



**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИЦЕЛИЯ КСИЛОТРОФНОГО МАКРОМИЦЕТА
FLAMMULINA VELUTIPES С АЗОСПИРИЛЛАМИ**

Цивилева О.М., Шатерников А.Н., Никитина В.Е.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук,
Россия, 410049, Саратов, проспект Энтузиастов 13, E-mail: tsivileva@ibppm.ru

Резюме

Исследования экологически чистых биологических способов стимуляции роста мицелия лекарственных и съедобных грибов способствуют развитию научных основ и улучшению технологии выращивания. В данной работе поставлена цель охарактеризовать эффект бактерий рода *Azospirillum*, известных своими фитостимулирующими свойствами, в отношении ростовых показателей ксилотрофного базидиомицета *Flammulina velutipes* в условиях двойных бактериально-грибных культур. Выявлена возможность и подобраны условия совместного погруженного культивирования зимнего гриба *F. velutipes* с эндофитным и эпифитным штаммами *Azospirillum brasilense*. Изучали ростовые показатели ко-культур в зависимости от состава среды; характеристик инокулюма, штамма бактерий. В оптимизированных условиях жидких ко-культур азоспириллы изученных штаммов проявляли активную подвижность и находились в плотном контакте с гифами грибов. Концентрация клеток бактериальных штаммов при прочих равных условиях эксперимента оказывала существенное влияние на рост бинарных культур. Выращивание *F. velutipes* совместно с *A. brasilense* Sp245 при оптимальной концентрации бактериальных клеток в инокулюме позволило получить величину сухой биомассы 235% относительно контроля. Активному росту смешанной культуры грибов с изучаемыми штаммами азоспирилл благоприятствовала среда на основе Glc и Fru в массовом соотношении 1 : 1 и Asp. Полученные данные позволяют судить о высоком потенциале применения бинарных бактериально-грибных культур для эффективного получения мицелиальной биомассы базидиомицета.

Ключевые слова: высшие грибы, базидиомицеты, *Flammulina*, PGPR; *Azospirillum*; со-культура; погруженное культивирование

Цитирование: Цивилева О.М., Шатерников А.Н., Никитина В.Е. Культивирование мицелия ксилотрофного макромицета *Flammulina velutipes* с азоспириллами // Биомика. 2020. Т.12(2). С. 232-241. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-14

© Авторы

**CULTURE OF XYLOTROPHIC MACROMYCETE
FLAMMULINA VELUTIPES MYCELIUM WITH AZOSPIRILLA**

Tsivileva O.M., Shaternikov A.N., Nikitina V.E.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms of the Russian Academy of Sciences,
13 Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, E-mail: tsivileva@ibppm.ru

Resume

Research of the environmentally safe biological methods of stimulating the growth of medicinal and edible mushrooms assists the development of scientific foundations of culture technologies. This work poses a task of characterizing the effect of bacteria from the *Azospirillum* genus, which are known by their phyto-

stimulating properties, upon the growth parameters of xylophilic basidiomycete *Flammulina velutipes* under the conditions of dual fungal-bacterial cultures. The possibility of submerged co-cultivation of the winter mushroom *F. velutipes* with the endophytic and epiphytic strains of *Azospirillum brasilense* was demonstrated, and optimal conditions for the co-cultivation were selected. Mycelial development in joint cultures was explored in dependence of media composition; inoculum characteristics, and bacterial strain. Under the conditions of liquid co-cultures optimized by both the medium composition and the bacterial inoculum concentration, the azospirilla strains under study had active mobility and formed clusters near fungal hyphae. The concentration of bacterial cells had a significant effect on the growth of binary cultures. Co-cultivation of *F. velutipes* with *A. brasilense* Sp245 at the optimal concentration (0.5%, v/v) of bacterial cells in the inoculum ($A_{600} = 1$) allowed to obtain the dry-biomass value of 2.35 times higher relative to the control. The intensive growth of a mixed culture of mushrooms with azospirillum under study was promoted by the medium based on Glc and Fru (in mass proportion 1 : 1), and Asn. The data gained are indicative of the great potentialities of binary mushroom-bacterial cultures application for obtaining efficiently the mycelial biomass of basidiomycete.

Keywords: mushrooms, basidiomycetes, *Flammulina*, PGPR, *Azospirillum*, co-culture, submerged culture

Citation: Tsivileva O.M., Shaternikov A.N., Nikitina V.E. Culture of xylophilic macromycete *Flammulina velutipes* mycelium with azospirilla. *Biomics*. 2020. V. 12(2). P. 232-241. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs. 2020-14 (In Russian)

© The Authors

Введение

Мир высших грибов очень разнообразен с точки зрения практического использования, но многовековой опыт некоторых стран по культивированию грибных культур четко ориентирует на промышленное производство ряда наиболее ценных в этом плане базидиомицетов. Представители этого класса высших грибов интересуют битехнологов не только в качестве источника ценных пищевых ингредиентов [Su et al., 2019; Nie et al., 2019], но и как основа для получения высокоэффективных лекарственных препаратов [Huang et al., 2019]. Достаточно давно проводятся оказавшиеся перспективными биомедицинские исследования субстанций из ксилотрофных грибов – представителей рода *Flammulina* [Wasser, 2002], в особенности из опенка зимнего, зимнего гриба *Flammulina velutipes* (Curtis, 1777; Fries, 1821) Singer, 1951). Иммуномодуляторы, выделенные из фламмулины, еще в конце XX века показали антираковое действие на животных [Wasser, Weis, 1999; 1999a], тогда же была обнаружена противоопухолевая активность *F. velutipes* [Mizuno, 1995]. Иммуномодулирующий белок фламмулин с общепринятой аббревиатурой Fve [Jong, Donovan, 1989], выделенный из *F. velutipes*, – полипептид, нековалентно-связанный гомодимер [Seow et al., 2003]. Считается, что этот белок с лектиновой активностью является триггером митогенной пролиферации Т-лимфоцитов и Th1 цитокиновой продукции, супрессором системных анафилактических реакций [Paaventhana et al., 2003].

До настоящего времени продолжают научные изыскания в интересах создания препаратов ветеринарного и медицинского назначения из этого гриба [Mahfuz et al., 2019; Zhao et al., 2019].

Поэтому остаются актуальными исследования возможной оптимизации искусственного культивирования фламмулины. Биологические способы стимуляции роста мицелия позволили бы улучшить технологию выращивания, сократив время культивирования грибов и одновременно подавив рост контаминирующей микрофлоры. Одним из таких способов может стать выращивание базидиомицета в двойной культуре со стимулирующими рост бактериями, например, представителями условной несистематической группы «Plant growth promoting rhizobacteria» (PGPR), то есть ризобактериями, способствующими росту растений [Kumar et al., 2019; Goswami, Deka, 2020]. Бактерии рода *Azospirillum* – PGPR, грамотрицательные микроаэрофильные бактерии вступают в ассоциации со многими растениями, в том числе и из умеренных климатических зон, и хорошо известны своими фитостимулирующими свойствами [Fukami et al., 2018].

Важно выявление и исследование ростостимулирующих свойств разных штаммов азоспирилл в отношении съедобных и/или лекарственных высших грибов-ксилотрофов. Системное изучение совместного культивирования базидиомицетов с бактериями рода *Azospirillum* в искусственных условиях в литературе не было описано до начала исследований в лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН в связи с двойной

культурой *Lentinula edodes* с *Azospirillum brasilense* Sp7 [Никитина и др. (Nikitina et al.), 2006; Tsivileva et al., 2010]. Было изучено влияние *A. brasilense* Sp7 на рост и морфологические особенности *L. edodes* F-249 [Лощинина и др. (Loshchinina et al.), 2012], однако причины активизации развития мицелия оставались не выявлены. Было проведено также исследование влияния эпифитного штамма азоспирилл в отношении плодоношения макромицета вешенки устричной [Цивилева и др. (Tsivileva et al.), 2020].

Цель работы состояла в выявлении и характеристике действия бактерий *Azospirillum brasilense* на ростовые показатели ксилотрофного базидиомицета *Flammulina velutipes* в условиях двойных бактериально-грибных культур.

Материалы и методы

Объектами исследования служили: базидиомицет *Flammulina velutipes* 0535 (коллекция кафедры микологии и альгологии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (г. Москва)), бактерии *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* SR80 (Специализированная научная коллекция ИБФРМ РАН (WFCC номер 975, WDCM номер 1021) (СМ ИВРРМ)). Культуры гриба поддерживали на агаризованном пивном сусле (4 град по Баллингу) в темноте, бактерий – на питательных средах, рекомендуемых СМ ИВРРМ.

Для выращивания культур использовали среды состава, описанного в табл. 1. Плотные среды получали, добавляя в питательные растворы 1,8–2% (*m/v*) агара.

Таблица 1

Состав сред со-культивирования *Flammulina velutipes* и *Azospirillum brasilense*
Table 1 - Composition of media for co-culture of *Flammulina velutipes* with *Azospirillum brasilense*

Условное обозначение Lab. code	Состав, г/л Composition, g/L
(I)	Сусло пивное 1,2 град по Баллингу
(II)	<i>D</i> -глюкоза – 9,0; <i>L</i> -аспарагин – 1,5
(III)	<i>D</i> -глюкоза – 4,5; <i>D</i> -фруктоза – 4,5; <i>L</i> -аспарагин – 1,5
(IV)	<i>D</i> -глюкоза – 9,0; <i>L</i> -аспарагин – 1,5; KH_2PO_4 – 1; K_2HPO_4 – 1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0,002; Fe(III)-нитрилотриацетат (НТА) – 0,03; CaCl_2 – 0,02; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 0,1; NH_4Cl – 1
(V)	<i>D</i> -глюкоза – 4,5; <i>D</i> -фруктоза – 4,5; <i>L</i> -аспарагин – 1,5; KH_2PO_4 – 1; K_2HPO_4 – 1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0,002; Fe(III)-нитрилотриацетат (НТА) – 0,03; CaCl_2 – 0,02; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 0,1; NH_4Cl – 1
(VI)	яблочная кислота – 3,76; дрожжевой экстракт – 0,1; KH_2PO_4 – 0,4; K_2HPO_4 – 0,4; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0,002; Fe(III)-НТА – 0,03; CaCl_2 – 0,02; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 0,1
(VII)	<i>D</i> -глюкоза – 10; дрожжевой экстракт – 1
(VIII)	<i>D</i> -глюкоза – 2,5; дрожжевой экстракт – 2,5; пептон – 5
(IX)	<i>D</i> -глюкоза – 5; дрожжевой экстракт – 5; пептон – 10

Опенк зимний (*F. velutipes*) выращивали погруженным способом в течение 21 сут в случае монокультур гриба, либо 7 сут до объединения с *A. brasilense* Sp245 или *A. brasilense* SR80, при температуре 28°C. После объединения бактериально-грибные культуры выращивали в течение 14 сут.

В качестве инокулята при посеве гриба использовали 14-сут культуры, выращенные на агаризованном пивном сусле (4 град по Баллингу). Глубинные посевные бактериальные культуры выращивали до экспоненциальной фазы роста при температуре +30°C и величине pH 7.0 в течение 18 часов на модифицированной синтетической среде (VI). Смешанную культуру на жидких средах получали, подсевая *A. brasilense* к *F. velutipes* либо в виде смыва с агаризованных сред (VI) или (VIII), либо в виде 24-часовой культуры на жидкой среде (VI).

Скорость роста при глубинном культивировании определяли по накоплению сухой биомассы в единицу времени в зависимости от продолжительности выращивания. Содержимое колб, для определения сухой биомассы при данном числе повторностей опыта на данные сутки наблюдения, фильтровали через предварительно взвешенные на аналитических весах фильтры, высушивали до постоянной массы и вновь взвешивали, определяли прирост биомассы по сравнению с контрольными образцами данной среды, в качестве которых служили 3-х-часовые культуры.

Световую микроскопию образцов культур осуществляли при увеличении $\times 20$ и $\times 40$ на микроскопе Leica DM6000B (Leica Microsystems) в Центре коллективного пользования (ЦКП) научным оборудованием в области физико-химической

биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Проводили не менее трех независимых экспериментов. Опыты по измерению биомассы проводили в 5–10 повторностях. Для количественной обработки данных использовали программу Microsoft Excel 2003. При статистической обработке полученных результатов пользовались методом расчета стандартного отклонения среднего арифметического при уровне доверительной вероятности 0,95.

Результаты и обсуждение

Выбор объектов исследования. Выбор грибного объекта в настоящей работе обусловлен в том числе упомянутыми выше ценными свойствами культивируемых базидиомицетов, что в полной мере относится к фламмулине. Бактериальная деструкция лигнин-содержащих субстратов катализируется предположительно ферментами, аналогичными участвующим в трансформации лигнина высшими грибами [Janusz et al., 2017]. Для совместного культивирования с ксилотрофным базидиомицетом выбрали два штамма - модельный объект изучения эндофитного симбиоза *A. brasilense* Sp245, а также эпифитный штамм SR80, у которых выявлена способность к деградации лигнина [Купряшина и др. (Kupryashina et al.), 2015].

Ростовые показатели со-культур в зависимости от состава среды. Прежде всего необходимо было решить задачу экспериментального подтверждения возможности выращивания двойной бактериально-грибной культуры для изучаемых биологических объектов. Подбирая условия совместного культивирования фламмулины и азоспирилл, использовали как описанные в литературе, так и модифицированные среды, перечисленные в разделе «Материалы и методы», предположительно подходящие для оптимизации получения мицелия в погруженной культуре и/или бактериальных суспензий.

Попытку культивирования бактерий на пивном сусле (среда (I)) мы предприняли с учетом ранее полученных для *A. brasilense* Sp7 положительных результатов [Лощинина и др. (Loshchinina et al.), 2012]. Однако в ходе экспериментов с монокультурами выяснилось, что среда (I) подходила только для выращивания базидиомицета и характеризовалась лишь незначительными признаками роста *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* SR80 как при относительно высоких концентрациях углеводов в составе этой среды (4 град по Баллингу), так и в разбавленном ее состоянии (рис. 1).

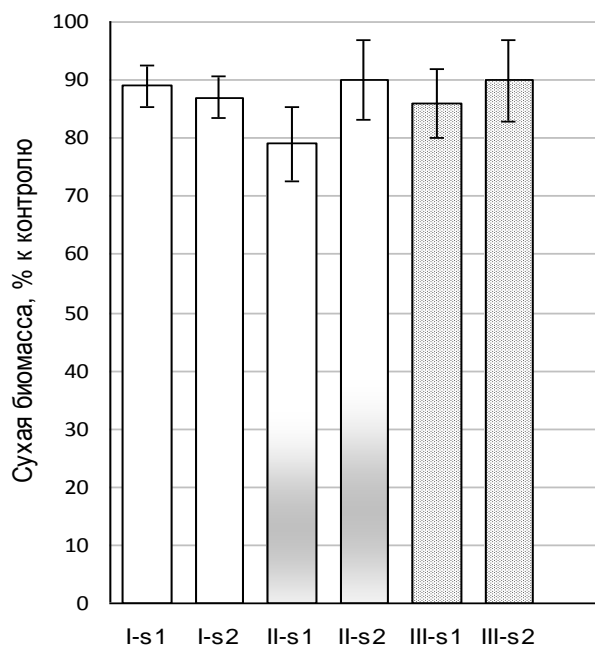


Рисунок 1. Накопление биомассы погруженными со-культурами: I – *Flammulina velutipes* 0535; II – *Ganoderma lucidum* 1315; III – *Pleurotus ostreatus* НК352 с *Azospirillum brasilense* Sp245 (s1) или *A. brasilense* SR80 (s2) через 21 сут на среде с пивным суслом (1,2 град по Баллингу)

Figure 1. Biomass accumulation by submerged co-cultures: I – *Flammulina velutipes* 0535; II – *Ganoderma lucidum* 1315; III – *Pleurotus ostreatus* НК352 with *Azospirillum brasilense* Sp245 (s1) or *A. brasilense* SR80 (s2) in 21 days on the medium with barley wort (1.2 Brix)

Очевидно, сбалансированный рост изучаемых штаммов бактерий нарушался на субстрате, одновременно характеризующемся избыточным количеством углерода и лимитированном по эссенциальным для них питательным веществам [Alves et al., 2017]. По-видимому, пивное сусло как источник углерода использовалось азоспириллами для продукции энергетического резерва бактериальной клетки, биополимеров, оказывавших негативное влияние на рост грибного компонента ко-культур. Кроме того, развиваясь на данной избыточной по углероду жидкой среде, богатой разнообразными углеводами, *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* SR80 могли продуцировать внеклеточные низкомолекулярные соединения, способные при образовании более или менее устойчивых ассоциатов с полисахаридами [Palacios et al., 2019; Benaissa, 2019] препятствовать усвоению данного питательного субстрата макромицетом. Известны низкомолекулярные метаболиты других PGPR, тормозящие развитие мицелия низших грибов

[Naureen et al., 2017]. Снижение накопления биомассы при выращивании смешанных бактериально-грибных культур на среде (I) мы наблюдали не только у *F. velutipes*, но и у других базидиомицетов (рис. 1).

Количественные характеристики ростовых процессов двойных культур *F. velutipes* с *A. brasilense* Sp245 или *A. brasilense* SR80 определяли на жидких химически детерминированных средах (II), (III), (IV), (V) (табл. 1). Величину оптического поглощения (при $\lambda = 600$ нм) бактериальной суспензии, использованной в качестве посевного материала, условно обозначали A1; A2; A4 при объеме вносимого в среду инокулята 0,5; 1,0; 2,0% (об.) соответственно. Величина A_{600} исходной бактериальной суспензии, измеряемая в каждой серии независимых экспериментов, составляла около 1,0.

Данные световой микроскопии позволили судить о достаточно активном росте азоспирилл на тех же средах, на которых мицелий грибов в присутствии этих бактерий также нормально развивался. На углеводно-аспарагиновой среде с добавлением солей (V) в жидких со-культурах азоспириллы проявляли активную подвижность и находились в плотном контакте с гифами грибов (рис. 2).



Рисунок 2. Световая микроскопия со-культур *Flammulina velutipes* 0535 с *A. brasilense* SR80 после 14 сут совместного выращивания на углеводно-аспарагиновой среде (V) в варианте опыта A1
Figure 2. Light microscopy of co-cultures of *Flammulina velutipes* 0535 with *A. brasilense* SR80 in 14 days of joint growth on the carbohydrate-asparagine medium (V) at the mode A1

Наиболее благоприятными средами для нормального роста и грибных, и бактериальных штаммов явились углеводно-аспарагиновые (III) и (V), в меньшей степени – среда (VII). Другие среды с дрожжевым экстрактом, а именно (VIII) и в меньшей

степени (IX), характеризовались нормальным ростом культур обоих бактериальных штаммов. Модифицированная малатная среда (VI) была нами использована для получения посевных бактериальных суспензий. Соответствующие данные для сред (II) – (V) представлены на рис. 3.

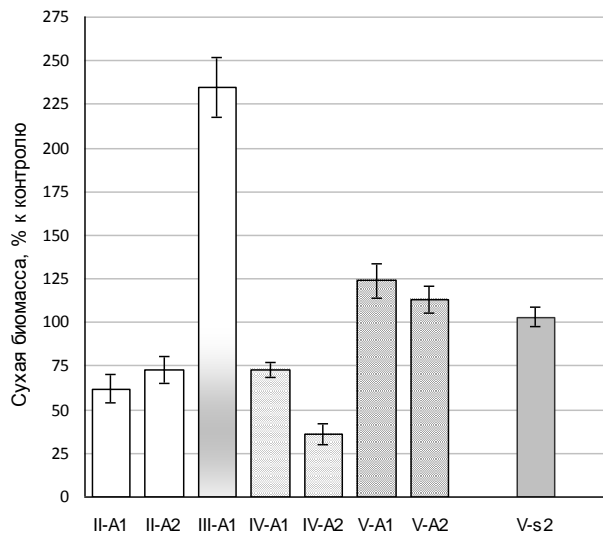


Рисунок 3. Накопление биомассы глубинными со-культурами *Flammulina velutipes* 0535 с *Azospirillum brasilense* Sp245 или *A. brasilense* SR80 (s2) в вариантах опыта A1 и A2 через 21 сут на углеводно-аспарагиновых средах с Glc (II, IV), Glc+Fru (III, V). Вариант s2 соответствует A1, если специально не обозначено

Figure 3. Biomass accumulation by submerged co-cultures of *Flammulina velutipes* 0535 with *Azospirillum brasilense* Sp245 or *A. brasilense* SR80 (s2) at the modes A1 and A2 in 21 days on the carbohydrate-asparagine media based on Glc (II, IV), Glc+Fru (III, V). Mode s2 corresponds to A1, if not specially indicated.

Углеводно-аспарагиновые среды были в разной степени пригодны для увеличения (в сравнении с контрольным вариантом) сухой биомассы в двойных культурах *F. velutipes* с эндофитным штаммом *A. brasilense* Sp245 и эпифитным штаммом *A. brasilense* SR80, – в последнем случае удалось получить прирост на 3% в одном варианте опыта с минимальной исходной плотностью бактериальной суспензии (A1) на среде (V) (рис. 3V-s2).

Если в составе жидких питательных сред источник углерода был представлен только глюкозой при исключении фруктозы, но сохранении суммарного содержания углеводов (среды (II) и (IV)), то при выращивании погруженной культуры опенка зимнего прослеживалось наиболее выраженное снижение накопления мицелиальной биомассы в

бинарных культурах по сравнению с контрольными вариантами опыта (рис. 3II, IV).

Эксперимент с выращиванием *F. velutipes* совместно с *A. brasilense* Sp245 в оптимальном варианте “*A. brasilense* Sp245, A1” (рис. 3III-A1) позволил получить значительное накопление сухой биомассы: 235% относительно контроля. Такому активному росту смешанной культуры гриба с данным штаммом азоспирилл благоприятствовала среда (III), содержащая Glc и Fru в массовом соотношении 1:1 и отличающаяся по составу от среды (V) отсутствием солей. При правильном дозировании бактериальной суспензии на среде (V) также наблюдали прирост биомассы мицелия опенка зимнего до 24% в сравнении с контролем, и вновь при более низкой плотности посевной суспензии *A. brasilense* Sp245 (рис. 3V-A1).

Ростовые показатели со-культур в зависимости от характеристик инокулюма. При исследовании бинарных культур в нашем эксперименте было желательно, чтобы бактерии характеризовались сохранением жизнеспособности в течение достаточно продолжительного культивирования с базидиомицетом. Следовало учесть, что условия среды роста при комнатной температуре, особенно в суспензии с высокой клеточной плотностью, способствуют автолизу у симбиотрофных азотфиксирующих ассоциативных бактерий [Лойко и др. (Loiko et al.), 2011].

В литературе имеются данные о различии фитостимулирующих эффектов, проявляемых самими бактериальными клетками и культуральной жидкостью, отделенной от бактериальной биомассы, при одинаковом количестве бактерий [Архипова и др. (Arkhipova et al.), 2018; Berthold et al., 2019]. У почвенных бактерий это предположительно имеет место из-за качественных и количественных различий широкого спектра внеклеточных и связанных с клеточной стенкой ферментов [Lasa et al., 2019], важных для растительно-микробных взаимодействий. Способ подготовки бактериального инокулюма мог предположительно влиять на ростовые показатели совместных культур. Мы использовали два способа получения посевного материала бактерий. При одном способе в качестве инокулята использовали суточную культуру азоспирилл на жидких средах. При другом способе бактериальную биомассу смывали стерильной водой с агаризованной питательной среды. Путем кратного разведения получали необходимую концентрацию клеток в суспензии по оптической плотности. Количество вносимого инокулюма в обоих методах обеспечивало одинаковую начальную оптическую плотность в смешанной бактериально-грибной культуре. Сопоставление величины прироста биомассы ко-

культуры с указанными характеристиками бактериального инокулюма не выявило связи между этими показателями. Выяснилось, что гораздо большее влияние на развитие бактериально-грибных культур оказывает исходная концентрация клеток азоспирилл.

Изучение влияния концентрации клеток азоспирилл на рост мицелия базидиомицета показало, что в большей степени стимуляция роста грибных культур штаммом *A. brasilense* Sp245 наблюдается в варианте опыта с наименьшей оптической плотностью A1 инокулюма у *F. velutipes* (рис. 3III-A1, IV-A1, V-A1). При инокуляции погруженных культур базидиомицета другим штаммом азоспирилл, SR80, проявлялся ростостимулирующий эффект бактерий в отношении роста мицелия опенка зимнего исключительно в минимальной концентрации клеток посевной суспензии варианта A1 (рис. 3V-s2). При увеличении концентрации клеток бактерий *A. brasilense* SR80 выше оптимальных значений наблюдалось существенное ингибирование роста мицелия *F. velutipes*. Известно, что низкая концентрация микроорганизмов не обеспечивает их выживаемости, однако и высокий «оккупационный» фон бактерий [Иванчина и др. (Ivanchina et al.), 2008] может быть неблагоприятным для базидиомицета, возможно, вследствие индукции его защитных механизмов посредством высокой концентрации некоторых бактериальных белков, как это имеет место в растительно-бактериальных ассоциациях.

Ростовые показатели со-культур в зависимости от штамма бактерий. При использовали одного и того же титра исходной бактериальной суспензии результаты оценки стимулирующих свойств азоспирилл в отношении роста мицелия базидиомицета оказались неодинаковыми для *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* SR80. При инокуляции погруженной культуры фламмулины бактериями эндофитный штамм азоспирилл *A. brasilense* Sp245 был намного более благоприятен для создания искусственной ассоциации с фламмулиной, и двойная культура *A. brasilense* Sp245 с *F. velutipes* заняла лидирующие позиции по накоплению биомассы вегетативного мицелия в рамках всех наших экспериментов (рис. 3III-A1). Замена среды (III) на (V) снимала ингибирующее влияние неоптимальной концентрации клеток бактериального инокулюма эпифитного штамма *A. brasilense* SR80 на культуру опенка зимнего (рис. 3V-s2).

Таким образом, в работе экспериментально подтверждена возможность и подобраны условия совместного глубинного культивирования базидиомицета *Flammulina velutipes* с бактериями *Azospirillum brasilense*. Установлено, что биомасса

мицелия совместной культуры опенка зимнего по сравнению с монокультурами гриба в наибольшей степени увеличивается на углеводно-аспарагиновой среде (III) при выращивании фламмулины с бактериями эндофитного штамма *A. brasilense* Sp245. При погруженном культивировании опенка зимнего с азоспириллами обнаружено угнетение роста эпифитного штамма, необходимость тщательного подбора состава среды и дозирования бактериальной суспензии. Преимущества бактериально-грибных культур следует учитывать при реализации биотехнологических схем искусственного выращивания ксилотрофных грибов. Исследования по эффективному получению мицелиальной биомассы и биологически активных веществ, источниками которых служат представители культивируемых базидиомицетов, обладают не только фундаментально-научной, но и практической значимостью, способствуя развитию биотехнологии получения ценных продуктов грибного происхождения.

Работа выполнена в рамках темы № АААА-А17-117102740098-8.

Литература

- Архипова Т.Н., Кузьмина Л.Ю., Кудоярова Г.Р. Влияние титра микроорганизмов на результаты их рост-стимулирующей активности в условиях гетеротрофного питания растений // Экобиотех. 2018. Т. 1(2). С. 97–104. doi 10.31163/2618-964X-2018-1-2-97-104
- Иванчина Н.В., Гарипова С.Р., Шавалеева Д.В., Уразбахтина Н.А., Захарова Р.Ш., Хайруллин Р.М. Влияние штаммов *Bacillus subtilis* на продуктивность растений гороха при автономной и совместной инокуляции со штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 1078 // Агрохимия. 2008. (10). С. 34–39.
- Купряшина М.А., Петров С.В., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е. Лигнинолитическая активность бактерий родов *Azospirillum* и *Niveispirillum* // Микробиология. 2015. Т. 84(6). С. 691–696. doi:10.7868/S0026365615060051
- Лойко Н.Г., Кряжевских Н.А., Сузина Н.Е., Демкина Е.В., Муратова А.Ю., Турковская О.В., Козлова А.Н., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Покоящиеся формы *Sinorhizobium meliloti* // Микробиология. 2011. Т. 80(4). С. 465–476. doi:10.1134/S0026261711040126
- Лощинина Е.А., Цивилева О.М., Макаров О.Е., Никитина В.Е. Изменения углеводного и жирнокислотного состава мицелия *Lentinus edodes* при совместном культивировании с *Azospirillum brasilense* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2012. (2-3). С. 64–67.
- Никитина В.Е., Цивилева О.М., Лощинина Е.А. Взаимоотношения ксилотрофных базидиомицетов и почвенных азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* // Успехи медицинской микологии. 2006. Т. 7. С. 293–294.
- Цивилева О.М., Шатерников А.Н., Никитина В.Е. Бактерии рода *Azospirillum* в оптимизации искусственного культивирования высших грибов-ксилотрофов // Биотехнология. 2020. Т. 36(2). С. 16–25. doi:10.21519/0234-2758-2020-36-2-16-25
- Alves M.I., Macagnan K.L., Rodrigues A.A., de Assis D.A., Torres M.M., de Oliveira P., Furlan L., Vendruscolo C.T., Moreira A.D.S. Poly (3-hydroxybutyrate)-P (3HB): Review of production process technology // Industrial Biotechnology. 2017. V. 13(4). P. 192–208. doi:10.1089/ind.2017.0013
- Benaissa A. Plant Growth Promoting Rhizobacteria A review // Algerian Journal of Environmental Science and Technology. 2019. V. 5(1). P. 873–880.
- Berthold D.E., Shetty K.G., Jayachandran K., Laughinghouse IV H.D., Gantar M. Enhancing algal biomass and lipid production through bacterial co-culture // Biomass and Bioenergy. 2019. V. 122. P. 280–289. doi 10.1016/j.biombioe.2019.01.033
- Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation // AMB Express. 2018. V. 8(1). P. 73. doi:10.1186/s13568-018-0608-1
- Goswami M., Deka S. Plant growth-promoting rhizobacteria – alleviators of abiotic stresses in soil: a review // Pedosphere. 2020. V. 30(1). P. 40–61. doi:10.1016/S1002-0160(19)60839-8
- Huang L.H., Lin H.Y., Lyu Y.T., Gung C.L., Huang C.T. Development of a transgenic *Flammulina velutipes* oral vaccine for hepatitis B // Food Technology and Biotechnology. 2019. V. 57(1). P. 105–112. doi:10.17113/ftb.57.01.19.5865
- Janusz G., Pawlik A., Sulej J., Świdorska-Burek U., Jarosz-Wilkolazka A., Paszczyński A. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution // FEMS Microbiology Reviews. 2017. V. 41(6). P. 941–962. doi:10.1093/femsre/fux049
- Jong S.C., Donovick R. Antitumor and antiviral substances from fungi // Advances in Applied Microbiology. 1989. V. 34. P. 183–262. doi:10.1016/S0065-2164(08)70319-8
- Kumar A., Patel J.S., Meena V.S., Ramteke P.W. Plant growth-promoting rhizobacteria: strategies to improve abiotic stresses under sustainable agriculture // Journal of Plant Nutrition. 2019. V. 42(11-12). P. 1402–1415. doi:10.1080/01904167.2019.1616757
- Lasa A.V., Mašínová T., Baldrian P., Fernández-López M. Bacteria from the endosphere and rhizosphere

- of *Quercus* spp. use mainly cell wall-associated enzymes to decompose organic matter // *PloS ONE*. 2019. V. 14(3). P. e0214422. doi:10.1371/journal.pone.0214422
18. Mahfuz S., Song H., Miao Y., Liu Z. Dietary inclusion of mushroom (*Flammulina velutipes*) stem waste on growth performance and immune responses in growing layer hens // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019. V. 99(2). P. 703–710. doi:10.1002/jsfa.9236
19. Mizuno T. Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi // *Food Reviews International*. 1995. V. 11(1). P. 5–21. doi:10.1080/87559129509541017
20. Naureen Z., Rehman N.U., Hussain H., Hussain J., Gilani S.A., Al Housni S.K., Mabood F., Khan A.L., Farooq S., Abbas G., Harrasi A.A. Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi // *Frontiers in Microbiology*. 2017. V. 8. P. 1477. doi:10.3389/fmicb.2017.01477
21. Nie Y., Jin Y., Deng C., Xu L., Yu M., Yang W., Li B., Zhao R. Rheological and microstructural properties of wheat dough supplemented with *Flammulina velutipes* (mushroom) powder and soluble polysaccharides // *CyTA-Journal of Food*. 2019. V. 17(1). P. 455–462. doi:10.1080/19476337.2019.1596986
22. Paaventhana P., Joseph J.S., Seow S.V., Vaday S., Robinson H., Chua K.Y., Kolatkar P.R. A 1.7 Å structure of Fve, a member of the new fungal immunomodulatory protein family // *Journal of Molecular Biology*. 2003. V. 332(2). P. 461–470. doi:10.1016/S0022-2836(03)00923-9
23. Palacios O.A., Lopez B.R., Bashan Y., de-Bashan L.E. Early Changes in Nutritional Conditions Affect Formation of Synthetic Mutualism Between *Chlorella sorokiniana* and the Bacterium *Azospirillum brasilense* // *Microbial Ecology*. 2019. V. 77(4). P. 980–992. doi:10.1007/s00248-018-1282-1
24. Seow S.V., Kuo I.C., Paaventhana P., Kolatkar P.R., Chua K.Y. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on the fungal immunomodulatory protein Fve from the golden needle mushroom (*Flammulina velutipes*) // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2003. V. 59(8). P. 1487–1489. doi:10.1107/S0907444903011879
25. Su A., Ma G., Xie M., Ji Y., Li X., Zhao L., Hu Q. Characteristic of polysaccharides from *Flammulina velutipes* in vitro digestion under salivary, simulated gastric and small intestinal conditions and fermentation by human gut microbiota // *International Journal of Food Science & Technology*. 2019. V. 54(6). P. 2277–2287. doi:10.1111/ijfs.14142
26. Tsivileva O.M., Pankratov A.N., Nikitina V.E. Extracellular protein production and morphogenesis of *Lentinula edodes* in submerged culture // *Mycological Progress*. 2010. V. 9(2). P. 157–167. doi:10.1007/s11557-009-0614-4
27. Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002. V. 60(3). P. 258–274. doi:10.1007/s00253-002-1076-7
28. Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1999. V. 1(1). P. 31–62. doi:10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i1.30
29. Wasser S.P., Weis A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective // *Critical Reviews in Immunology*. 1999a. V. 19(1). P. 65–96. doi:10.1615/CritRevImmunol.v19.i1.30
30. Zhao R., Hu Q., Ma G., Su A., Xie M., Li X., Chen G., Zhao L. Effects of *Flammulina velutipes* polysaccharide on immune response and intestinal microbiota in mice // *Journal of Functional Foods*. 2019. V. 56. P. 255–264. doi:10.1016/j.jff.2019.03.031

References

- Alves M.I., Macagnan K.L., Rodrigues A.A., de Assis D.A., Torres M.M., de Oliveira P., Furlan L., Vendruscolo C.T., Moreira A.D.S. Poly (3-hydroxybutyrate)-P (3HB): Review of production process technology. *Industrial Biotechnology*. 2017. V. 13(4). P. 192–208. doi:10.1089/ind.2017.0013
- Arkhipova T.N., Kuzmina L.Y., Kudoyarova G.R. The influence of the titer of microorganisms on the results of their growth-stimulating activity in the heterotrophic nutrition of plants. *Ecobiotech*. 2018. V. 1(2). P. 97–104. doi:10.31163/2618-964X-2018-1-2-97-104
- Benaissa A. Plant Growth Promoting Rhizobacteria A review. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*. 2019. V. 5(1). P. 873–880.
- Berthold D.E., Shetty K.G., Jayachandran K., Laughinghouse IV H.D., Gantar M. Enhancing algal biomass and lipid production through bacterial co-culture. *Biomass and Bioenergy*. 2019. V. 122. P. 280–289. doi:10.1016/j.biombioe.2019.01.033
- Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*. 2018. V. 8(1). P. 73. doi:10.1186/s13568-018-0608-1
- Goswami M., Deka S. Plant growth-promoting rhizobacteria – alleviators of abiotic stresses in soil: a review. *Pedosphere*. 2020. V. 30(1). P. 40–61. doi:10.1016/S1002-0160(19)60839-8

7. Huang L.H., Lin H.Y., Lyu Y.T., Gung C.L., Huang C.T. Development of a transgenic *Flammulina velutipes* oral vaccine for hepatitis B. *Food Technology and Biotechnology*. 2019. V. 57(1). P. 105–112. doi:10.17113/ftb.57.01.19.5865
8. Ivanchina N.V., Garipova S.R., Shavaleeva D.V., Urazbakhtina N.A., Zakharova R.Sh., Khairullin R.M. Effect of *Bacillus subtilis* Strains on the Yield of Pea (*Pisum sativum* L.) at Monoinoculation and in Combination with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 1078. *Agrokhimiya*. 2008. (10). 34–39.
9. Janusz G., Pawlik A., Sulej J., Świdarska-Burek U., Jarosz-Wilkolazka A., Paszczyński A. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017. V. 41(6). P. 941–962. doi:10.1093/femsre/fux049
10. Jong S.C., Donovick R. Antitumor and antiviral substances from fungi. *Advances in Applied Microbiology*. 1989. V. 34. P. 183–262. doi:10.1016/S0065-2164(08)70319-8
11. Kumar A., Patel J.S., Meena V.S., Ramteke P.W. Plant growth-promoting rhizobacteria: strategies to improve abiotic stresses under sustainable agriculture. *Journal of Plant Nutrition*. 2019. V. 42(11-12). P. 1402–1415. doi:10.1080/01904167.2019.1616757
12. Kupryashina M.A., Petrov S.V., Ponomareva E.G., Nikitina V.E. Lignolytic activity of bacteria of the genera *Azospirillum* and *Niveispirillum*. *Microbiology*. 2015. V. 84(6). P. 791–795. doi:10.1134/S0026261715060041
13. Lasa A.V., Mašínová T., Baldrian P., Fernández-López M. Bacteria from the endosphere and rhizosphere of *Quercus* spp. use mainly cell wall-associated enzymes to decompose organic matter. *PLoS ONE*. 2019. V. 14(3). P. e0214422. doi:10.1371/journal.pone.0214422
14. Loiko N.G., Kryazhevskikh N.A., Suzina N.E., Demkina E.V., Muratova A.Y., Turkovskaya O.V., Kozlova A.N., Galchenko V.F., El'-Registan G.I. Resting forms of *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology*. 2011. V. 80(4). P. 472–482. doi:10.1134/S0026261711040126
15. Loshchinina E.A., Tsvileva O.M., Makarov O.E., Nikitina V.E. Changes in carbohydrate and fatty-acid content of *Lentinus edodes* mycelium in dual cultures with *Azospirillum brasilense*. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya*. 2012. (2-3). P. 64–67.
16. Mahfuz S., Song H., Miao Y., Liu Z. Dietary inclusion of mushroom (*Flammulina velutipes*) stem waste on growth performance and immune responses in growing layer hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019. V. 99(2). P. 703–710. doi:10.1002/jsfa.9236
17. Mizuno T. Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Reviews International*. 1995. V. 11(1). P. 5-21. doi:10.1080/87559129509541017
18. Naureen Z., Rehman N.U., Hussain H., Hussain J., Gilani S.A., Al Housni S.K., Mabood F., Khan A.L., Farooq S., Abbas G., Harrasi A.A. Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*. 2017. V. 8. P. 1477. doi:10.3389/fmicb.2017.01477
19. Nie Y., Jin Y., Deng C., Xu L., Yu M., Yang W., Li B., Zhao R. Rheological and microstructural properties of wheat dough supplemented with *Flammulina velutipes* (mushroom) powder and soluble polysaccharides. *CyTA-Journal of Food*. 2019. V. 17(1). P. 455–462. doi:10.1080/19476337.2019.1596986
20. Nikitina V.E., Tsvileva O.M., Loshchinina E.A. Interrelations of xylophilic basidiomycetes and soil nitrogen-fixing bacteria from the genus *Azospirillum*. *Advances in Medical Mycology*. 2006. V. 7. P. 293–294.
21. Paaventhana P., Joseph J.S., Seow S.V., Vaday S., Robinson H., Chua K.Y., Kolatkar P.R. A 1.7 Å structure of Fve, a member of the new fungal immunomodulatory protein family. *Journal of Molecular Biology*. 2003. V. 332(2). P. 461–470. doi:10.1016/S0022-2836(03)00923-9
22. Palacios O.A., Lopez B.R., Bashan Y., de-Bashan L.E. Early Changes in Nutritional Conditions Affect Formation of Synthetic Mutualism Between *Chlorella sorokiniana* and the Bacterium *Azospirillum brasilense*. *Microbial Ecology*. 2019. V. 77(4). P. 980–992. doi:10.1007/s00248-018-1282-1
23. Seow S.V., Kuo I.C., Paaventhana P., Kolatkar P.R., Chua K.Y. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on the fungal immunomodulatory protein Fve from the golden needle mushroom (*Flammulina velutipes*). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2003. V. 59(8). P. 1487–1489. doi:10.1107/S0907444903011879
24. Su A., Ma G., Xie M., Ji Y., Li X., Zhao L., Hu Q. Characteristic of polysaccharides from *Flammulina velutipes* in vitro digestion under salivary, simulated gastric and small intestinal conditions and fermentation by human gut microbiota. *International Journal of Food Science & Technology*. 2019. V. 54(6). P. 2277–2287. doi:10.1111/ijfs.14142
25. Tsvileva O.M., Pankratov A.N., Nikitina V.E. Extracellular protein production and morphogenesis of *Lentinula edodes* in submerged culture. *Mycological Progress*. 2010. V. 9(2). P. 157–167. doi:10.1007/s11557-009-0614-4
26. Tsvileva O.M., Shaternikov A.N., Nikitina V.E. Bacteria of the *Azospirillum* genus for the optimization

- of the artificial culture of xylophilic mushrooms. *Biotekhnologiya*. 2020. V. 36(2). P. 16–25. doi:10.21519/0234-2758-2020-36-2-16-25
27. Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002. V. 60(3). P. 258–274. doi:10.1007/s00253-002-1076-7
28. Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1999. V. 1(1). P. 31–62. doi:10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i1.30
29. Wasser S.P., Weis A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*. 1999a. V. 19(1). P. 65–96. doi:10.1615/CritRevImmunol.v19.i1.30
30. Zhao R., Hu Q., Ma G., Su A., Xie M., Li X., Chen G., Zhao L. Effects of *Flammulina velutipes* polysaccharide on immune response and intestinal microbiota in mice. *Journal of Functional Foods*. 2019. V. 56. P. 255–264. doi:10.1016/j.jff.2019.03.031