечника крупного рогатого скота породы Абердин-Ангус с помощью технологии секвенирования нового поколения. 16S метагеномный анализ, позволил определить микробный состав содержимого кишечника, минуя стадию культивирования на питательных средах. Проведена генетическая идентификация и получен таксономический профиль всех присутствующих бактерий, в том числе и некультивируемых форм.

Ключевые слова: микробиом, крупный рогатый скот, Абердин-Ангус, секвенирование нового поколения.

Изучение микроорганизмов на молекулярном уровне открыло перед учеными новые возможности изучения микрофлоры органов и тканей животного. На смену устаревшему термину «микрофлора» приходит более широкое понятие под названием «микробиом». Микробиом представляет собой сообщество бактерий, которое каждый организм имеет внутри и снаружи своего тела. Для каждого индивида он является уникальным и содержит в десятки раз больше клеток и генов, чем собственных генов организма. Микробиом регулирует многие жизненно важные процессы организма. Его изучение необходимо для детального понимания процессов, происходящих между микроорганизмами, населяющими определенный орган, и их взаимосвязью с клетками организма.

Традиционно микробная популяция изучалась посредством техники культивирования, проведения физиологических и биохимических тестов. Данные методы трудоемки, занимают много времени, требуют предварительных знаний о микроорганизмах для их выделения из сообщества, не так точны, как идентификация генотипическими методами и кроме того, не позволяют полностью идентифицировать все микроорганизмы из-за присутствия так называемых «некультивируемых форм».

Всестороннее изучение состава микробиома отдельных органов и тканей организмов стало возможно с появлением NGS-секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing). Исследование по этой методике проводится без

стадии культивирования, то есть, из образца напрямую выделяется вся геномная ДНК, которая и подвергается секвенированию. В отличие от классического секвенирования по Сенгеру NGS-платформы позволяют прочитывать миллионы небольших фрагментов ДНК параллельно с двух сторон, в результате чего получается огромное количество данных. За один запуск секвенаторов нового поколения можно определить от нескольких десятков тысяч до нескольких миллиардов нуклеотидов в зависимости от поставленных задач.

К сожалению, использование данной технологии на животных еще недостаточно распространено из-за стоимости анализа и недоступности технологии. Несмотря на это, в последние годы в мировой науке активно изучается микробиом продуктивных животных. Жвачные животные, включая крупный и мелкий рогатый скот, составляют важный источник пищевых продуктов для человека. Они являются хозяевами сложного кишечного микробиома (включающего бактерии, археи, простейшие и грибы), который в свою очередь, обеспечивает выработку различных ферментов, необходимых для расщепления растительных волокон на летучие жирные кислоты и микробный сырой белок. Состав микробного сообщества, участвующий в микробном метаболизме рубца, представляет большой интерес для кормления животных [1].

Желудочно-кишечный тракт жвачных имеет широкий диапазон микроорганизмов, что затрудняет воспроизведение условий для их оптимального роста. Большая часть микробов не культивируется *in vitro* и не может быть выращена на лабораторных питательных средах. Выращивание анаэробов довольно сложно из-за необходимости исключения кислорода, медленного роста микробов и сложности других требований к росту [2,3,4].

Материалы и методы

Образцы фекалий отбирали из прямой кишки от трех голов крупного рогатого скота Абердин-Ангусской породы седьмого поколения Алматинской области. Пробы немедленно замораживали в сухом льду и хранили при -80 °С в морозильной камере до выделения ДНК.

Микробную ДНК из фекалий экстрагировали с помощью набора для кала QIAamp DNA (Qiagen, Валенсия, Калифорния). Затем измеряли концентрацию ДНК с помощью флуориметра Qubit® 2.0 [5]. Гипервариабельные области V3-V4 гена 16S rRNA амплифицировали с помощью ПЦР из 20 нг тотальной очищенной ДНК адаптивными олигонуклеотидами Illumina, совместимыми с платформой. Последовательности праймеров были следующими: 341/357F, CCTACGGGNGGCWGCAG и 805/785R: GACTACHVGGGTATCTAATCC [6]. Концентрацию и размер ДНК определяли с использованием BioAnalyzer 2100 (Agilent, Пало-Альто, Калифорния). Ампликоны очищали набором Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Genomics, Данверс, Массачусетс). Библиотеки готовили в несколько этапов: получение ПЦР-продукта с универсальными праймерами, оценка его качества и количества, очистка, присоединение индексов Illumina в ПЦР шаге, очистка, оценка качества и количества продукта с индексами, нормализация, объединение, денатурация библиотек. Пул библиотек секвенировали в секвенаторе Illumina MiSeq с помощью набора реагентов Illumina MiSeq, согласно протоколу производителя. Вторичный анализ или обработка данных была проведена с помощью программного обеспечения MiSeq Reporter software (MSR). Таксономическая идентификация микроорганизмов проводилась путем анализа V3 и V4 регионов 16S rRNA гена бактерий в Международной базе данных Greengenes database (<http://greengenes.lbl.gov/>).

Результаты и обсуждение

Идентификация присутствующих в пробе бактерий проводилась по следующим таксономическим уровням: царство, филум, класс, порядок, семейство, род и вид.

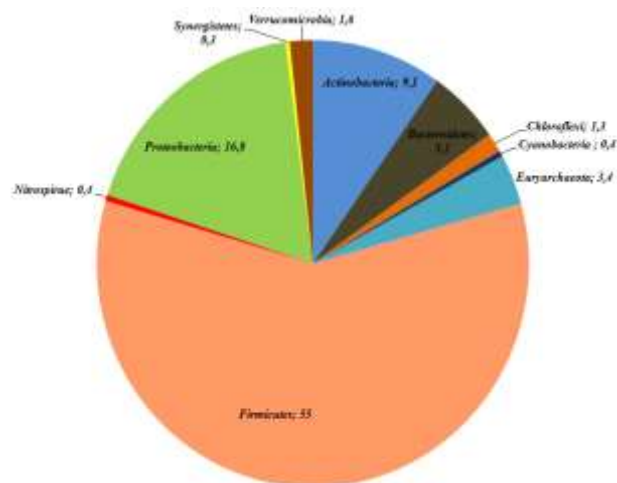


Рисунок 1 - Сравнение относительной численности (% от общего количества) основных бактериальных типов, обнаруженных в микробиоме кишечника крупного рогатого скота

Как показано на рисунке 1, большинство оперативно таксономических единиц (OTU) в фекалиях скота породы Абердин-Ангус были отнесены к типам: *Firmicutes* (55%), *Proteobacteria* (16,8%), *Actinobacteria* (9,1%), *Bacteroidetes* и *Euryarchaeota* (5,1%), *Verrucomicrobia* (1,6%), *Cyanobacteria* (0,4%), *Synergistetes* (0,3%). Были взяты средние результаты по всем животным. К типу *Firmicutes*, относились следующие семейства: *Clostridiaceae* (19,7%), *Lachnospiraceae* (7,1%), *Veillonellaceae* (0,5%), *Ruminococcaceae* (3,4%), *Peptostreptococcaceae* (2,1%), и *Turicibacteraceae* (0,4%). Среди типа *Bacteroidetes* присутствовало семейство *Bacteroidaceae* (0,9%).

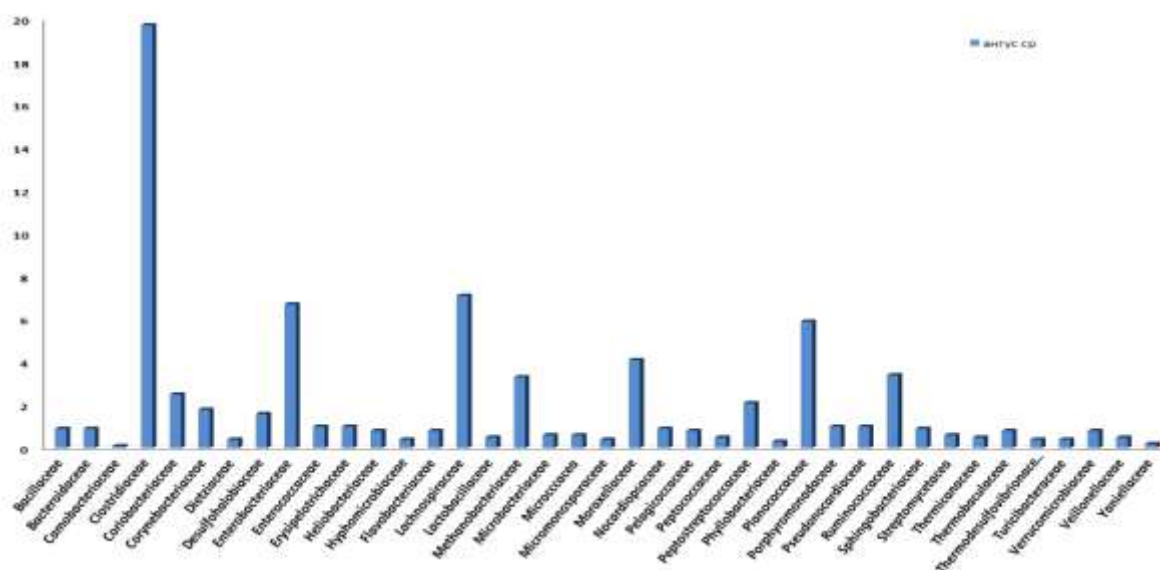


Рисунок 2 - Микробный профиль бактериального сообщества кишечника на уровне семейства

Из рисунка 2 видно, что на уровне бактериальных семейств у коров породы Абердин-Ангус преобладали семейства *Enterobacteriaceae* (6,7%), *Planococcaceae* (5,9%), *Moraxellaceae* (4,1%), *Methanobacteriaceae* (3,3%), *Coriobacteriaceae* (2,5%), *Corynebacteriaceae* (1,8%), *Porphyromonadaceae* и *Erysipelotrichaceae* (1%), *Peptococcaceae* (0,5%).

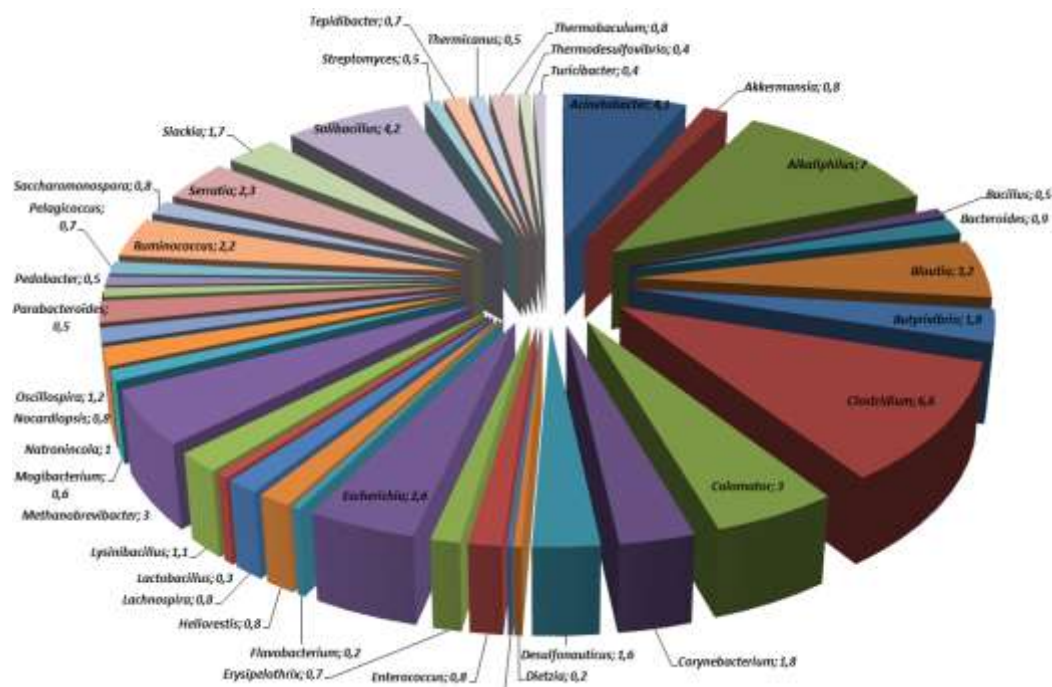


Рисунок 3 - Микробный профиль бактериального сообщества кишечника на уровне рода

Как показано на рисунке 3, роды: *Alkaliphilus* (7,0%), *Clostridium* (6,6%), *Acinetobacter* (4,1%), *Solibacillus* (4,2%), *Blautia* (3,2%), *Colomator* и *Methanobrevibacter* (3,0%), *Coriobacteriaceae* (2,5%), *Serratia* (2,3%), *Ruminococcus* (2,2%), *Escherichia* (2,6%), *Butyrivibrio* и *Corynebacterium* (1,8%), *Oscillospira* (1,2%), *Akkermansia* и *Enterococcus* (0,8%), *Mogibacterium* (0,6%), *Bacillus* (0,5%), *Lactobacillus* (0,3%) были таксонами бактерий прямой кишки.

По литературным источникам, относительная численность представителей типа *Bacteroidetes* (5,1%) в микробном сообществе пищеварительного тракта снижается, когда КРС скармливают большим количеством зерна, что позволяет типу *Firmicutes* (55,0%) и другим условно-патогенным типам, таким как *Proteobacteria* (16,8%), размножаться быстрее в единицу времени, что приводит к увеличению доли *Firmicutes* и *Proteobacteria* [7,9]. Однако исследования других авторов [10] были противоположными, что подтверждает наши исследования, так как животных в данном хозяйстве скармливали фуражной диетой (силос, сенаж), без добавления концентрированных кормов. Также увеличение относительной численности таксонов *Firmicutes* наблюдается в группе животных с повышенной эффективностью кормления [21].

Относительно *Bacteroidetes* известно, что данный тип является первичным деструктором сложных полисахаридов в клеточной стенке растений. Поскольку скот полагается на эти ферменты для эффективного разложения и переваривания клетчатки, увеличение количества соотношения *Firmicutes* к *Bacteroidetes* в

пищеварение нежелательно [7,9]. Типы *Proteobacteria* и *Cyanobacteria* (0,4%) способствуют высоким показателям прироста массы тела животного [8]. Однако чрезмерное количество представителей типа *Proteobacteria* способствует воспалению кишечника [24]. В частности, Мао и др. [11] и Li и др. сообщили [12], что значительное увеличение кормления зерном увеличивало численность *Proteobacteria*, тогда как Khafipour и др. [13] и Plaizier и др. [14] не наблюдали этого эффекта. Тип *Euryarchaeota* (5,1%) является наиболее преобладающим типом архей, которые вырабатывают метан [23].

Отряд *Bacteroidales* (2,5%), (тип *Bacteroidetes*), который включает виды, кодирующие широкий спектр способностей к разложению полисахаридов растений, а также семейство *Ruminococcaceae* (3,4%) (тип *Firmicutes*) были наиболее многочисленными таксонами у всех животных, получивших фураж [7]. Отряд *Bacteroidales* более многочислен в рационах с высоким содержанием фуража, и это связано с перевариванием клетчатки и биогидрогенизацией жирных кислот в рубце [25]. Семейства *Bacteroidaceae* (0,9%) и *Peptococcaceae* (0,5%) - полезные бактерии из-за их способности синтезировать витамины, помогать пищеварению, стимулировать иммунную функцию и подавлять патогенные микробы [24].

Семейства *Enterobacteriaceae* (6,7%) и *Turicibacteraceae* (0,4%), показали значительно более высокую численность в группе животных, которых кормили зерновыми культурами, тогда как представители *Bacteroidaceae* были значительно выше по численности в группе животных, питающейся травой. *Enterobacteriaceae* включает в себя, наряду со многими безвредными симбионтами, многие известные патогены, в нашем случае, род *Serratia* (2,3%) [15] и род *Escherichia* (2,6%). Виды, относящиеся к роду *Escherichia*, являются обитателями ЖКТ теплокровных животных, но многие из них патогенные. Известно, что *Escherichia*, находясь в кишечнике, тормозят кишечный транзит и двигательную активность кишки [27].

Отряд *Clostridiales* (37,6%), тип *Firmicutes* преобладал у бычков с большим ADG (привес) [8]. Семейства *Clostridiaceae* (19,7%) и *Veillonellaceae* (0,5%), а также род *Clostridium* (6,6%) участвуют в метаболизме желчной кислоты [8,15]. В процессе жизнедеятельности клостридии продуцируют короткоцепочечные жирные кислоты. Семейство *Clostridiaceae* важно для переваривания углеводов и белков. Обилие *Clostridiales* связано со снижением воспаления кишечника из-за повышенной экспрессии IL-10 в толстой кишке [25].

Представители семейства *Ruminococcaceae* (отряд *Clostridiales*) связаны с перевариванием клетчатки, ферментируют крахмал и превращают первичные желчные кислоты во вторичные. Наиболее многочисленное семейство в группе, питающейся травой, возможно потому, что эта группа бактерий зависит от пищевых волокон в качестве источника энергии [15, 25]. *Ruminococcaceae* было больше у бычков с большим ADG. Как и *Lachnospiraceae* (тип *Firmicutes*, отряд *Clostridiales*), повышенные уровни *Ruminococcaceae* указывают на более полную ферментацию и увеличение усвояемых питательных веществ, доступных животному [8].

В семействах *Lachnospiraceae* (7,1%) и *Ruminococcaceae* присутствуют ацетогены. Ацетогены могут служить поглотителем водорода и увеличиваются, если производство метана сокращается [8]. Повышенные уровни *Lachnospiraceae* могут указывать на более активную ферментацию в слепой кишке, что приводит к увеличению количества питательных веществ за счет абсорбируемых ЛЖК (летучих жирных кислот), доступных животному. Многие *Lachnospiraceae*

производят бутират в результате переваривания углеводов, который является питательным веществом для кишечника. Более высокая численность *Lachnospiraceae* в группах животных с высоким уровнем RFI (потребление остаточного корма) может указывать на усиление метаболизма бутирата и, следовательно, на эффективность кормления [8,20]. *Lachnospiraceae* также ферментируют пектин [25].

Преобладание относительной численности семейств *Lachnospiraceae* (7,1%), *Enterobacteriaceae* (6,7%), *Turicibacteraceae* тип *Firmicutes* (0,4%), в отличие от *Ruminococcaceae* (3,4%), *Porphyromonadaceae* (1,0%), *Bacteroidaceae* (0,9%), указывает на то, что животных кормили зерновой диетой [15]. *Lachnospiraceae* были более многочисленными у бычков с наименьшим количеством ADG. Shabat и др. обнаружили, что у дойных коров с наименьшей эффективностью корма (большим RFI) было больше представителей *Lachnospiraceae*. Li и Guan обнаружили, что *Lachnospiraceae* были связаны с выращиванием КРС с большим RFI (менее эффективным); однако эти наблюдения противоположны наблюдениям Myer и др., которые обнаружили, что *Lachnospiraceae* более многочисленны среди бычков с наибольшим ADG [8, 17,18, 19].

Представителей семейства *Erysipelotrichaceae* (1.0%) было больше в слепой кишке бычков с наибольшим ADG и наименьшим ADFI (среднесуточное потребление корма). *Erysipelotrichaceae* связан с метаболизмом липидов и воспалением. Семейство *Coriobacteriaceae* (2.5%) тип *Actinobacteria* (9,1%), модулирует метаболизм липидов у животного. *Coriobacteriaceae* была повышена у бычков с большим ADG [8].

Широко известный род *Lactobacillus* (0,3%), тип *Firmicutes*, отряд *Clostridiales* является производителем молочной кислоты (лактата) из крахмала, наблюдаются его высокие уровни относительной численности у КРС зернового откорма. Молочная кислота не метаболизируется животным, она вместо этого поглощается через стенки рубца, вызывает повышение содержания молочной кислоты и снижение pH в крови, в рубце также происходит накопление ЛЖК, оказывающее пагубное влияние на микробиоту и животное. Эти резкие и внезапные изменения приводят к снижению pH в рубце и увеличению количества видов *Lactobacillus*. Роды *Lactobacillus*, *Clostridium*, делают желчные кислоты доступными для дальнейшей биотрансформации. Роды *Lactobacillus* и *Ruminococcus* (2,2%) были значительно выше в тощей кишке группы животных, получавшей зерно, тогда как *Solibacillus* (4,2%) был значительно выше в группе, получавшей травяное питание [15, 20].

Род *Butyrivibrio* (1.8%) принадлежит к семейству *Lachnospiraceae* [8]. *Butyrivibrio* связан с распадом гемицеллюлозы в рубце и конечным продуктом ферментации является бутират, который является важным источником энергии для эпителиальных клеток кишечника, также как и *Blautia* (3.2%) [8,21]. Члены этого рода часто идентифицировались как связанные с бычками, которых эффективно кормили [21]. *Butyrivibrio* разлагает пектин, фенилаланин, тирозин и триптофан [8,26].

Род *Ruminococcus* - самый многочисленный род типа *Firmicutes*. Кормление зерном в целом ассоциируется с увеличением относительного содержания *Ruminococcus* и сокращения рода *Acinetobacter* (4,1%) [13]. Род *Ruminococcus* играет основную роль в разложении рубцовой целлюлозы (полисахариды) [8,22]. *Ruminococcus* входит в число основных наследуемых бактерий, что соответствует ключевой роли в целлюлолизе [16,21]. Род *Akkermansia* (0,8%) способствуют воспалению [8,24]. Род *Escherichia* (2,6%) продуцирует токсичные соединения

путем ферментации белков [24]. *Escherichia albertii* (2,3%) - наиболее многочисленный вид из обнаруженных, является *eae*-позитивным штаммом *Escherichia coli*, отличающийся от обычной *E.colli* наличием дополнительного *eae* гена [29]. Доля колли бактерий существенно увеличивается при воспалительных процессах и приводит к дисбактериозу. Род *Bacillus* (0,5%) обладает антимикробной активностью [8]. Род *Methanobrevibacter* (3,0%), – самый распространенный род продуцентов метана в рубце. Общей чертой бактерий рода *Blautia* является утилизация водорода и диоксида углерода с продукцией ацетатов (уксусной кислоты). *Caloramator* - малоизученный род термофильных бактерий, принадлежащий к типу *Firmicutes* (3,0%) [27]. Род *Lysinibacillus* (1,1%) - веретенообразные бактерии, выделены из различных объектов, включая сельскохозяйственные почвы и заводские сточные воды. Естественной экологической нишей бактерий рода *Lysinibacillus* считается почва. В процессе метаболизма могут использовать кислород, метаболизируют различные сахара и другие простые углеводы. Род *Alcaliphilus* (7,0%) и *Clostridium* участвуют в обмене веществ и усвоении питательных веществ. Представитель рода *Alcaliphilus - peptidifermentans* (1,9%) микроорганизм, способный к ферментации пептидов и восстановлению Fe (III) [28].

Заключение

В настоящем исследовании нами экспериментально был расшифрован состав микробиома кишечника привозных коров породы Абердин-Ангус с использованием NGS-секвенирования на приборе MiSeq Illumina.

В результате идентификации состава микробиома было установлено высокое биологическое разнообразие микробной популяции.

Особо опасных патогенов у животных не обнаружено. Однако присутствует значительная доля условно - патогенных микроорганизмов (роды *Serratia*, *Escherichia*), которые при ослаблении общего и местного иммунитета в организме могут стать причиной дисбиоза и патологического процесса. В связи с этим, необходимо обратить внимание на сдвиг в сторону полезной микрофлоры путём увеличения численности полезных микроорганизмов.

Наблюдалась высокая относительная численность типов *Firmicutes* (55,0%), *Proteobacteria* (16,8%), семейств *Enterobacteriaceae* (6,7%), *Lachnospiraceae* (7,1%), рода *Ruminococcus* (2,2 %) несмотря на то, что животных кормили фуражной диетой. Группа животных имеет эффективность кормления, так как на это указывает увеличенное количество типов *Firmicutes*, *Proteobacteria*, семейства *Coriobacteriaceae* (2,5%), рода *Butyrivibrio* (1,8%). Увеличение представителей типа *Euryarchaeota* (5,1%), рода *Methanobrevibacter* (3,0%) является свидетельством выработки животными метана, неблагоприятно влияющего на окружающую среду.

Литература:

- 1 Carberry CA, Kenny DA, Han S, McCabe MS, Waters SM. Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78:4949–58.
- 2 Rufener WH, Nelson W, Wolin MJ. Maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. *Appl Microbiol.* 1962; 11(May).
- 3 Chloe Matthews, Fiona Crispie, Eva Lewis, Michael Reid, Paul W. O'Toole & Paul D. Cotter. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes.* 2019, VOL. 10, NO. 2, 115–132.

- 4 Pace, N.R., D.A. Stahl, D.J. Lane, and G.J. Olsen. 1985. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News* 51:4–12.
- 5 Li RW, Li W, Sun J, Yu P, Baldwin RL, Urban JF. The effect of helminth infection on the microbial composition and structure of the caprine abomasal microbiome. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-10.
- 6 Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013; Jan; 41(1): e1. [PMCFreearticle] [PubMed].
- 7 E. Khafipour, S. Li, H.M. Tun, H. Derakhshani, S. Moossavi, J.C. Plaizier. Effects of grain feeding on microbiota in the digestive tract of cattle. *Animal Frontiers*, 2016; 6(2):13–19.
- 8 Harvey C. Freetly, Aaron Dickey, Amanda K. Lindholm-Perry, Richard M. Thallman, John W. Keele, Andrew P. Foote, James E. Wells. Digestive tract microbiota of beef cattle that differed in feed efficiency. *Journal of Animal Science*, 2020; 98(2):1–16.
- 9 Orin C. Shanks, Catherine A. Kelty, Shawn Archibeque, Michael Jenkins, Ryan J. Newton, Sandra L. McLellan, Susan M. Huse, Mitchell L. Sogin. Community Structures of Fecal Bacteria in Cattle from Different Animal Feeding Operations. *Appl Environ Microbiol*, 2011; 77(9):2992–300.
- 10 Fernando, S.C., H.T. Purvis, II, F.Z. Najar, L.O. Sukharnikov, C.R. Krehbiel, T.G. Nagaraja, B.A. Roe, and U. Desilva. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol*. 76(22):7482–7490. doi:10.1128/AEM.00388-10.
- 11 Mao, S., R. Zhang, D. Wang, and W. Zhu. 2013. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe* 24:12–19. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.08.003.
- 12 Li, R.W., E.E. Connor, C. Li, R.L. Baldwin Vi, and M.E. Sparks. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ. Microbiol*. 14(1):129–139. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02543.x.
- 13 Khafipour, E., S. Li, J.C. Plaizier, and D.O. Krause. 2009b. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Appl. Environ. Microbiol*. 75(22):7115–7124. doi:10.1128/AEM.00739-09.
- 14 Plaizier, J.C., S. Li, H.M. Tun, D.O. Krause and Ehsan Khafipour. 2016. Effects of experimentally induced subacute ruminal acidosis (SARA) on the rumen and hindgut microbiome in dairy cows. *Front. Microbiol*.
- 15 Jianan Liu, Fang Liu, Wentao Cai, Cunling Jia, Ying Bai, Yanghua He, Weiyun Zhu, Robert W. Li Diet-induced Changes in Bacterial Communities in the Jejunum and Their Associations with Bile Acids in Angus Beef Cattle. *Animal Microbiome*. 2020; 33(2):26.
- 16 R. John Wallace¹, Goor Sasson, Philip C. Garnsworthy, Ilma Tapio. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. *Science Advances*. 2019; 5(7). DOI: 10.1126/sciadv.aav8391.
- 17 Shabat, S. K., G. Sasson, A. Doron-Faigenboim, T. Durman, S. Yaacoby, M. E. Berg Miller, B. A. White, N. Shterzer, and I. Mizrahi. 2016. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *ISME J*. 10:2958–2972. doi:10.1038/ismej.2016.62.
- 18 Li, F., and L. L. Guan. 2017. Metatranscriptomic profiling reveals linkages between the active rumen microbiome and feed efficiency in beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol*. 83:e00061-17. doi:10.1128/AEM.00061-17.

19 Myer, P. R., T. P. Smith, J. E. Wells, L. A. Kuehn, and H. C. Freetly. 2015a. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. Plos One 10:e0129174. doi:10.1371/journal.pone.0129174.

20 Chloe Matthews, Fiona Crispie, Eva Lewis, Michael Reid, Paul W. O'Toole, and Paul D. Cotter. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. Gut Microbes. 2019; 10(2): 115–132.

21 Phillip R. Myera. Bovine Genome-Microbiome Interactions: Metagenomic Frontier for the Selection of Efficient Productivity in Cattle Systems. American society for microbiology. 2019; 4 (3): e00103-19.

22 Simon Deusch, Bruno Tilocca, Amélia Camarinha-Silva, Jana Seifert. News in livestock research — use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. Computational and Structural Biotechnology Journal. 2015; 13: 55–63.

23 Minseok Kim, Tansol Park, and Zhongtang Yu. Metagenomic investigation of gastrointestinal microbiome in cattle. Asian-Australas J Anim Sci. 2017; 30: 11:1515-1528.

24 Guoxing Zhang, Yachun Wang, Hanpeng Luo, Wenqing Qiu, Hailiang Zhang, Lirong Hu, Yajing Wang, Ganghui Dong and Gang Guo. The Association Between Inflammation and Age-Related Changes in the Ruminant and Fecal Microbiota Among Lactating Holstein Cows. Front. Microbiol., 09 August 2019 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01803>.

25 Bach A., López-García A., González-Recio O., Elcoso G., Fàbregas F., Chaucheyras Durand F., Castex M. Changes in the rumen and colon microbiota and effects of live yeast dietary supplementation during the transition from the dry period to lactation of dairy cows. Journal of Dairy Science, 2019; 102(7):6180–6198.

26 William J. Kelly, Sinead C. Leahy, Janine Kamke, Priya Soni, Satoshi Koike, Roderick Mackie, Rekha Seshadri, Gregory M. Cook, Sergio E. Morales, Chris Greening & Graeme T. Attwood. Occurrence and expression of genes encoding methyl-compound production in rumen bacteria. Animal Microbiome, 2019; 1: 15.

27 Лычкова А.Э. Взаимодействие электромоторной активности гладких мышц и микрофлоры кишечника. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2012. 11; 84-90.

28 Zhilina T.N., Zavarzina D.G., Kolganova T.V., Lysenko A.M. and Tourova T.P. *Alkaliphilus peptidofragmentans* sp. nov., a New *Alkaliphilic* Bacterial Soda Lake Isolate Capable of Peptide Fermentation and Fe(III) Reduction // Microbiology, 2009, Vol. 78, No. 4, pp. 445–454.

29 Ooka T., Seto K., Kawano K., Kobayashi H., Etoh Y., Ichihara S., Hayashi T. Clinical Significance of *Escherichia Albertii*. Emerging Infectious Diseases. 2012. 18(3); 488-492.

Работа профинансирована и выполнена в рамках грантового проекта Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан ИРН AP09259133 «Исследование микробиома желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота с целью уменьшения выбросов парниковых газов».

А.Т. ДӘУҒАЛИЕВА¹, С.Т. ДӘУҒАЛИЕВА², Б.С. АРЫҢҒАЗИЕВ¹,
Т.А. ЛАВРЕНТЬЕВА¹

¹ «Қазақ мал шаруашылығы және жемшөп өндірісі ғылыми зерттеу институты» ЖШС, Алматы

² «Микробиология және вирусология ғылыми өндірістік орталығы» ЖШС, Алматы

АБЕРДИН-АНГУС ТҰҚЫМДЫ ІРІҚАРА МАЛЫНЫҢ АСҚАЗАН-ІШЕК ЖОЛ МИКРОБИОМАСЫН ЗЕРТТЕУ

Түйін

Жануарлардың микробиомасын және оның қызметін тереңірек түсіну ірі қара малға жем берудің тиімділігін арттырудың жаңа стратегияларын табуға көмектеседі. Осыған байланысты біздің зерттеуіміздің мақсаты Абердин Ангус сиырларының ішек микробиомының таксономиялық құрылымын анықтау болды. Жаңа буын тізбектеу технологиясын қолдана отырып, 16S метагеномиялық талдау жүргізілді, бұл ішек құрамындағы микробтық құрамын анықтауға мүмкіндік берді. 16S метагеномикасы қоректік орталарда өсіру кезеңін айналып өтіп, сынамада бар бактерияларды анықтау және салыстыру үшін қолданылады.

Түйінді сөздер: микробиом, ірі қара мал, абердин ангусы, келесі буын тізбегі.

IRSTI: 34.15.23, 68.39.29

A.T. DAUGALIYEVA¹, S.T. DAUGALIYEVA², B.S. ARYNGAZIYEV¹,
LAVRENTIEVA T.A.

¹ LLP «Kazakh Research Institute for Livestock and Fodder Production», Almaty

² LLP "Research and Production Center for Microbiology and Virology", Almaty

RESEARCH OF THE MICROBIOM OF THE GASTROINTESTINAL TRACT OF THE ABERDIN-ANGUS BREED CATTLE

doi: 10.53729/MV-AS.2021.03.02

Summary

The aim of the study was to determine the taxonomic structure of the intestinal microbiome of Aberdeen Angus cattle using a new generation sequencing technology. 16S metagenomic analysis made it possible to determine the microbial composition of the intestinal contents bypassing the stage of cultivation on nutrient media. Genetic identification was carried out and a taxonomic profile of all bacteria present, including non-cultivated forms, was obtained.

Key words: microbiome, cattle, Aberdeen Angus, next generation sequencing.

The study of microorganisms at the molecular level has opened up new opportunities for scientists to study the microflora of animal organs and tissues. The outdated term “microflora” is being replaced by a broader concept called “microbiome”. The microbiome is a community of bacteria that every organism has on the inside and outside of its body. For each individual, it is unique and contains tens of times more cells and genes than the body's own genes. The microbiome regulates many of the body's vital processes. Its study is necessary for a detailed understanding of the processes occurring

between microorganisms inhabiting a particular organ and their relationship with the cells of the body.

Traditionally, the microbial population has been studied through cultivation techniques, physiological and biochemical tests. These methods are laborious, time-consuming, require prior knowledge about the microorganisms of interest to isolate them from the community, and are also not as accurate as identification by genotypic methods and, moreover, do not allow the complete identification of all microorganisms due to the presence of so-called "uncultivated forms".

A comprehensive study of the microbiome composition of individual organs and tissues of organisms became possible with the advent of Next Generation Sequencing (NGS). A study using this technique is carried out without a stage of cultivation, that is, all genomic DNA is directly isolated from the sample, which is subjected to sequencing. Unlike classical Sanger sequencing, NGS platforms allow millions of small DNA fragments to be read in parallel from two sides, resulting in a huge amount of data. For one launch of the new generation sequencers, it is possible to determine from several tens of thousands to several billion nucleotides, depending on the tasks.

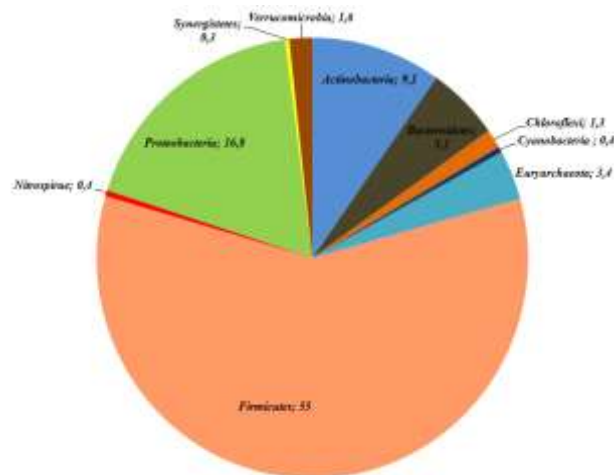
Unfortunately, the use of this technology on animals is not yet widespread due to the cost of analysis and the unavailability of the technology. However, in recent years, the world science has been actively studying the microbiome of productive animals. Ruminants, including cattle and small ruminants, constitute an important source of food for humans. These animals are hosts of a complex gut microbiome (including bacteria, archaea, protozoa and fungi), which in turn provides the various enzymes needed to break down plant fibers into volatile fatty acids and microbial crude protein. The composition of the microbial community involved in the microbial metabolism of the rumen is of great interest for animal feeding [1]. The gastrointestinal tract of ruminants contains a wide range of microorganisms, which makes it difficult to reproduce the conditions for their optimal growth. Most of the microbes are not cultured in vitro and cannot be grown on laboratory culture media. The cultivation of anaerobes is quite difficult due to the need to exclude oxygen, the slow growth of microbes, and the complexity of other growth requirements [2,3,4].

Materials and methods

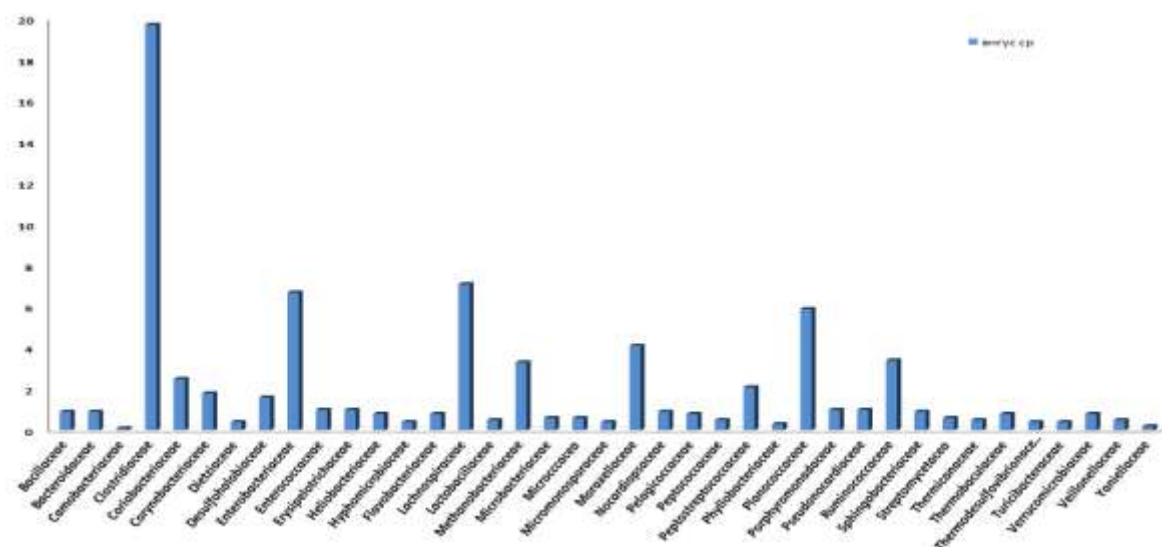
Fecal samples were taken from the rectum from three heads of cattle of the Aberdeen-Angus breed of the seventh generation of the Almaty region. Samples were immediately frozen on dry ice and stored at -80 °C in a freezer until DNA extraction.

Microbial DNA from feces was extracted using a QIAamp DNA feces kit (Qiagen, Valencia, CA). Then, the DNA concentration was measured using a Qubit® 2.0 fluorometer [5]. The V3-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene were amplified by PCR from 20 ng of total purified DNA with adaptive Illumina oligonucleotides compatible with the platform. The primer sequences were as follows: 341/357F and 805/785R: GACTACHVGGGTATCTAATCC [6]. DNA concentration and size were determined using a BioAnalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA). Amplicons were purified with the Agencourt AMPure XP kit (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA). Libraries were prepared in several stages: obtaining a PCR product with universal primers, evaluating its quality and quantity, purification, attaching Illumina indices in the PCR step, purification, evaluating the quality and quantity of the product with indices, normalization, pooling, and denaturation of libraries. The library pool was sequenced in an Illumina MiSeq sequencer using the Illumina MiSeq reagent kit according to the manufacturer's protocol. Secondary analysis or data processing was performed using MiSeq Reporter software (MSR). Taxonomic identification of microorganisms was

The bacteria present in the sample were identified according to the following taxonomic levels: kingdom, phylum, class, order, family, genus, and species.



As shown in Figure 1, most of the OTUs in the faeces of Aberdeen Angus cattle were categorized as *Firmicutes* (55%), *Proteobacteria* (16.8%), *Actinobacteria* (9.1%), *Bacteroidetes* and *Euryarchaeota* (5.1%), *Verrucomicrobia* (1.6%), *Cyanobacteria* (0.4%), *Synergistetes* (0.3%). The average results for all animals were taken. The following families belonged to the type *Firmicutes*: *Clostridiaceae* (19.7%), *Lachnospiraceae* (7.1%), *Veillonellaceae* (0.5%), *Ruminococcaceae* (3.4%), *Peptostreptococcaceae* (2.1%), and *Turicibacteraceae* (0.4%). The *Bacteroidetes* type included the *Bacteroidaceae* family (0.9%).



48

As shown in Figure 2, the families *Enterobacteriaceae* (6.7%), *Planococcaceae* (5.9%), *Moraxellaceae* (4.1%), *Methanobacteriaceae* (3.3%) prevailed at the level of bacterial families in Aberdeen Angus cows. *Coriobacteriaceae* (2.5%), *Corynebacteriaceae* (1.8%), *Porphyromonadaceae* and *Erysipelotrichaceae* (1%), *Peptococcaceae* (0.5%).

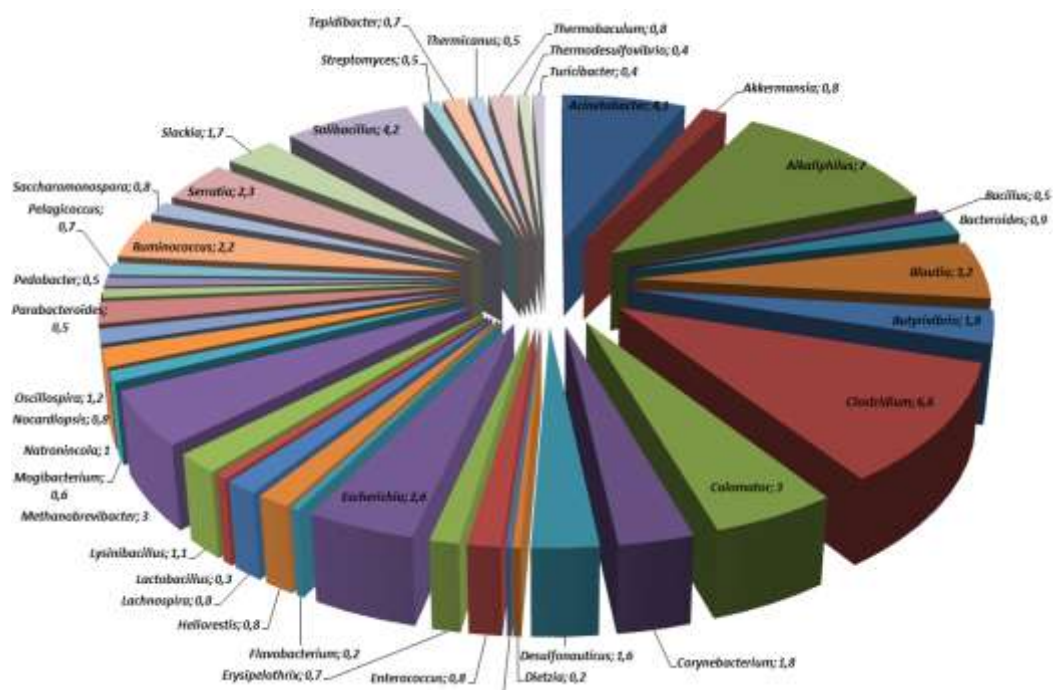


Figure 3 - Microbial profile of the intestinal bacterial community at the genus level

As shown in Figure 3, the genera *Alkaliphilus* (7.0%), *Clostridium* (6.6%), *Acinetobacter* (4.1%), *Solibacillus* (4.2%), *Blautia* (3.2%), *Colomator* and *Methanobrevibacter* (3.0%), *Coriobacteriaceae* (2.5%), *Serratia* (2.3%), *Ruminococcus* (2.2%), *Escherichia* (2.6%), *Butyrivibrio* and *Corynebacterium* (1.8%), *Oscillospira* (1.2%), *Akkermansia* and *Enterococcus* (0.8%), *Mogibacterium* (0.6%), *Bacillus* (0.5%), *Lactobacillus* (0.3%) were taxa of rectal bacteria.

According to literature sources, the relative number of representatives of the *Bacteroidetes* type (5.1%) in the microbial community of the digestive tract decreases when cattle are fed a large amount of grain, which allows the type *Firmicutes* (55.0%) and other opportunistic types such as *Proteobacteria* (16,8%), multiply faster per unit time, which leads to an increase in the proportion of *Firmicutes* and *Proteobacteria* [7,9]. However, the studies of other authors [10] were opposite, which confirms our studies, since the animals in this farm were fed with a fodder diet (silage, haylage), without the addition of concentrated feed. Also, an increase in the relative abundance of *Firmicutes* taxa is observed in the group of animals with increased feeding efficiency [21].

Bacteroidetes are known to be the primary destructor of complex polysaccharides in the plant cell wall. Because livestock rely on these enzymes to efficiently break down and digest fiber, increasing the ratio of *Firmicutes* to *Bacteroidetes* in digestion is undesirable [7,9]. The types *Proteobacteria* and *Cyanobacteria* (0.4%) contribute to high rates of weight gain in the animal [8]. However, excessive amounts of the *Proteobacteria*

type contribute to intestinal inflammation [24]. In particular, Mao et al. [11] and Li et al. [12] reported that a significant increase in grain feeding increased the abundance of *Proteobacteria*, whereas Khafipour et al. [13] and Plaizier et al. [14] did not observe this effect. ... The *Euryarchaeota* type (5.1%) is the most predominant type of archaea that produce methane [23].

The order *Bacteroidales* (2.5%), (type *Bacteroidetes*), which includes species encoding a wide range of plant polysaccharide degradation abilities, and the *Ruminococcaceae* family (3.4%) (type *Firmicutes*) were the most numerous taxa in all fodder animals [7]. The order *Bacteroidales* is more abundant in diets high in forage, and this is associated with the digestion of fiber and the biohydrogenation of fatty acids in the rumen [25]. The families *Bacteroidaceae* (0.9%) and *Peptococcaceae* (0.5%) are beneficial bacteria due to their ability to synthesize vitamins, aid digestion, stimulate immune function, and suppress pathogenic microbes [24].

Families *Enterobacteriaceae* (6.7%), *Turicibacteraceae* (0.4%) showed significantly higher numbers in the grain-fed group, while *Bacteroidaceae* were significantly higher in numbers in the grass-fed group. *Enterobacteriaceae* includes, along with many harmless symbionts, many known pathogens, in our case *Serratia* (2.3%) [15] and the genus *Escherichia* (2.6%). Species belonging to the genus *Escherichia* are inhabitants of the gastrointestinal tract of warm-blooded animals, but many of them are pathogenic. It is known that *Escherichia*, being in the intestine, inhibits intestinal transit and intestinal motor activity [27].

Order *Clostridiales* (37.6%), type *Firmicutes* prevailed in gobies with a large ADG (weight gain) [8]. The families *Clostridiaceae* (19.7%) and *Veillonellaceae* (0.5%), as well as the genus *Clostridium* (6.6%), are involved in the metabolism of bile acid [8,15]. In the process of vital activity, clostridia produce short-chain fatty acids. The *Clostridiaceae* family is important for the digestion of carbohydrates and proteins. The abundance of *Clostridiales* is associated with a decrease in intestinal inflammation due to increased IL-10 expression in the colon [25].

Members of the *Ruminococcaceae* family (order *Clostridiales*) are associated with the digestion of fiber, ferment starch and convert primary bile acids into secondary ones. The most numerous family in the grass-eating group, perhaps because this group of bacteria depends on dietary fiber for energy [15, 25]. *Ruminococcaceae* were higher in gobies with high ADG. Like *Lachnospiraceae* (type *Firmicutes*, order *Clostridiales*), increased levels of *Ruminococcaceae* indicate more complete fermentation and an increase in assimilable nutrients available to the animal [8].

The families *Lachnospiraceae* (7.1%) and *Ruminococcaceae* contain acetogens. Acetogens can serve as a hydrogen scavenger and increase if methane production is reduced [8]. Elevated levels of *Lachnospiraceae* may indicate more active fermentation in the cecum, resulting in increased nutrient availability from the absorbed VFA (volatile fatty acids) available to the animal. Many *Lachnospiraceae* produce butyrate through the digestion of carbohydrates, which is a nutrient for the intestines. A higher abundance of *Lachnospiraceae* in groups of animals with high RFI (residual feed intake) may indicate an increase in butyrate metabolism and, therefore, feeding efficiency [8,20]. *Lachnospiraceae* also ferment pectin [25].

The prevalence of the relative abundance of families *Lachnospiraceae* (7.1%), *Enterobacteriaceae* (6.7%), *Turicibacteraceae* type *Firmicutes* (0.4%), in contrast to *Ruminococcaceae* (3.4%), *Porphyromonadaceae* (1.0%), *Bacteroidaceae* (0.9%) indicates that the animals were fed a grain-based diet [15]. *Lachnospiraceae* were more abundant in gobies, with the least amount of ADG. Shabat et al. Found that dairy cows with the lowest feed efficiency (highest RFI) had more *Lachnospiraceae*. Li and Guan

found that *Lachnospiraceae* were associated with raising cattle with higher RFI (less efficient); however, these observations are in contrast to those of Myer et al., who found that *Lachnospiraceae* were more abundant among gobies with the highest ADG [8, 17, 18, 19].

The family *Erysipelotrichaceae* (1.0%) was larger in the caecum of gobies with the highest ADG and the lowest ADFI (mean daily feed intake). *Erysipelotrichaceae* is associated with lipid metabolism and inflammation. Family *Coriobacteriaceae* (2.5%), type *Actinobacteria* (9.1%), modulates lipid metabolism in an animal. *Coriobacteriaceae* was elevated in gobies with high ADG [8].

The genus *Ruminococcus* is the most numerous genus of the *Firmicutes* type. Grain feeding is generally associated with an increase in the relative abundance of *Ruminococcus* and a reduction in the genus *Acinetobacter* (4.1%) [13]. The genus *Ruminococcus* plays a major role in the degradation of rumen cellulose (polysaccharides) [8,22]. *Ruminococcus* is one of the main inherited bacteria, which corresponds to a key role in cellulolysis [16,21]. The genus *Akkermansia* (0.8%) promotes inflammation [8,24]. The genus *Escherichia* (2.6%) produces toxic compounds by fermenting proteins [24]. *Escherichia albertii* (2.3%), the most abundant species found, is an eae-positive strain of *Escherichia coli*, which differs from ordinary *E. coli* by the presence of an additional eae gene [29]. The proportion of collic bacteria increases significantly in inflammatory processes and leads to dysbiosis. The genus *Bacillus* (0.5%) has antimicrobial activity [8]. The genus *Methanobrevibacter* (3.0%) is the most common genus of methane producers in the rumen. A common feature of bacteria of the genus *Blautia* is the utilization of hydrogen and carbon dioxide with the production of acetates (acetic acid). *Caloramator* is a poorly studied genus of thermophilic bacteria belonging to the type *Firmicutes* (3.0%) [27]. The genus *Lysinibacillus* (1.1%) is a spindle-shaped bacteria isolated from various objects, including agricultural soils and factory wastewater. The natural ecological niche of bacteria of the genus *Lysinibacillus* is considered to be soil. In the process of metabolism, they can use oxygen, metabolize various sugars and other simple carbohydrates. The genus *Alcaliphilus* (7.0%) and *Clostridium* are involved in metabolism and assimilation of nutrients. A representative of the genus *Alcaliphilus* is peptidifermentans (1.9%), a microorganism capable of fermenting peptides and reducing Fe (III) [28].

The well-known genus *Lactobacillus* (0.3%) type *Firmicutes*, order *Clostridiales*, is a producer of lactic acid (lactate) from starch and its relative abundance is high in grain-fed cattle. Lactic acid is not metabolized by animals, it is instead absorbed through the rumen walls, causing an increase in lactic acid and a decrease in blood pH, and VFA accumulates in the rumen, which has a detrimental effect on the microbiota and the animal. These abrupt and sudden changes result in a decrease in rumen pH and an increase in the number of *Lactobacillus* species. The genera *Lactobacillus*, *Clostridium*, makes bile acids available for further biotransformation. The genera *Lactobacillus* and *Ruminococcus* (2.2%) were significantly higher in the jejunum of the grain-fed group, while *Solibacillus* (4.2%) was significantly higher in the herbal-fed group [15, 20].

The genus *Butyrivibrio* (1.8%) belongs to the *Lachnospiraceae* family [8]. *Butyrivibrio* is associated with the breakdown of hemicellulose in the rumen and the end product of fermentation is butyrate, which is an important energy source for intestinal epithelial cells, as is *Blautia* (3.2%) [8,21]. Members of this genus have often been identified as associated with gobies, which effectively fed [21]. *Butyrivibrio* degrades pectin, phenylalanine, tyrosine and tryptophan [8,26].

Conclusion

In this study, we experimentally deciphered the composition of the intestinal microbiome of imported Aberdeen Angus cows using NGS sequencing on the MiSeq Illumina device.

As a result of identifying the composition of the microbiome, a high biological diversity of the microbial population was established.

Particularly dangerous pathogens in animals have not been found. However, there is a significant proportion of opportunistic microorganisms (genera *Serratia*, *Escherichia*), which, with a weakening of general and local immunity in the body, can cause dysbiosis and a pathological process. In this regard, it is necessary to pay attention to the shift towards beneficial microflora by increasing the number of beneficial microorganisms.

There was a high relative abundance of types *Firmicutes* (55.0%), *Proteobacteria* (16.8%), families *Enterobacteriaceae* (6.7%), *Lachnospiraceae* (7.1%), genus *Ruminococcus* (2.2%), despite the fact that the animals were fed a forage diet. The group of animals has feeding efficiency, as indicated by the increased number of types of *Firmicutes*, *Proteobacteria*, the family *Coriobacteriaceae* (2.5%), and the genus *Butyrivibrio* (1.8%). The increase in the type *Euryarchaeota* (5.1%), the genus *Methanobrevibacter* (3.0%) is evidence of the production of methane by animals, which adversely affects the environment.

References:

- 1 Carberry CA, Kenny DA, Han S, McCabe MS, Waters SM. Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78:4949–58.
- 2 Rufener WH, Nelson W, Wolin MJ. Maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. *Appl Microbiol.* 1962; 11(May).
- 3 Chloe Matthews, Fiona Crispie, Eva Lewis, Michael Reid, Paul W. O'Toole & Paul D. Cotter. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes.* 2019, VOL. 10, NO. 2, 115–132.
- 4 Pace, N.R., D.A. Stahl, D.J. Lane, and G.J. Olsen. 1985. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News* 51:4–12.
- 5 Li RW, Li W, Sun J, Yu P, Baldwin RL, Urban JF. The effect of helminth infection on the microbial composition and structure of the caprine abomasal microbiome. *Scientific reports.* 2016;6(1):1-10.
- 6 Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies *Nucleic Acids Res.* 2013; Jan; 41(1): e1. [PMCfreearticle] [PubMed].
- 7 Khafipour E.S. Li, Tun H.M., Derakhshani H., Moossavi S., Plaizier J.C.. Effects of grain feeding on microbiota in the digestive tract of cattle. *Animal Frontiers,* 2016; 6(2):13–19.
- 8 Harvey C. Freetly, Aaron Dickey, Amanda K. Lindholm-Perry, Richard M. Thallman, John W. Keele, Andrew P. Foote, James E. Wells. Digestive tract microbiota of beef cattle that differed in feed efficiency. *Journal of Animal Science,* 2020; 98(2):1–16.
- 9 Orin C. Shanks, Catherine A. Kelty, Shawn Archibeque, Michael Jenkins, Ryan J. Newton, Sandra L. McLellan, Susan M. Huse, Mitchell L. Sogin. Community

Structures of Fecal Bacteria in Cattle from Different Animal Feeding Operations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(9):2992–300.

10 Fernando, S.C., Purvis H.T., Najar F.Z., Sukharnikov L.O., Krehbiel C.R., Nagaraja T.G., Roe B.A., and Desilva U. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010;76(22):7482–7490. doi:10.1128/AEM.00388-10.

11 Mao, S., R. Zhang, D. Wang, and W. Zhu. 2013. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe* 24:12–19. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.08.003.

12 Li, R.W., E.E. Connor, C. Li, R.L. Baldwin Vi, and M.E. Sparks. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ. Microbiol.* 14(1):129–139. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02543.x.

13 Khafipour, E., S. Li, J.C. Plaizier, and D.O. Krause. 2009b. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(22):7115–7124. doi:10.1128/AEM.00739-09.

14 Plaizier, J.C., S. Li, H.M. Tun, D.O. Krause and Ehsan Khafipour. 2016. Effects of experimentally induced subacute ruminal acidosis (SARA) on the rumen and hindgut microbiome in dairy cows. *Front. Microbiol.*

15 Jianan Liu, Fang Liu, Wentao Cai, Cunling Jia, Ying Bai, Yanghua He, Weiyun Zhu, Robert W. Li Diet-induced Changes in Bacterial Communities in the Jejunum and Their Associations with Bile Acids in Angus Beef Cattle. *Animal Microbiome.* 2020; 33(2):26.

16 John Wallace R., Goor Sasson, Philip C. Garnsworthy, Ilma Tapio. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. *Science Advances.* 2019; 5(7). DOI: 10.1126/sciadv.aav8391.

17 Shabat, S. K., G. Sasson, A. Doron-Faigenboim, T. Durman, S. Yaacoby, M. E. Berg Miller, B. A. White, N. Shterzer, and I. Mizrahi. 2016. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *ISME J.* 10:2958–2972. doi:10.1038/ismej.2016.62.

18 Li, F., and L. L. Guan. 2017. Metatranscriptomic profiling reveals linkages between the active rumen microbiome and feed efficiency in beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e00061-17. doi:10.1128/AEM.00061-17.

19 Myer, P. R., T. P. Smith, J. E. Wells, L. A. Kuehn, and H. C. Freetly. 2015a. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. *Plos One* 10:e0129174. doi:10.1371/journal.pone.0129174.

20 Chloe Matthews, Fiona Crispie, Eva Lewis, Michael Reid, Paul W. O'Toole, and Paul D. Cotter. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes.* 2019; 10(2): 115–132.

21 Phillip R. Myera. Bovine Genome-Microbiome Interactions: Metagenomic Frontier for the Selection of Efficient Productivity in Cattle Systems. *American society for microbiology.* 2019; 4 (3): e00103-19.

22 SimonDeusch, BrunoTilocca, Amélia Camarinha-Silva, Jana Seifert. News in livestock research — use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Computational and Structural Biotechnology Journal.* 2015; 13: 55–63.

23 Minseok Kim, Tansol Park, and Zhongtang Yu. Metagenomic investigation of gastrointestinal microbiome in cattle. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2017; 30: 11:1515-1528.

24 Guoxing Zhang, Yachun Wang, Hanpeng Luo, Wenqing Qiu, Hailiang Zhang, Lirong Hu, Yajing Wang, Ganghui Dong and Gang Guo. The Association Between Inflammation and Age-Related Changes in the Ruminal and Fecal Microbiota Among Lactating Holstein Cows. *Front. Microbiol.*, 09 August 2019 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01803>.

25 Bach A., López-García A., González-Recio O., Elcoso G., Fàbregas F., Chaucheyras Durand F., Castex M. Changes in the rumen and colon microbiota and effects of live yeast dietary supplementation during the transition from the dry period to lactation of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2019; 102(7):6180–6198.

26 William J. Kelly, Sinead C. Leahy, Janine Kamke, Priya Soni, Satoshi Koike, Roderick Mackie, Rekha Seshadri, Gregory M. Cook, Sergio E. Morales, Chris Greening & Graeme T. Attwood. Occurrence and expression of genes encoding methyl-compound production in rumen bacteria. *Animal Microbiome*, 2019; 1: 15.

27 Лычкова А.Э. Взаимодействие электромоторной активности гладких мышц и микрофлоры кишечника. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2012. 11; 84-90.

28 Zhilina T.N., Zavarzina D.G., Kolganova T.V., Lysenko A.M. and Tourova T.P. *Alkaliphilus peptidofragmentans* sp. nov., a New Alkaliphilic Bacterial Soda Lake Isolate Capable of Peptide Fermentation and Fe(III) Reduction // *Microbiology*, 2009, Vol. 78, No. 4, pp. 445–454.

29 Ooka T., Seto K., Kawano K., Kobayashi H., Etoh Y., Ichihara S., Hayashi T. Clinical Significance of *Escherichia albertii*. *Emerging Infectious Diseases*. 2012. 18(3); 488-492.

МРНТИ: 65.63.03

М. Б. ЕРДЕНБЕКОВА, С.Д. ЖАНТЛЕСОВА, Ф.К. АЛАЙДАР, А.Д.
МАСИРБАЕВА

«Микробиология және вирусология ғылыми өндірістік орталығы» ЖШС, Алматы

СҮТҚЫШҚЫЛДЫ БАКТЕРИЯЛАР *ESCHERICHIA COLI* (*E.COLI*) ІШЕК ТАЯҚШАСЫНА ҚАРСЫ КӨРСЕТЕТІН АНТАГОНИСТТІК ҚАСИЕТТЕРІН ЗЕТТЕУ

doi: 10.53729/MV-AS.2021.03.03

Түйін

Қазіргі нарық заманында таза сүт өнімдерін шығаратын өндірістермен қатар, құрамына пайдасыз қоспалар қосып өнім шығаратын өндірістер кездеседі. Сол себепті сүт сусындары өндірісіндегі, соның ішіндегі нарықтағы қолданыстағы өнімдердің сапалық көрсеткішін зерттеу маңызды мәселелердің бірі болып табылады. Сүт сусындарының сапалық айқындаушы факторларына дәрумендер, көмірсулар, ақуыз, май мөлшерлері мен қышқылдығы сияқты көрсеткіштер жатқанымен, басты әрі маңызды көрсеткіш – құрамында сүтқышқылды бактериялардың болуы екендігі белгілі. Сүтқышқылды бактериялардың *Escherichia coli* (*E.coli*) штаммына антагонистік қасиет көрсетуі олардың ағзадағы маңызды ролін айқындайды.

Кілтті сөздер: сүтқышқылды бактерия, *Escherichia coli* (*E.coli*), антагонистік қасиет.

Адам ағзасындағы сүтқышқылды бактериялардың концентрациясы тұрақты емес. Олардың саны мен түрлік құрамы сыртқы және ішкі факторларға (тамақтану, дәрі қабылдау, қоршаған ортаның ластануы, созылмалы аурулар және т.б.) байланысты өзгереді. Осыған байланысты сүтқышқылды микрофлораны жеткілікті мөлшерде үнемі ұстап тұру қажет. Микрофлораны қалыпты түрде ұстауға құрамында лактобактериясы бар қышқыл сүт өнімдері көмектеседі. Олар пробиотиктер деп аталады. Сүтқышқылды бактериялары бар өнімдер әртүрлі:

- айран;
- ряженка;
- йогурт;
- простокваша;
- ашытқы;
- цидофильді сусын және т.б.

Бұл өнімдердің барлығы жағымды дәмі бар және сүт ақуызының көтерілу жағдайында ас қорытуға оң әсер етеді. Оларға қатысқан лактобактериялардан басқа өндірушілер құрамына пайдалы қасиеттері зерттелген және зерттеу барысында дәлелденген арнайы штаммдар қосады. Құрамында сүтқышқылды бактериялары бар азық-түліктерді бала жасында қолдану күшті иммунитеттің қалыптасуына, тіндер мен ағзалардың қалыпты дамуына ықпал етеді. Мұндай өнімдерді қолданатын балалар белсенді, мұқият, ақпаратты жақсы меңгереді [1,4].

Бұл саладағы алғашқы ашылулар атақты орыс-француз биологы И. И. Мечниковқа тиесілі. Ғалым сау ішек микрофлорасын лактобактериялар арқылы қалпына келтіру мүмкіндігін зерттеді. Арманшылардың ұзақ және қыңыр эксперименттерінің барысында Болгар таяқшасының қасиеттерін зерттеді және сол заман бойынша жаңа қышқыл сүт өнімі – йогурт жасады, ол бірінші уақытта

мечниковская простоквашасы деп аталды. Илья Ильич сүт қышқылды бактериялардың адам иммунитетіне оң әсері туралы болжам жасады. Оның теориясының "жасына" қарамастан, осы саладағы нақты зерттеулер жақында өткізілді. Тәжірибе барысында лактобактериялар айқын антибактериалды қасиеттерге ие екені анықталды. Олар патогенді микроорганизмдерге қарсы әрекет ете алады, соңғылардың белсенділігін төмендетеді және зиянды бактериялар мен саңырауқұлақтарды жояды. Микробтарға қарсы әрекет сүт қышқылды бактериялардың қызметі барысында өндірілетін түрлі заттардың көмегімен жүзеге асырылады:

- сутегі асқын тотығы;
- антибиотиктер;
- органикалық қышқылдар;
- иммундық бактериоциндер және лактобациллалар [5,6].

Нарықтағы сүт сусындарының сапалық көрсеткіштерін айқындау мақсатында олардан бөлініп алынған сүтқышқылды микроорганизмдердің патогенді және шартты патогенді микроорганизмдерге антагонистикалық қасиетін зерттеу.

Зерттеу жұмысының міндеттері:

- сүт сусындарынан сүтқышқылды микроағзаларды бөліп алу;
- сүт сусындарынан бөлініп алынған сүтқышқылды микроағзалардың *E.coli* қарсы антагонистік белсенділігін зерттеу.

Антагонизм – ағзалар арасындағы симбиотикалық қатынастардың негізгі түрлерінің бірі, нәтижесінде өзара іс-қимылға қатысушылардың бірі (антагонист) бәсекелестік қасиеттері: антибиотикалық заттар өнімі, жоғары бойлық және бейімделу мүмкіндіктері есебінен өмір сүргені үшін күресте селективті артықшылық алады.

Патогенді және шартты-патогенді микроорганизмдер штамдарына қатысты дәрілік заттың антагонистік белсенділігін тест-штамдардың өсуінің кешігу аймақтары бойынша тығыз ортада кейінге қалдырылған антагонизм әдісімен анықтайды. Яғни, сүтқышқылды микроағзалардың белсенділігі олардың патогенді микроағзаларға қарсы тұруын артырады [3].

Материалдар мен әдістер

Зерттеу нысаны ретінде FOOD MASTER, Adal, Домик в деревне және JLC кефирлері алынды. Сүтқышқылды бактериялардың антагонистік қасиетін анықтау Алматы технологиялық университетінің «Тағам қауіпсіздігі» Ғылыми-Зерттеу Институтында жүргізілді.

Сүт өнімдерін қышқылдыққа талдау балғындық пен қауіпсіздікті анықтау үшін жүргізіледі. Бұл көрсеткіш өндірісте де, сынақ зертханасында да өте маңызды.

Қышқыл сүт өнімдерін дайындау сүт немесе кілегейді ашытуға негізделген, сүт қышқылды бактериялардың таза дақылдарымен культивирлеуді, кейде ашытқы мен сірке қышқылды бактериялар қосылады. Сол себептен қышқыл сүт өнімдердің қышқылдылығын анықтау өнімнің балғындылық көрсеткішінің бірі. Қышқылды сүт және сүт өнімдердің бәрі Тернер бойынша анықталады.

Сыйымдылығы 100-ден 250 см³ дейін колбаға дистильденген суды және өнімді бірінші кестеде көрсетілген көлемде өлшеп салынады, үш тамшы фенолфталеин тамызады. Кілегейлер мен ашыған сүт өнімдерін талдау кезінде пипеткамен алынған қоспаны 3-4 рет жуу арқылы өнімнің қалдықтарын колбаға апарады, содан кейін фенолфталеиннің 3 тамшысын қосады және 1 минут ішінде жоғалып кетпейтін және бояудың бақылау эталонына сәйкес келетін әлсіз қызғылт

бояу пайда болғанға дейін сілті ерітіндісі мен тұрақты араластыру кезінде титрлейді.

Сүттің құрамдас өнімі үшін титрлеудің соңын дәл анықтау үшін титрленген сынаманың жанында сүттің 10 см³ және тазартылған судың 40 см³ сынамасы бар бақылау колбасын қояды.

Кесте 1 – Өнімдер мен дистильденген судың көлемі

№	Өнімдер атаулары	Өнім көлемі, см ³	Дистилденген су көлемі, см ³
1	Сүт, құрамындасүт бар өнім	10	20
2	Сүт құрама өнімі	10	40
3	Клегей	10	20
4	Простокваша, ацидофилин, айран, қымыз және басқа да сүт қышқылды өнімдері	10	20

Сүт қышқылды сусынның қышқылдылығын Тернер (Т) градусы бойынша есптелінеді. Титрлеуге жұмсалған сілтінің мөлшерін алынған өнімнің көлеміне көбейтіледі.

Кефирден сүтқышқылды бактерияларды бөліп алу әдісі: сүтқышқылды бактерияларды бөлу алдында оларға қоректік орта дайындайды. МЕМСТ 10444.11-89 бойынша сүтқышқылды бактерияларды МРС агар қоректі ортасында өмір сүреді.

МРС агар қоректік ортасын дайындау: 500 мл суды өлшеп арнайы ыдысқа құйылады. МРС агар ұнтағын 34 г электронды лабораториялық таразымен (НПВ, 200 г) өлшеніп, жылтылған суға ұнтақты салады. Қоректік орта қайнап кетпеу үшін белсенді араластырылады және желе тәрізді кейіпке жақындағанда, колбаға құйылды. Кейін дайын қоректік ортаны залалсыздандыру керек. Автоклавты қосып, жылытылады. Автоклав жылығаннан кейін, қоректік орта салынып, автаклав бекітіліп, нық жабылады. 15минут залалсыздандырады.

Автоклавтан шыққан МРС агарды ламинар бокста петри табақшаларына 30 мл құйылды. Қоректік орта қатайғанын 30 минут қозғалыссыз тұрады.

Сүтқышқылды бактерияларды кефирдан бөлін алу: ламинар боксты (БАВнп-01-«Ламинар-С») залалсыздандырып, спир шамы жағылады. Сыйымдылығы 100-250 мл колбаға 90 мл физикалық ертінді құйылды, 10 мл пипетка арқылы кефирді алып, физикалық ерітіндіге қосады. 3-4 рет алынған сұйықтықтың көмегімен пипеткадағы кефирдің қалдығы жуылды. Кефир толықтай ерігенше араластырады. Кейін МРС агар қоректік ортасына шықан сұйықты пипетка арқылы 3-4 тамшы тамызады. Оны залалыздандырылған шпатель арқылы қоректік ортаның бетіне толығымен жаяды. Петри табақшаларын 37°C термостатқа (ТС-1/80 СПУ) қояды. Нәтижесі 36-48 сағаттан кейін алынды.

Антагонистік белсенділікті тест-штаммға байланысты қоректік отрасы белгілі болады. *E.coli* ішек таяқшасы Эндо агар қоректік ортасында өсіреді. ЭНДО агар қоректік ортасын дайындау үшін: 500 мл суды кастрюльге өлшеп құйылады. Эндо агар ұнтағын 21 гр электронды лабораториялық таразымен (НПВ, 200г) өлшеп, 37°C жылтылған суға саламыз. Қоректік орта қайнап кетпеу үшін белсенді араластырды, желе тәрізді болғанда, колбаға құяды.

Автоклавты жұмысқа дайындап, дайын қоректік ортаны аузын тығындап орап 15 минутта залалсыздандырады. Қоректік ортаның суығанда петри

табақшаларына 30 мл-ден құяды. Қатайғаннан кейін *E.coli* ішек таяқшасын ілмекпен бір колониясын алып, Эндо агар бетіне штрих жүргізеді.

Қоректік ортаға пробирка арқылы 4 ойшық жасалады. МРС агар қоректік ортасында өсірілген сүтқышқылды бактерияларды ойшыққа отырғызылады. Кейін қоректік ортаны термостатқа 37°C салады. 24-48 сағат өсіріп нәтижелерімізді алынады.

Нәтижелер мен талдаулар

Зерттеу нысаны ретінде «FOOD MASTER», «Adal», «Домик в деревне» және «JLC» кефирлердің ішінен бөліп алынған сүтқышқылды микроағзалардың антагонисттік белсенділігінің нәтижелері.



Сурет 1 – «JLC» кефірінің *E.coli* штаммы арқылы антагонисттік белсенділігін анықтау

Нәтижесінде 48 сағаттан өткеннен кейін «JLC» кефірі *E.coli* штаммға антагонисттік белсенділігін айқын көрестті. Сүтқышқылды микроағзалар ішек таяқшаларына қарсы тұрып, өскен колонияның орташа өсу ұзындығы 23,75 см құрады.



Сурет 2 – «Домик в деревне» кефірінің *E.coli* іштаммы арқылы антагонистік белсенділігін анықтау

Нәтижесінде 48 сағаттан өткеннен кейін «Домик в деревне» кефірі *E.coli* штаммға антагонистік белсенділігін жақсы көрсетті. Сүтқышқылды микроағзалар ішек таяқшасына қарсы тұрып, өскен колонияның орташа өсу ұзындығы 26,75 см құрады.



Сурет 3 – «Adal» кефірінің *E.coli* штаммы арқылы антагонистік белсенділігін анықтау

Нәтижесінде 48 сағат өткеннен кейін «Adal» кефірі *E.coli* штаммға антагонистік белсенділігін көрсетті. Сүтқышқылды микроағзалар ішек таяқшасына қарсы тұрып, өсіп шыққан культуралардың орташа өсу ұзындығы 25,5 см құрайды.



Сурет 4 – «FOOD Master» кефірінің *E.coli* штаммы арқылы антагонистік белсенділігін анықтау

Нәтижесінде 48 сағат өткеннен кейін «FOOD MASTER» кефірі *E.coli* штаммға антагонистік белсенділігін көрсетті. Сүтқышқылды микроағзалар ішек таяқшасына қарсы тұрып, өсіп шыққан культуралардың орташа өсу ұзындығы 27,75 см құрайды.

Кесте 2 – Сүт сусындарынан бөлініп алынған бактерияларының *E.coli* штамына антагонистік белсенділігі

Сынама номері	ЭНДО қоректік ортасында культураның өсу диаметрі, мм			
	«JLC»	«Домик в деревне»	«Adal»	«FOOD MASTER»
1	22	27	26	26
2	26	28	27	28
3	23	25	25	27
4	24	27	24	28
Орташа саны	23,75	26,75	25,5	27,25

Зерттеу нәтижесі бойынша сынаққа алынған өнімдердің сүтқышқылды микроағзалары *E.coli* ішек таяқшасына қатер тұруға қабілеті бар екені дәлденді.

Қорытынды

Сынаққа алынған «FOOD MASTER», «Adal», «Домик в деревне», «JLC» кефирлердің компаниялары нарықта орны еркекше. «FOOD MASTER», «Adal» компаниясы Қазақстандық сүн өнімдерін 90-шы жылдары шығара бастады. Ал «Домик в деревне» Ресей Федерациясында 1997 жылы ашылды. JLC Қазақстанның сүт өндірісі 2010 бірінші сүт өнімдерін шығара бастады. Қазір нарықта бірінші орын алатын сүт өнімдердің сапасы зерттеу нәтижесінде дәлелденді.

Антагонистік белсенділікті зерттеу барысында сынаққа алынған кефирдің төрт түріде патогенді микроағзаларға қарсы тұру қабілеті белсенді екені дәлелденіп, *E.coli* штаммына жоғары антагонистік белсенділік көрсетті.

Әдебиеттер:

- 1 Тамим А.И., Робинсон Р.К. Йогурт и другие кисломолочные продукты: научные основы и технологии. СПб: Профессия, 2003. 664 с.
- 2 Alves, R. C. Dias, A. C. DeCastro, L. W. Riely, B. M. Moreira, //J. Clin. Microbiol. 44, - 2006. – p.3640-3646.
- 3 Молочников В.В. Проблемы качества молока-сырья / В.В. Молочников, Т.А. Орлова // Переработка молока. – 2008. – № 9. – С. 16–17.
- 4 Полищук П.К., Дербинова Э.С., Казанцева Н.Н. Лабораторный практикум по микробиологии молока и молочных продуктов.: Легкая и пищевая промышленность – М, 2010. – 200 с.
- 5 Черкасов С.В., Семенов А.В. Микробная регуляция антагонистической активности лактобактерий. Сибирский мед.журнал. 2012. 2: 78-82.
- 6 Черныш А.Ю. Антагонистическое действие пробиотических лактобактерий в отношении патогенных стрептококков различных серологических групп. Автореф. канд. мед.наук. СПб., 2011. 19 с.

М. Б. ЕРДЕНБЕКОВА, С.Д. ЖАНТЛЕСОВА, Ф.К. АЛАЙДАР,
А.Д. МАСИРБАЕВА

ТОО "Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии", Алматы

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПРОТИВ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ
*ESCHERICHIA COLI (E.COLI)***

Аннотация

В современное рыночное время наряду с производством чистых молочных продуктов встречаются производства, производящие продукцию с добавлением в ее состав бесполезных добавок. Поэтому одним из важных вопросов является изучение качественных показателей существующих продуктов в производстве молочных напитков, в том числе, на рынке. Известно, что к качественным определяющим факторам молочных напитков относятся такие показатели, как содержание витаминов, углеводов, белков, жиров и кислотность. Кроме того, проявлением кисломолочными бактериями антагонистических свойств, особенно к штамму *Escherichia coli*, определяет их важную роль в организме.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, кишечная палочка, *Escherichia coli (E.coli)*, антагонистические свойства.

IRSTI: 65.63.03

M.B. YERDENBEKOVA, S.D. ZHANTLESSOVA, F.K. ALAIDAR,
A.D. MASIRBAEVA

LLP «Research and Production Center for Microbiology and Virology», Almaty

**STUDY OF THE ANTAGONISTIC ACTIVITY OF LACTIC ACID
BACTERIA AGAINST *ESCHERICHIA COLI* (*E.COLI*)**

doi: 10.53729/MV-AS.2021.03.03

Summary

In modern market times, along with the production of pure dairy products, there are industries that produce products with the addition of useless additives to its composition. Therefore, one of the important issues is to study the quality indicators of existing products in the production of dairy beverages, including ones on the market. It is known that the qualitative determinants of milk drinks include such indicators as the content of vitamins, carbohydrates, proteins, fats and acidity. Also, the manifestation of antagonistic properties in fermented milk bacteria, especially against *Escherichia coli* strain, determines their important role in the body.

Key words: lactic acid bacteria, *Escherichia coli* (*E. coli*), antagonistic property.

The concentration of lactic acid bacteria in the human body is unstable. Their number and species composition vary depending on external and internal factors (nutrition, medication, environmental pollution, chronic diseases, etc.). In this regard, it is necessary to constantly maintain a sufficient amount of fermented milk microflora. Fermented milk products containing lactobacilli will help to maintain the microflora in the norm. They are called probiotics. Products containing fermented milk bacteria are diverse:

- kefir;
- ryazhenka;
- yogurt;
- curdled milk;
- yeast;
- cidophilic drink, etc.

All these products have a pleasant taste and have a positive effect on digestion in conditions of high milk protein content. In addition to the lactobacilli present in them, manufacturers add special strains to the composition, the useful properties of which have been studied and proven in the course of research. The use of foods containing fermented milk bacteria in childhood contributes to the formation of strong immunity, the normal development of tissues and organs. Children who consume such products are active, attentive, and learn information well [1,4].

The first discoveries in this area belong to the famous Russian-French biologist I.I. Mechnikov. The scientist investigated the possibility of restoring healthy intestinal microflora with lactobacilli. In the course of long and persistent experiments, the dreamers studied the properties of the Bulgarian stick and created a new fermented milk product – yogurt, which at first was called Mechnikov's curdled milk. Ilya Ilyich suggested the positive effect of lactic acid bacteria on human immunity. Despite the "age" of his theory, specific research in this area has been conducted relatively recently. During the experiment, it was found that lactobacilli have pronounced antibacterial properties. They are able to counteract pathogenic microorganisms, reduce the activity of the latter

and destroy harmful bacteria and fungi. Antimicrobial action is carried out with the help of various substances produced during the activity of lactic acid bacteria:

- hydrogen peroxide;
- antibiotics;
- organic acids;
- immune bacteriocins and lactobacilli [5,6].

Study of antagonistic properties of lactic acid microorganisms isolated from them to pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms in order to determine the quality indicators of dairy beverages on the market.

Tasks of the research work:

- isolation of fermented milk microorganisms from milk drinks;
- the antagonistic activity study of lactic acid microorganisms isolated from dairy beverages study against *E.coli*.

Antagonism is one of the main types of symbiotic relationships between organisms, as a result of which one of the participants in the interaction (the antagonist) gets a selective advantage in the struggle for survival due to competitive properties: the product of antibiotic substances, high longitudinal and adaptive capabilities.

The antagonistic activity of the drug against strains of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms is determined by the method of delayed antagonism in a dense environment in the zones of growth retardation of test strains. That is, the activity of lactic acid microorganisms increases their resistance to pathogenic microorganisms [3].

Materials and methods

«FOOD MASTER», «Adal», «Домик в деревне», and «JLC» kefir were taken as the objects of the study. The antagonistic properties of fermented milk bacteria were determined at the Research Institute "Food Safety" of the Almaty Technological University.

The analysis of dairy products for acidity is carried out to determine the freshness and safety. This indicator is very important both in production and in the testing laboratory.

The preparation of fermented milk products is based on the fermentation of milk or cream, the cultivation of pure cultures of lactic acid bacteria, sometimes yeast and acetic acid bacteria are added. Therefore, the determination of the acidity of fermented milk products is one of the indicators of the freshness of the product. All fermented milk and dairy products are determined by Turner. In a flask with a capacity of 100 to 250 cm³, distilled water is packaged and the product in the volume indicated in the first table, three drops of phenolphthalein are instilled. When analyzing cream and fermented milk products, the resulting mixture is pipetted 3-4 times and the product remains are transferred to the flask, then 3 drops of phenolphthalein are added and titrated with constant stirring with an alkali solution until a weak pink color appears, which does not disappear within 1 minute and corresponds to the control indicator of the dye.

For the composite product of milk, to accurately determine the end of titration, a control flask with a sample of 10 cm³ milk and 40 cm³ purified water is placed next to the titrated sample.

Table 1- Volume of products and distilled water

No	Product names	Product volume, cm ³	Volume of distilled water, cm ³
1	Milk, a product containing milk	10	20
2	Dairy products	10	40
3	Sour cream	10	20
4	Sour milk, acidophilus, ayran, koumiss and other lactic acid products	10	20

The acidity of the lactic acid drink is determined by the Turner degrees (T). The amount of alkali spent on titration is multiplied by the volume of the resulting product.

Method for isolating lactic acid bacteria from kefir: before isolating lactic acid bacteria, prepare a nutrient medium for them. Lactic acid bacteria according to GOST 10444.11-89 live in MRS agar medium.

Preparation of the agar MPS nutrient medium: 500 ml of water is measured and poured into a special container. MRS agar powder is weighed on a 34 g electronic laboratory scale (NIP, 200 g) and the powder is placed in shimmering water. The nutrient medium is actively mixed so that it does not boil, and, coming to a jelly-like form, it is poured into a flask. After that, the finished nutrient medium must be neutralized. Turn on the autoclave and warm up. After warming up the autoclave, the nutrient medium is laid, the autoclave is fixed and securely closed. Decontaminate for 15 minutes.

The agar of the MRS from the autoclave was poured 30 ml into petri dishes in a laminar flow box. The nutrient medium freezes for 30 minutes without moving.

Isolation of fermented milk bacteria from kefir: neutralize the laminar flow box (BAWnp-01 - "Laminar-C") and burn an alcohol lamp. In a flask with a capacity of 100-250 ml, 90 ml of physical solution was poured, 10 ml of kefir was extracted through a pipette and added to the physical solution. 3-4 times with the help of the resulting liquid, the remainder of the kefir was washed off on a pipette. Kefir is mixed until completely dissolved. After the MRC, 3-4 drops of liquid are instilled through a pipette that goes out on the agar culture medium. It is completely distributed over the surface of the nutrient medium using a sterile spatula. Petri plates are placed on a thermostat of 37°C (TS-1/80 SPU). The result was obtained in 36-48 hours.

The antagonistic activity depends on the test strain. *E. coli* is grown in the Endo agar culture medium. For the preparation of the nutrient medium "ENDO agar": 500 ml of water is poured out, weighing in a saucepan. Endo agar powder is weighed 21 g with an electronic laboratory scale (NIP, 200 g) and placed in shimmering water at 37°C. The nutrient medium was actively mixed so that it did not boil, and when it became jelly-like, it was poured into a flask.

The autoclave is prepared for operation, the finished nutrient medium is decontaminated in 15 minutes, wrapping the mouth in a cork. When the nutrient medium cools, 30 ml is poured into petri dishes. After solidification, *E. coli* is taken with a hook and drawn with strokes on the surface of the Endo agar.

4 depressions are made on the nutrient medium through a test tube. MRS plants lactic acid bacteria grown in agar culture medium in a groove. Then the nutrient medium is placed in a thermostat at 37°C. Cultivate 24-48 hours and get the results.

Results and discussion

The object of the study is the results of the antagonistic activity of lactic acid microorganisms isolated from kefir «FOOD MASTER», «Adal», «Домик в деревне » and «JLC».



Figure 1. Determination of the antagonistic activity of Kefir «JLC» against *E. coli* strain

As a result, after 48 hours, kefir «JLC» *E. coli* clearly showed antagonistic activity to the strain. The average growth length of colonies, in which lactic acid microorganisms resisted *E. coli*, was 23.75 cm.



Figure 2. Determination of the antagonistic activity of Kefir «Домик в деревне» against *E. coli* strain

As a result, after 48 hours, «Домик в деревне» kefir showed good antagonistic activity of the strain *E. coli*. The average length of colony growth, in which lactic acid microorganisms resisted *Escherichia coli*, was 26.75 cm.



Figure 3. Determination of the antagonistic activity of Kefir «Adal» against *E. coli* strain

As a result, after 48 hours, kefir «Adal» showed antagonistic activity against the strain *E. coli*. Fermented milk microorganisms resist *Escherichia coli* and have an average growth length of grown crops of 25.5 cm.



Figure 4. Determination of the antagonistic activity of Kefir «FOOD MASTER» against *E. coli* strain

As a result, after 48 hours, kefir «FOOD MASTER» showed antagonistic activity against the strain *E. coli*. Fermented milk microorganisms resist *Escherichia coli* and have an average growth length of cultivated cultures of 27.75 cm.

Table 2 - Antagonistic activity of *E.coli* strain of bacteria isolated from milk drinks

Sample number	Culture growth diameter in ENDO nutrient medium, mm			
	«JLC»	«Домик в деревне»	«Adal»	«FOOD MASTER»
1	22	27	26	26
2	26	28	27	28
3	23	25	25	27
4	24	27	24	28
Average number	23,75	26,75	25,5	27,25

According to the results of the study, it was found that the tested products have the ability to threaten *E. coli*.

Conclusion

Proven companies «FOOD MASTER», «Adal», «Домик в деревне», «JLC» kefir occupy a place in the market. The company «FOOD MASTER», «Adal» began production of Kazakh Dormice in the 90s. «Домик в деревне» was opened in the Russian Federation in 1997. «JLC» started milk production in Kazakhstan in 2010. The quality of dairy products, which now occupy the first place in the market, was proved as a result of the study.

During the study of antagonistic activity, it was proved that all tested kefir have an active ability to resist pathogenic microorganisms, demonstrating high antagonistic activity to *E. coli* strain.

References:

- 1 Tamim A.I., Robinson R.K. Jogurt i drugie kislomolochnye produkty: nauchnye osnovy i tehnologii. SPb, Professija, 2003: 664.
- 2 Alves, R. C. Dias, A. C. DeCastro, L. W. Riely, B. M. Moreira. J. Clin. Microbiol, 2006, 44: 3640-3646.
- 3 Molochnikov V.V. Problemy kachestva moloka-syr'ja. V.V. Molochnikov, T.A. Orlova. Pererabotka moloka, 2008, 9: 16–17.
- 4 Polishhuk P.K., Derbinova Je.S., Kazanceva N.N. Laboratornyj praktikum po mikrobiologii moloka i molochnyh produktov.: Legkaja i pishhevaja promyshlennost, M., 2010: 200.
- 5 Cherkasov S.V., Semenov A.V. Mikrobnaja reguljacija antagonisticheskoy aktivnosti laktobakterij. Sibirskij med.zhurnal, 2012, 2: 78-82.
- 6 Chernysh A.Ju. Antagonisticheskoe dejstvie probioticheskikh laktobakterij v otnoshenii patogennyh streptokokkov razlichnyh serologicheskikh grupp. Avtoref. kand. med.nauk. SPb., 2011: 19.

МРНТИ: 62.09.39

О.Н. ШЕМШУРА, Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА, Ж.К. РАХМЕТОВА,
Ж.Н. ШЕМШЕЕВА, Э.Т. ИСМАЙЛОВА

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы

**ИЗУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ МУТАНТНЫХ ШТАММОВ
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ И PGPR БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ В
КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ**
doi: 10.53729/MV-AS.2021.03.04

Аннотация

В статье приведены результаты исследования биосовместимости мутантных штаммов клубеньковых и PGPR бактерий (ризобактерий) с целью их совместного применения для культур маша и фасоли. По результатам проведенных исследований определены штаммы, проявившие контактную прогрессию и нейтралитет - *Pseudomonas putida* M-1 и *Phyllobacterium* sp. 35M; штаммы *Bacillus subtilis* M-2 и *Chryseobacterium rhizoplanae* 1M оказались наиболее перспективными в отношении совместного культивирования. Таким образом, подобраны консорциумы на основе мутантных штаммов азотфиксирующих и ростостимулирующих бактерий *Pseudomonas putida* M-1 и *Chryseobacterium rhizoplanae* для растений маша и *Bacillus subtilis* M-2 и *Phyllobacterium* sp. 35M - для растений фасоли.

Полученные результаты открывают возможность комбинирования мутантных штаммов PGPR с ростостимулирующей активностью (*Pseudomonas putida* M-1, *Bacillus subtilis* M-2) и клубеньковых бактерий (*Phyllobacterium* sp. 35M, *Chryseobacterium rhizoplanae*) с азотфиксирующей активностью с целью получения на их основе биопрепарата с сочетанными свойствами.

Ключевые слова: PGPR бактерии, клубеньковые бактерии, биосовместимость, препарат, маш, фасоль

Использование PGPR бактерий, способных стимулировать рост растений, широко вошло в практику современной агробиотехнологии [1].

Рынок биопрепаратов на основе штаммов PGPR является бурно растущим сегментом мировой экономики и оценивается в более чем один миллиард долларов США с прогнозами десятикратного роста в период до 2025 года [2].

С развитием новейших технологий в сельском хозяйстве одним из популярных направлений является создание комплексных биопрепаратов, состоящих из нескольких различных штаммов микроорганизмов [3-6]. Это направление становится перспективным, поскольку, дополняя друг друга, эти микроорганизмы имеют более эффективное действие по сравнению с монопрепаратами [7].

При создании многокомпонентных сухих препаратов не всегда учитывается биосовместимость и особенно, когда по технологии смешивают уже высушенные монокультуры. В этом случае невозможно прогнозировать поведение культур.

При создании же жидких многокомпонентных препаратов разработчики сталкиваются с проблемой отбора штаммов, испытанных на биосовместимость уже на этапе конструирования препарата. В связи с этим, нами была изучена биосовместимость штаммов PGPR и клубеньковых бактерий для дальнейшей разработки консорциума микроорганизмов.

Для этой цели была поставлена задача изучения биосовместимости штаммов, выделенных из клубеньков сои и маша, и PGPR бактерий. Оценку биосовместимости исследуемых бактерий определяли методом перпендикулярных штрихов и методом лунок.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования явились мутантные штаммы PGPR бактерий *Pseudomonas putida* M-1, *Azotobacte chroococcum* M-1, *Bacillus subtilis* M-1, *Bacillus subtilis* M-2 и клубеньковых бактерий *Chryseobacterium rhizoplanae* 1M и *Phyllobacterium* sp. 35M, полученные в результате мутагенеза с использованием УФ-облучения. В качестве мутагена физической природы применяли ультрафиолетовые лучи длиной волны 260 нм, при которой наблюдается максимум поглощения УФ-света молекулами ДНК.

УФ-мутагенез проводили по методу, описанному KamalaKumari et al. [8]. Единичные колонии PGPR бактерий суспендировали в 3 мл жидкой питательной среды. После этого 0,5 мл каждого образца добавляли к 50 мл жидкой питательной среды и культивировали при температуре 30⁰С (200 об/мин) до тех пор, пока оптическая плотность не достигала 600 ед. Через 6 часов инкубации полученная культуральная жидкость должна соответствовать культуре средней фазы. После этого отбирали 20 мл культуральной жидкости и центрифугировали в течение 10 минут при 1700 об/мин. Осадок ресуспендировали в фосфатном буфере (рН - 7,0), после чего 15 мл суспензии подвергалось воздействию УФ-лучей с использованием УФ лампы (30 Вт) длиной волны 260 нм в течение 30, 45 и 60 минут (расстояние до лампы 10 см). Далее использовали серийные разведения для вычисления процента летальности.

Оценку биосовместимости исследуемых бактерий определяли методом лунок и методом перпендикулярных штрихов [9]. Определение КОЕ бактерий проводилось по методу Коха [10].

Полученные данные обрабатывали методом вариационно-статистического анализа, принимая критерием вероятности $P < 0.05$ [11].

Результаты и обсуждение

Для исследования были взяты мутантные штаммы PGPR бактерий с ростостимулирующей активностью [12] и мутантные штаммы клубеньковых бактерий с азотфиксирующей активностью [13]. Исследование биосовместимости штаммов PGPR и клубеньковых бактерий проводили методом перпендикулярных штрихов, основанном на анализе характера роста колоний бактерий при их совместном росте в чашках Петри, что предполагает совместное культивирование бактериальных штаммов на плотной питательной среде.

Это позволило нам разделить их на 4 группы:

- 1 - контактная регрессия (подавление роста исследуемого штамма подсеваемой культурой);
- 2 – нейтралитет (независимый рост исследуемого и подсеваемого штаммов);
- 3 - контактная прогрессия (стимулирование роста друг друга);
- 4 – антагонизм.

Условием для включения штамма в консорциум было наличие взаимодействия типа «нейтралитет» или «контактная прогрессия». При задержке роста одного штамма культуры принято считать несовместимыми. При условии биосовместимости исследуемых штаммов зоны роста сливаются без образования четких границ.

Определение биосовместимости бактерий показало, что мутантные штаммы PGPR бактерий и клубеньковых бактерий обнаружили контактную регрессию и антагонизм по отношению ко всем исследуемым штаммам клубеньковых бактерий (Таблица 1, рисунок 1).

Таблица 1 - Биосовместимость мутантных штаммов клубеньковых и PGPR бактерий

PGPR бактерии	Клубеньковые бактерии (номера штаммов)					
	3М	19М	25М	35М	45М	1М
<i>Pseudomonas putida M-1</i>	4	4	4	2	1	3
<i>Azotobacter chroococcum M-1</i>	1	4	1	1	1	1
<i>Bacillus subtilis M-1</i>	1	1	1	4	4	4
<i>Bacillus subtilis M-2</i>	1	1	4	3	1	3



а

б

в

а - антагонизм; б - контактная регрессия; в - нейтралитет

Рисунок 1 – Оценка биосовместимости исследуемых культур методом перпендикулярных штрихов

Высокая антагонистическая активность наблюдалась у штамма *Pseudomonas putida M-1* по отношению к штаммам 3М, 19М и 25М и контактная регрессия - к штаммам 45М и 1М. Штамм *Bacillus subtilis M-2* оказался несовместимым со всеми исследуемыми штаммами PGPR бактерий за исключением штамма 1М.

Штаммы, проявившие контактную регрессию и нейтралитет - *Pseudomonas putida M-1* и *Phyllobacterium sp.* 35М; штаммы *Bacillus subtilis M-2* и *Chryseobacterium rhizoplanae* 1М оказались наиболее перспективными в отношении совместного культивирования. Высокая степень биосовместимости этих штаммов, установленная нами в данном опыте, определила целесообразность их использования в составе консорциума для совместного культивирования.

Помимо метода перпендикулярных штрихов, нами проведена оценка биосовместимости мутантных штаммов клубеньковых и PGPR бактерий методом лунок. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 –Антагонистическая активность клубеньковых бактерий в отношении PGPR бактерий

PGPR бактерии	Клубеньковые бактерии					
	3М	19М	25М	45М	35М	1М
зоны подавления роста, мм						
<i>Pseudomonas putida M-1</i>	19,3±2,1	14,6±2,0	20,6±3,2	8,0±1,7	0	0
<i>Bacillus subtilis M-1</i>	0	0	0	12,3±2,1	16,0±1,0	14,3±4,0
<i>Azotobacter chroococcum M-1</i>	0	11,0±1,7	0	0	0	0

Для этой цели на свежесеянном газоне PGPR бактерий вырезали лунки диаметром 7 мм. В лунки вносили культуральную жидкость исследуемого штамма клубеньковых бактерий, после чего чашки Петри помещали в термостат при 28°C на 24 часа. По истечении этого времени измеряли зону ингибирования роста PGPR бактерий вокруг лунок. Так, на рисунке 2 показаны зоны подавления роста *Bacillus subtilis M-1* и *Pseudomonas putida M-1* штаммом *Phyllobacterium sp. 45M*.

Как видно из представленных в таблице 2 данных, рост *Pseudomonas putida M-1* практически полностью подавлялся мутантными штаммами клубеньковых бактерий *Agrobacterium tumefaciens* 3М, и *Phyllobacterium sp. 19M*, 25М и 45М (зоны подавления роста для них варьировали в пределах 8-20 мм).

Сравнительно высокие зоны задержки роста также продемонстрировали штаммы *Phyllobacterium sp. 35M*, 45М и *Chryseobacterium rhizoplanae* 1М по отношению к *Bacillus subtilis M-1* (12-16 мм), а штаммы *Agrobacterium tumefaciens* 3М, *Phyllobacterium sp. 19M*, 35М, 45М и *Chryseobacterium rhizoplanae* 1М не ингибировали рост *Bacillus subtilis M-2*, что говорит о совместимости данных культур. Более того, все исследуемые мутантные штаммы *Agrobacterium tumefaciens* 3М, *Phyllobacterium sp. 25M*, 35М, 45М и *Chryseobacterium rhizoplanae* 1М не подавляли рост культуры *Azotobacter chroococcum M-1*, что также говорит об их совместимости.

*Bacillus subtilis M-1**Pseudomonas putida M-1*

Рисунок 2 - Оценка биосовместимости исследуемых культур методом лунок (зоны подавления роста)

Таким образом, по результатам проведенных двумя методами исследований определены следующие консорциумы на основе мутантных штаммов азотфиксирующих и ростостимулирующих бактерий:

- *Pseudomonas putida* M-1 и *Chryseobacterium rhizoplanae* 1M (для маша);
- *Bacillus subtilis* M-2 и *Phyllobacterium* sp. 35M (для фасоли).

Полученные результаты открывают возможность комбинирования мутантных штаммов PGPR бактерий с ростостимулирующей активностью и клубеньковых бактерий с азотфиксирующей активностью с целью получения на их основе биопрепарата с сочетанными свойствами.

Литература:

- 1 Минаева О.М., Акимова Е.Е., Зюбанова Т.И., Терещенко Н.Н. Биопрепараты для защиты растений: оценка качества и эффективности. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2018. – 130 с.
- 2 Lokko, Y. Biotechnology and the bioeconomy – Towards inclusive and sustainable industrial development / Y. Lokko, M. Heijde, K. Schebesta, P. Scholtès, M. Van Montagu, M. Giacca // New biotechnology. – 2017.
- 3 Choong-Min Ryu Promoting Plant Protection by Root-Associated Microbes//Plant Pathol. J.- 2013. - Vol.29(2).- P.123-124.
- 3 Lily PeregMary, McMillan Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems// Soil Biology & Biochemistry 80.- 2015.- P.349-358.
- 4 Rifat Hayat, Safdar Ali, Ummay Amara, Rabia Khalid, Iftikhar Ahmed. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review// Ann Microbiol. -2010. –N. 60. – P.579–598.
- 5 Бурыйгин Г.Л. Физиолого-биохимические основы защиты растений ризосферными бактериями// Современные подходы и методы в защите растений, Екатеринбург, 12–14 ноября 2018 г. – С.10-11.
- 6 Муродова С.С., Давранов К.Д. Комплексные микробные препараты. Применение в сельскохозяйственной практике// Biotechnologia Acta. – 2014. – No 6. – P.92-101.
- 7 KamalaKumari P. V., Sankar G. G., Prabhakar T. Strain improvement studies for the production of L-asparaginase by *Beauveria bassiana* SS18/41 // International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. – 2015. – Vol. 31(2). – P. 173-176.
- 8 Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: учебник / под ред. Н.С. Егорова. – Изд. 6-е, перер. и доп. – М.:МГУ, 2004. – 528 с.
- 9 Перт С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. - М.: Мир, 1978. - 231 с.
- 10 Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер.с англ. – М.: Практика. – 1998. – 459 с.
- 11 Шемшура О.Н., Сулейменова Ж.Б., Рахметова Ж.К., Шемшеева Ж.Н., Момбекова Г.А. Влияние состава питательной среды на ростостимулирующую активность мутантных штаммов PGPR бактерий// Микробиология және вирусология. – 2019. - №3(26). – С.11-19.
- 12 Шемшура О.Н., Сулейменова Ж.Б., Алимжанова М.Б., Рахметова Ж.К., Шемшеева Ж.Н., Момбекова Г.А. Подбор оптимальных питательных сред для культивирования мутантных штаммов азотфиксирующих бактерий// Микробиология және вирусология. – 2020. - №1(28). – С.72-81.

О.Н. ШЕМШУРА, Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА, Ж.К. РАХМЕТОВА,
Ж.Н. ШЕМШЕЕВА, Э.Т. ИСМАИЛОВА

ЖШС «Микробиология және вирусология ғылыми – өндірістік орталығы, Алматы

МИКРОБТЫҚ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ НЕГІЗІ БОЛЫП ТАБЫЛАТЫН ТҮЙНЕК БАКТЕРИЯЛАРЫ МЕН PGPR БАКТЕРИЯЛАРЫНЫҢ МУТАНТТЫ ШТАМДАРЫНЫҢ БИОСӘЙКЕСТІГІН ЗЕРТТЕУ

Түйін

Мақалада түйнек бактериялары мен PGPR бактерияларының мутантты штамдарын мәш пен бұршақ дақылдары үшін бірге қолдану мақсатында, олардың биосәйкестігі зерттеулері нәтижелері берілген. Зерттеу нәтижелері бойынша контактілі прогрессия мен бейтараптықты көрсеткен штамдар анықталды - *Pseudomonas putida* M -1 және *Phyllobacterium* sp. 35M;

Bacillus subtilis M-2 және *Chryseobacterium rhizoplanae* 1M штамдары бірлесіп өсіру үшін ең перспективті екендігі анықталды. Осылайша, азотфикациялаушы және өсуді стимулдеуші бактериялары мутантты штамдары негізінде консорциумдар іріктеліп алынды: мәш өсімдігі үшін *Pseudomonas putida* M-1 және *Chryseobacterium rhizoplanae*, бұршақ өсімдігі үшін *Bacillus subtilis* M-2 және *Phyllobacterium* sp. 35M.

Алынған нәтижелер мутантты PGPR штамдарын өсуді стимулдейтін белсенділікпен (*Pseudomonas putida* M-1, *Bacillus subtilis* M-2) және түйнек бактерияларын (*Phyllobacterium* sp. 35M, *Chryseobacterium rhizoplanae*) азотфикациялау белсенділігімен біріктіру мүмкіндігін ашады, олардың негізінде аралас қасиеттерге ие биопрепараттар алу мақсаты жүзеге асады.

Кілтті сөздер: PGPR бактериялары, түйнек бактериялары, биосәйкестік, препарат, мәш, бұршақ.

IRSTI: 62.09.39

O.N. SHEMSHURA, ZH.B. SULEIMENOVA, ZH.K. RAKHMETOVA,
ZH. N. SHEMSHEYEVA, E.T. ISMAILOVA

LLP “Research and Production Center for Microbiology and Virology”, Almaty

STUDY OF THE BIOCOMPATIBILITY OF MUTANT STRAINS OF ROOT NODULE AND PGPR BACTERIA, PROMISING AS A BASIS OF MICROBIAL PREPARATIONS

doi: 10.53729/MV-AS.2021.03.04

Summary

The article presents the results of a study of the biocompatibility of mutant strains of nodule and PGPR bacteria with the aim of their combined use for mung bean and beans. According to the results of the studies, the strains that showed contact progression and neutrality were identified - *Pseudomonas putida* M-1 and *Phyllobacterium* sp. 35M; strains *Bacillus subtilis* M-2 and *Chryseobacterium rhizoplanae* 1M proved to be the most promising for co-cultivation. Thus, consortia were selected based on mutant strains of nitrogen-fixing and growth-stimulating bacteria *Pseudomonas putida* M-1 and *Chryseobacterium rhizoplanae* for mung bean and *Bacillus subtilis* M-2 and *Phyllobacterium* sp. 35M for bean plants.

The results obtained open up the possibility of combining mutant PGPR strains with growth-stimulating activity (*Pseudomonas putida* M-1, *Bacillus subtilis* M-2) and nodule bacteria with nitrogen-fixing activity (*Phyllobacterium* sp. 35M, *Chryseobacterium rhizoplanae*) in order to obtain a biological product with combined properties on their basis.

Key words: PGPR bacteria, root nodule bacteria, biocompatibility, drug, mung bean, beans

The use of PGPR bacteria capable of stimulating plant growth has become widely practiced in modern agrobiotechnology [1].

The market for biologics based on PGPR strains is a rapidly growing segment of the global economy and is estimated at more than one billion US dollars with projections of tenfold growth in the period up to 2025 [2].

With the development of the latest technologies in agriculture, one of the popular directions is the creation of complex biological products, consisting of several different strains of microorganisms [3-6]. This direction is becoming promising, since, complementing each other, these microorganisms have a more effective effect in comparison with monopreparations [7].

When creating multicomponent dry preparations, biocompatibility is not always taken into account, and especially when already dried mono-cultures are mixed using technology. In this case, it is impossible to predict the behavior of crops.

When creating liquid multicomponent drugs, developers are faced with the problem of selecting strains that have been tested for biocompatibility already at the stage of drug design. In this regard, we studied the biocompatibility of PGPR strains and nodule bacteria for the further development of a consortium of microorganisms.

For this purpose, the task was set to study the biocompatibility of strains isolated from soybean and mung bean nodules and PGPR bacteria. The assessment of the biocompatibility of the bacteria under study was determined by the method of perpendicular streaks and the method of holes.

Materials and methods

The objects of the study were mutant PGPR strains of bacteria *Pseudomonas putida* M-1, *Azotobacte chroococcum* M-1, *Basillus subtilis* M-1, *Basillus subtilis* M-2, and nodule bacteria *Chryseobacterium rhizoplanae* 1M and *Phyllobacterium* sp. 35M obtained by mutagenesis using UV irradiation. Ultraviolet rays with a wavelength of 260 nm were used as a mutagen of physical nature, at which the maximum absorption of UV light by DNA molecules is observed.

UV mutagenesis was performed according to the method described by KamalaKumari et al. [eight]. Single colonies of PGPR bacteria were suspended in 3 ml of liquid culture medium. After that, 0.5 ml of each sample was added to 50 ml of liquid nutrient medium and cultured at a temperature of 30°C (200 rpm) until the optical density reached 600 units. After 6 hours of incubation, the resulting culture fluid should correspond to the culture of the middle phase. After that, 20 ml of the culture liquid was taken and centrifuged for 10 minutes at 1700 rpm. The precipitate was resuspended in phosphate buffer (pH - 7.0), after which 15 ml of the suspension was exposed to UV rays using a UV lamp (30 W) with a wavelength of 260 nm for 30, 45 and 60 minutes (distance to the lamp 10 cm) ... Next, serial dilutions were used to calculate the percentage of lethality.

Evaluation of the biocompatibility of the bacteria under study was determined by the method of holes and the method of perpendicular strokes [9]. Determination of CFU of bacteria was carried out according to the Koch method [10].

The data obtained were processed by the method of statistical variation analysis, taking the probability criterion $P < 0.05$ [11].

Results and discussion

For the study, we took mutant strains of PGPR bacteria with growth-stimulating activity [12] and mutant strains of nodule bacteria with nitrogen-fixing activity [13]. The study of the biocompatibility of PGPR strains and nodule bacteria was carried out by the method of perpendicular strokes, based on the analysis of the nature of the growth of bacterial colonies during their joint growth in Petri dishes, assumes the joint cultivation of bacterial strains on a solid nutrient medium.

This allowed us to divide them into 4 groups:

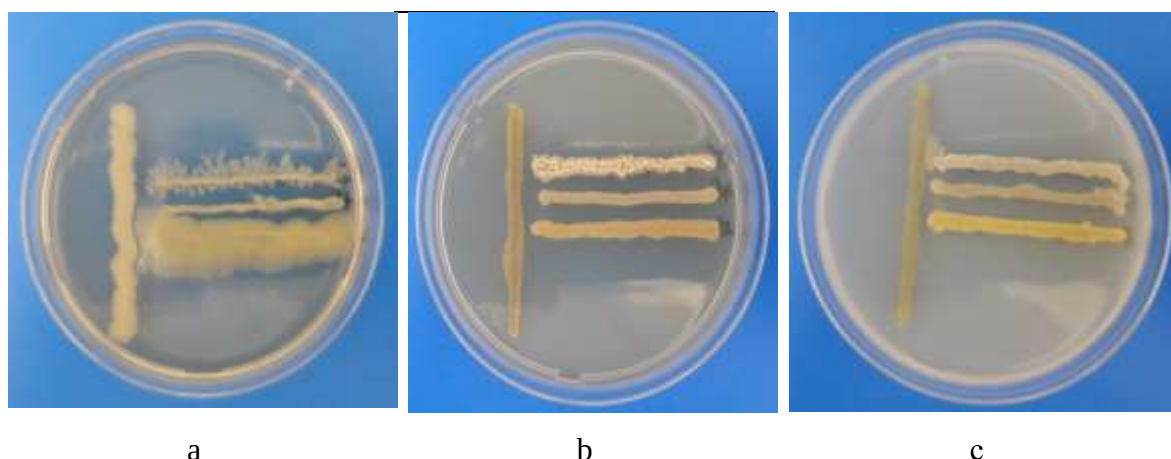
- 1 - contact regression (suppression of the growth of the studied strain by the sown crop);
- 2 - neutrality (independent growth of the studied and sown strains);
- 3 - contact progression (stimulating each other's growth);
- 4 - antagonism.

The condition for the inclusion of the strain in the consortium was the presence of an interaction of the "neutrality" or "contact progression" type. With a growth retardation of one strain, cultures are considered to be incompatible. Under the condition of biocompatibility of the studied strains, the growth zones merge without the formation of clear boundaries.

Determination of bacterial biocompatibility showed that mutant strains of PGPR bacteria and nodule bacteria showed contact regression and antagonism with respect to all studied strains of nodule bacteria (Table 1, Figure 1).

Table 1 - Biocompatibility of mutant strains of nodule and PGPR bacteria

PGPR bacteria	Nodule bacteria (strain numbers)					
	3M	19M	25M	35M	45M	1M
<i>Pseudomonas putida M-1</i>	4	4	4	2	1	3
<i>Azotobacter chroococcum M-1</i>	1	4	1	1	1	1
<i>Bacillus subtilis M-1</i>	1	1	1	4	4	4
<i>Bacillus subtilis M-2</i>	1	1	4	3	1	3



a - antagonism; b - contact regression; c - neutrality

Figure 1 - Assessment of the biocompatibility of the studied cultures by the method perpendicular strokes

High antagonistic activity was observed in the *Pseudomonas putida* M-1 strain in relation to strains 3M, 19M and 25M and contact regression to strains 45M and 1M. The *Bacillus subtilis* M-2 strain turned out to be incompatible with all the studied PGPR bacterial strains, with the exception of the 1M strain.

The strains showing contact progression and neutrality are *Pseudomonas putida* M-1 and *Phyllobacterium* sp. 35M; strains *Bacillus subtilis* M-2 and *Chryseobacterium rhizoplanae* 1M proved to be the most promising for co-cultivation. The high degree of biocompatibility of these strains, established by us in this experiment, determined the expediency of their use as part of a consortium for joint cultivation.

In addition to the method of perpendicular strokes, we evaluated the biocompatibility of mutant strains of nodule and PGPR bacteria using the well method. The results are shown in Table 2.

Table 2 - Antagonistic activity of nodule bacteria against PGPR bacteria

PGPR bacteria	Nodule bacteria					
	3M	19M	25M	45M	35M	1M
growth inhibition zones, mm						
<i>Pseudomonas putida</i> M-1	19.3 ± 2.1	14.6 ± 2.0	20.6 ± 3.2	8.0 ± 1.7	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> M-1	0	0	0	12.3 ± 2.1	16.0 ± 1.0	14.3 ± 4.0
<i>Bacillus subtilis</i> M-2	0	0	11.3 ± 2.3	0	0	0
<i>Azotobacter Chroococcum</i> M-1	0	11.0 ± 1.7	0	0	0	0

For this purpose, 7 mm wells were cut out on a freshly seeded PGPR lawn of bacteria. The culture fluid of the studied strain of nodule bacteria was introduced into the wells, after which the dishes were placed in a thermostat at 28 ° C for 24 hours. After this time, the zone of inhibition of growth of PGPR bacteria around the wells was measured.

Thus, Figure 2 shows the zones of inhibition of the growth of *Bacillus subtilis* M-1 and *Pseudomonas putida* M-1 by the *Phyllobacterium* sp. 45M.

As can be seen from the data presented in Table 2, the growth of *Pseudomonas putida* M-1 was almost completely inhibited by mutant strains of nodule bacteria *Agrobacterium tumefaciens* 3M, and *Phyllobacterium* sp. 19M, 25M and 45M (the growth inhibition zones for them varied within 8-20 mm).

Strains of *Phyllobacterium* sp. 35M, 45M and *Chryseobacterium rhizoplaneae* 1M in relation to *Bacillus subtilis* M-1 (12-16 mm), and strains of *Agrobacterium tumefaciens* 3M, *Phyllobacterium* sp. 19M, 35M, 45M and *Chryseobacterium rhizoplaneae* 1M did not inhibit the growth of *Bacillus subtilis* M-2, which indicates the compatibility of these cultures. Moreover, all studied mutant strains of *Agrobacterium tumefaciens* 3M, *Phyllobacterium* sp. 25M, 35M, 45M and *Chryseobacterium rhizoplaneae* 1M did not suppress the growth of the *Azotobacter chroococcum* M-1 culture, which also indicates their compatibility.

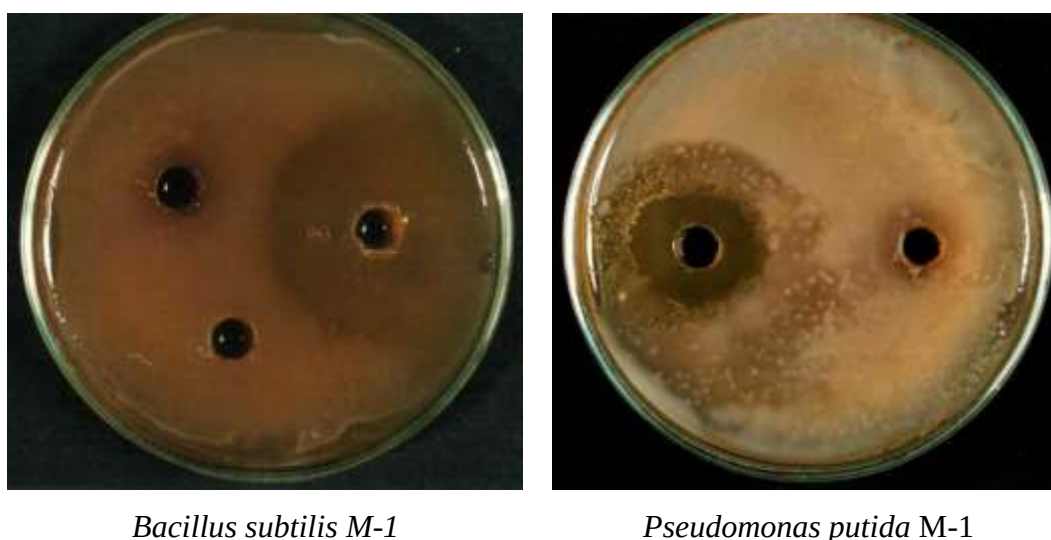


Figure 2 - Evaluation of the biocompatibility of the studied cultures by the method of wells (growth inhibition zones)

Thus, according to the results of the studies carried out by two methods, the following consortia were identified based on mutant strains of nitrogen-fixing and growth-stimulating bacteria:

- *Pseudomonas putida* M-1 and *Chryseobacterium rhizoplaneae* 1M (for mung bean);
- *Bacillus subtilis* M-2 and *Phyllobacterium* sp. 35M (for beans).

The results obtained open up the possibility of combining mutant PGPR strains with growth-stimulating activity and nodule bacteria with nitrogen-fixing activity in order to obtain a biological product with combined properties on their basis.

References:

- 1 Minaeva O.M., Akimova E.E., Ziubanova T.I., Tereshchenko N.N. Biopreparaty dlia zashchity rastenii: otsenka kachestva i effektivnosti. Tomsk: Izdatel'skii Dom Tomskogo gosudarstvennogo universiteta, 2018: 130.
- 2 Lokko, Y. Biotechnology and the bioeconomy – Towards inclusive and sustainable industrial development: Y. Lokko, M. Heijde, K. Schebesta, P. Scholtès, M. Van Montagu, M. Giacca. New biotechnology, 2017.

3 Choong-Min Ryu Promoting Plant Protection by Root-Associated Microbes. *Plant Pathol. J.*, 2013, Vol.29(2): 123-124.

4 Lily PeregMary, McMillan Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biology & Biochemistry* 80, 2015: 349-358.

5 Rifat Hayat, Safdar Ali, Ummay Amara, Rabia Khalid, Iftikhar Ahmed. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol*, 2010, 60: 579–598.

6 Burygin G.L. Fiziologo-biokhimicheskie osnovy zashchity rastenii rizofernymi bakteriyami. *Sovremennye podkhody i metody v zashchite rastenii*. Ekaterinburg, 2018: 10-11.

7 Murodova S.S., Davranov K.D. Kompleksnye mikrobnye preparaty. *Primenenie v sel'skokhoziaistvennoi praktike*. *Biotechnologia Acta*, 2014, 6: 92-101.

8 KamalaKumari P. V., Sankar G. G., Prabhakar T. Strain improvement studies for the production of L-asparaginase by *Beauveria bassiana* SS18/41. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2015, Vol. 31(2): 173-176.

9 Egorov N.S. Osnovy ucheniia ob antibiotikakh: uchebnyk / pod red. N.S. Egorova. Izd. 6-e, perer. i dop. M.:MGU, 2004: 528.

10 Pert S. Osnovy kul'tivirovaniia mikroorganizmov i kletok. M.: Mir, 1978: 231.

11 Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika / per.s angl. M.: Praktika, 1998: 459.

12 Shemshura O.N., Suleimenova Zh.B., Rakhmetova Zh.K., Shemsheeva Zh.N., Mombekova G.A. Vliianie sostava pitatel'noi sredy na rostostimuliruiushchuiu aktivnost' mutantnykh shtamov PGPR bakterii. *Mikrobiologiya zhane virusologiya*, 2019, 3(26): 11-19.

13 Shemshura O.N., Suleimenova Zh.B., Alimzhanova M.B., Rakhmetova Zh.K., Shemsheeva Zh.N., Mombekova G.A. Podbor optimal'nykh pitatel'nykh sred dlia kul'tivirovaniia mutantnykh shtamov azotfiksiruiushchikh bakterii. *Mikrobiologiya zhane virusologiya*, 2020, №1(28): 72-81.

ПРАВИЛА
издания журнала
«МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ»

Журнал публикует статьи фундаментального и прикладного характера. Материалы должны отражать результаты научных исследований и практических достижений в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии.

Плата за публикацию статей не взимается.

Представленные для опубликования материалы должны удовлетворять следующим требованиям:

Содержать результаты оригинальных научных исследований по актуальным проблемам в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии, ранее не опубликованные и не предназначенные к публикации в других изданиях.

Все статьи принимаются и публикуются одновременно на двух языках (казахском и английском, или русском и английском).

Статьи принимаются в электронном виде через профиль автора на сайте imv-journal.kz.

При невыполнении формальных требований, статья к публикации не принимается.

Статьи поступившие в редакцию журнала могут быть проверены с помощью системы Антиплагиат. В случае, если результат проверки выявляет некорректно оформленные заимствования, статья может быть отклонена.

При выполнении формальных требований, статья направляется на рассмотрение членам редколлегии, имеющим ученую степень в научной области, соответствующей содержанию статьи. При этом редакция определяет соответствие статьи профилю журнала, требованиям к оформлению. При соответствии вышеуказанным требованиям направляет ее на рецензирование стороннему специалисту, обладающему высокими профессиональными знаниями и опытом работы по конкретному научному направлению, имеющему ученую степень PhD, доктора или кандидата наук.

К рецензированию не привлекаются специалисты, работающие в одном отделе или департаменте учреждения, где выполнена работа. Рецензент выносит решение о возможности опубликования

Окончательное решение о целесообразности публикации принимается Редакционной коллегией в соответствии с рекомендациями рецензентов.

После принятия Редакционной коллегией решения о допуске статьи к публикации ответственный редактор журнала информирует об этом автора и указывает сроки публикации.

1. Электронное письмо должно содержать:

– Материалы статьи (файлу со статьей присваивается имя по фамилии первого автора).

– Сведения об авторах (фамилия, имя, отчество, ученая степень, звание, должность, место работы, контактные телефоны, электронные адреса (e-mail), идентификационный номер (ORCID)).

– Отсканированное сопроводительное письмо.

– Отсканированное экспертное заключение о возможности публикации материалов в открытой печати.

2. Статья должна содержать:

- МРНТИ – межгосударственный рубрикатор научно-технической информации
- Фамилии авторов статьи (прописными буквами, инициалы следуют перед фамилией);
- Название организации, в которой была выполнена работа и город (строчными буквами);
- Название статьи (прописными буквами полужирным шрифтом);
- Аннотация (в начале статьи перед основным текстом);
- Ключевые слова (не более 7);
- Введение (без заголовка), в котором кратко излагается актуальность и новизна рассматриваемого вопроса;
- Основной текст (включает материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, содержащее краткое изложение основных результатов работы);
- Список литературы (оформляется с указанием фамилии и инициалов автора, полного названия книги (статьи), места издания, названия журнала (года, тома, номера, страницы).

3. Размер одной статьи не должен превышать 5-7 машинописных страниц (статьи обзорного характера – до 15 стр.), включая аннотацию, таблицы, рисунки, список литературы. В том же файле следует представлять резюме на трех языках (казахском, русском и английском).

4. Статья должна быть набрана на компьютере в редакторе Word 2003, шрифтом Times New Roman 12 пт, с пробелом между строк 1 компьютерный интервал, поля – верхнее и нижнее 2 см, левое 3 см, правое 1,5 см. Количество рисунков – не более пяти. Аннотация, таблицы, рисунки, список литературы – 11 пт через 1 компьютерный интервал. Ссылки на литературные источники даются цифрами в прямых скобках по мере упоминания и должны быть идентичными на двух языках. Необходимо тщательно следить за точным соответствием обозначений в тексте и на таблицах, рисунках и др. При изложении экспериментального материала должна быть использована международная система единиц (СИ).

5. После статьи на английском языке приводится список литературы в романском алфавите (References) для SCOPUS и других БАЗ ДАННЫХ полностью отдельным блоком, повторяя список литературы к русскоязычной части, независимо от того, имеются или нет в нем иностранные источники. Если в списке есть ссылки на иностранные публикации, они полностью повторяются в списке, готовящемся в романском алфавите (латиница).

В References не используются разделительные знаки («//» и «—»). Название источника и выходные данные отделяются от авторов типом шрифта, чаще всего курсивом, точкой или запятой.

На сайте <http://www.translit.ru/> можно бесплатно воспользоваться программой транслитерации русского текста в латиницу, используя различные системы. Программа очень простая, ее легко использовать для готовых ссылок. К примеру, выбрав вариант системы Библиотеки Конгресса США (LC), получаем изображение всех буквенных соответствий. Вставляем в специальное поле весь текст библиографии на русском языке и нажимаем кнопку «в транслит».

6. Статьи, не соответствующие Правилам, не публикуются и не возвращаются автору. Редакция оставляет за собой право производить сокращения и правки статей.

