

**Наименование проекта:** AP19676907 «Разработка технологии эффективного использования экстрактов и отработанных субстратов грибов как средство защиты картофеля от фитопатогенов с изготовлением кормовой добавки».

**Актуальность:**

До настоящего времени в ряде зарубежных стран, как и в Республике Казахстан практически не изучено противогрибковое и противовирусное действие лекарственных грибов в области защиты картофеля. Получение мицелия, плодовых тел, а также экстрактов съедобных и лекарственных ксилотрофных грибов, обладающих высокой биологической ценностью, открывает широкие перспективы создания новых экологичных производств и их применения в пищевой промышленности, сельском хозяйстве и медицине. Кроме того, отработанные субстраты выращивания грибов нуждаются в биоконверсии, предполагающей производство кормовых биодобавок, содержащих большое количество протеина, лигнина и других питательных веществ. Успех ускоренного получения экологически чистой продукции базидиальных макромицетов во многом зависит от правильного выбора лигноцеллюлозного субстрата и может быть усилен с помощью современных безопасных ростостимулирующих и питательных добавок.

**Цель:**

Цель проекта - разработать технологию эффективного использования экстрактов грибов и отработанных субстратов съедобных и лекарственных ксилотрофных грибов, как средство защиты картофеля от вирусных и грибных патогенов с изготовлением кормовой добавки.

**Ожидаемые и достигнутые результаты а 2023 год:**

В рамках проекта на базе НАО «КАТУ им. С. Сейфуллина» (КАТУ) планируется: изучить антимикробное и антиоксидантное действие лекарственных грибов; идентифицировать штаммы-продуценты БАВ, провести генетическую паспортизацию и создать коллекцию перспективных видов съедобных и лекарственных базидиомицетов, отработать эффективную автоматизированную технологию их культивирования, изучить возможность применения переработанных отходов грибоводства как эффективных кормовых добавок для животных, так и вторичных биодобавок для культивирования грибов.

В результате выполнения проекта будут подготовлены 3 рекомендации: по получению и применению противовирусных и противогрибковых препаратов из ксилотрофных грибов; по интенсивной технологии культивирования перспективных видов съедобных и лекарственных базидиальных макромицетов на основе доступных в Казахстане растительных отходов; получению и применению высокопитательной грибной кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и вторичной добавки для культивирования грибов. Разработанные рекомендации послужат методической основой получения дополнительных отечественных экологически чистых продуктов для пищевых и сельскохозяйственных целей. Проект имеет высокую междисциплинарность, так как будет проводиться работа в нескольких направлениях и будут задействованы специалисты в области защиты и иммунитета растений, микологии, биотехнологии, биохимии, ветеринарии, информационных технологий.

По результатам исследований будет опубликовано не менее 2 (двух) статей и (или) обзоров в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Science Citation Index Expanded базы Web of Science и (или) имеющих процентиль по CiteScore в базе Scopus не менее 50 (пятидесяти); а также не менее 1 (одной) статьи или обзора в рецензируемом зарубежном или отечественном издании, рекомендованном КОКСНВО.

Кроме того, по результатам НИР будут защищены магистерская и докторская диссертации (PhD), опубликованы материалы международных научно-практических конференций, будет подана заявка на патент РК на изобретение в РГП «НИИС».

1. Разработка оптимальных параметров интенсивной технологии культивирования съедобных и лекарственных грибов с использованием растительных органических отходов и биодобавок.

Получен и размножен маточный мицелий культуры герициума гребенчатого (*Hericium erinaceus*) и вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*). Проведена оптимизация питательных сред для культивирования маточного мицелия исследуемых ксилотрофных грибов. Лучшими ростовыми характеристиками маточных культур штаммов грибов *Pleurotus ostreatus* и *Hericium erinaceus* на 7-е сутки культивирования обладали варианты с пшенично-сахарозным агаром, пшенично-глюкозным агаром, ячменно-глюкозным агаром и пшеничным агаром, превышающие показатели картофельно-глюкозного агара (контроль) в 1,3-1,5 раза. Получен и поддерживается в стерильной культуре посевной мицелий Герициума гребенчатого (*Hericium erinaceus*) и вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*). При изучении влияния вторичной добавки на основе ЛП на рост маточного мицелия *Pleurotus ostreatus* максимальная скорость развития культуры выявлена при внесении в питательную среду 6% добавки, что превышало контроль на 13,2%. Рост мицелия на среде с добавкой из соломы пшеницы в дозе 3, 6 и 12% находился на уровне стандарта (КГА), а наилучший показатель отмечен при внесении в среду вторичной добавки в дозе 9 %, где скорость роста мицелия превосходила контрольный вариант на 11 %. При изучении влияния вторичной добавки на основе лузги подсолнечника (ЛП) в диапазоне 3-12% на рост маточной культуры *Hericium erinaceus* установлено, что наиболее интенсивное развитие маточного мицелия протекает на агаризованной среде с внесением 12% добавки ЛП с превышением контроля (КГА) на 13,4%. Кроме того, на данном варианте опыта отмечено образование примордиев. Рост мицелия на среде с добавкой из соломы пшеницы в дозе 9-12% находился на уровне стандарта (КГА). На вторичных добавках на основе лузги подсолнечника и соломы пшеницы в дозах 6-12% наблюдалось образование примордиев непосредственно из маточного мицелия данного вида гриба, причем доза 12% приводит к более раннему плодоношению.

Оптимизирован состав питательного субстрата для культивирования посевного мицелия изучаемых базидиомицетов. В опыте по изучению роста посевного мицелия грибов *Pleurotus ostreatus* на различных субстратах (зерно и солома) с добавлением вторичных добавок из переработанных грибных блоков на основе соломы пшеницы и лузги подсолнечника получены следующие данные: рост посевного мицелия значительно протекает быстрее на субстрате с соломой на 70%, по сравнению с колонизацией зернового субстрата; вторичная добавка на основе лузги подсолнечника не оказывала существенного влияния на рост посевного мицелия по сравнению с контролями (зерно ячменя, солома); вторичная добавка на основе пшеничной соломы улучшает показатель роста мицелия на субстрате соломы на 17,8% по сравнению с контрольным вариантом опыта (солома), на зерновом субстрате - на 18,2% по сравнению с контролем (зерно).

Внесение в субстрат буковых опилок вторичной добавки на основе лузги подсолнечника улучшает показатель роста посевного мицелия *Hericium erinaceus* на 13,5 % по сравнению с контролем (опилки).

При изучении влияния органических целлюлозосодержащих отходов растениеводства на плодоношение исследуемых видов грибов было установлено, что штаммы К-80 и НК-35 *Pleurotus ostreatus* как и *Hericium erinaceus* обладали максимальной массой плодовых тел на варианте субстрата с опилками. Средняя продуктивность плодовых тел грибов по отношению к массе субстрата на 29-е сутки составила: для *Hericium erinaceus* на основе опилок - 3,1%, на основе соломы - 2%; для *Pleurotus ostreatus*: на варианте опилок штамм К-80 - 29,1%, на субстрате с соломой - 14,2 %; штамм НК-35 на варианте с опилками - 28,1 % и на основе соломы - 14,4%. Плодоношение на соломенном субстрате с внесением 3,6,9,12% вторичной добавки на основе соломы наступает раньше в отличие от добавки на основе лузги подсолнечника.

2. Автоматизация климат-контроля для культивирования базидиомицетов на основе микропроцессоров на отладочной плате.

Для культивирования базидиомицетов спроектирована система автоматизации климат-контроля и регулирования основных параметров климата в выростной камере. Регулируемые параметры: содержание углекислого газа, влажность и температура, а также периодичность включения света (для создания эффекта светового дня) и включение внутреннего вентилятора для усреднения воздуха в камере. На базе процессора "ESP 8266 отладочная плата NodeMCU" изготовлен управляющий контроллер. Контроллер посредством контактных реле управляет светом в камере, внутренним вентилятором, приточной вентиляцией, и увлажнителем воздуха. Датчики температуры, влажности и содержания углекислого газа передают сигнал на микропроцессор ESP 01 имеющий WiFi передатчик. Посредством WiFi процессор ESP 8266 принимает данные с датчиков анализирует и управляет соответствующим реле. Установлена плата контроллера на панели инструментов в комнате 5017. Проведена регулировка работы платы реле и тестирование совместной работы всех компонентов контроллера. Установлен вентилятор внутренний и приточной вентиляции, увлажнитель воздуха и подключен к выключателю света в камере. Разработано программное обеспечение и прототип демоверсии оборудования климат-контроля на основе АРДУИНО и ее испытание.

3. Скрининг и создание коллекции продуктивных штаммов грибов и штаммов-продуцентов БАВ.

Проведен скрининг и создание коллекции продуктивных штаммов грибов и штаммов-продуцентов БАВ. Для проведения ПЦР-идентификации макромицетов *Pleurotus ostreatus* и *Hericiium erinaceus* и генетической паспортизации грибов производится дизайн праймеров. Установлено, что в состав шляпок гриба вешенка входит: белки 3,3 %, жиры 0,04%, хитозан 8,4%, зола 1%, влажность 86,9 %. В состав шляпок гриба герициум (ежовик) входит: белки 13,5 %, жиры 2,4%, хитозан 6,6%, зола 0,85%, влажность 76,25 %.

Было проведено выделение геномной ДНК штаммов грибов, проведен анализ качества и количества геномной ДНК. Проведена фрагментация и амплификация целевых регионов ITS для генетической идентификации.

Проведена экстракция жира и белка из грибов *Pleurotus ostreatus* и *Hericiium erinaceus*, включающая следующие этапы: подготовка сырья - сушка и измельчение до состояния порошка; экстракция жира с помощью аппарата Сокслета; водная экстракция обезжиренных грибов; щелочная экстракция.

4. Изыскание и получение экстрактов культивируемых грибов, активных по отношению к возбудителям болезней картофеля.

Проведена работа по изысканию и получению экстрактов культивируемых грибов, активных по отношению возбудителям болезней картофеля. Различные способы экстракции опробованы для получения экстрактов грибов *Pleurotus ostreatus* и *Hericiium erinaceus* с оптимальным составом экстракта. Проведен поиск литературы по методике получения экстрактов из плодовых тел (замороженные, сушеные, свежие). Проведена экстракция жиров и протеинов из грибов *Pleurotus ostreatus* и *Hericiium erinaceus*. Экстракцию жиров проводилась на аппарате Сокслета с применением хлороформа в качестве экстрагента. После экстракции хлороформ упаривался с получением чистой жировой фракции. Экстракцию белков проводилась в две стадии - 1-ая водная, вторая щелочным раствором. При водной экстракции в экстракт переходят протеины и активные вещества. При щелочной экстракции в раствор переходят в основном протеины.

5. Определение регламентов применения экстрактов грибов в защите от патогенов картофеля.

Выделены и поддерживаются *in vitro* чистые культуры возбудителей фузариоза и альтернариоза, подтверждена их идентификация. В результате тестирования посадок картофеля методом иммуноферментного анализа выявлены сортообразцы,

моноинфицированные вирусами: PVY, PVX, PVM. Проведена оценка антивирусной и противогрибковой активности экстрактов *Pleurotus ostreatus* и *Hericium erinaceus* в отношении основных фитопатогенов картофеля. Проведены испытания экстрактов грибов *Pleurotus ostreatus* и *Hericium erinaceus* на чистых культурах возбудителей фузариоза и альтернариоза, на растениях картофеля, инфицированных вирусами (PVY, PVX, PVM). Испытание экстрактов грибов на чистой культуре фузариоза (*Fusarium oxysporum*) проводилось методом диффузии в агар с дисками. Было проведено испытание водных экстрактов и белков *Pleurotus ostreatus* и дополнительно гриба *Lentinula edodes*, растворимых в воде. В каждом варианте был заложен опыт с различными дозами грибных экстрактов: 1:1, 1:10, 1:100. Также было проведено сравнение с положительным контролем (препарат Фалькон, д.в. 167 г/л тебуконазола, 43 г/л триадименола, 250 г/л спирокарбама) и отрицательным контролем (дистиллированная вода). Диски из фильтровальной бумаги, обработанные грибными экстрактами, пестицидом и водой были помещены на КГА с чистой культурой *Fusarium oxysporum*. Вокруг дисков, обработанных грибными экстрактами вешенки наблюдались частичные зоны задержки роста колоний чистой культуры *Fusarium oxysporum*. Аналогичная картина наблюдалась на всех вариантах опыта с грибными экстрактами *Pleurotus ostreatus*. На зоне с положительным контролем отмечалось небольшое заражение, в то время как в зоне с отрицательным контролем отмечалось полное заражение. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) в полевых посадках картофеля выявлены образцы, моноинфицированные вирусами: PVY, PVX, PVM, которые были переведены в стерильную культуру (культуру изолированных органов растений, *in vitro*). Было проведено изучение противовирусной активности экстрактов вешенки с помощью введения экстракта через мембранный фильтр в питательную среду Мурасиге-Скуга в которой росли инфицированные растения. В результате не было отмечено противовирусное действие экстрактов вешенки по отношению к PVY, PVX, PVM методом внесения экстракта в питательную среду.

6. Разработка технологии утилизации отходов производства грибов путем получения высокопитательной и легкоусвояемой кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и вторичной биодобавки для культивирования базидиомицетов на основе отработанного грибного субстрата.

Начата разработка технологии утилизации отходов производства грибов путем получения высокопитательной и легкоусвояемой кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и вторичной биодобавки для культивирования базидиомицетов на основе отработанного грибного субстрата. Подготовлено технологическое оборудование для последующей переработки отходов производства грибов *Pleurotus ostreatus*: экструдер ПЭ-350, смеситель СГ-800, пневмодробилка ПД-700, охладитель, сено-соломо измельчитель, бункер накопитель с выгрузным шнеком и др. Было подготовлено сырье из грибных блоков (ГБ) с фракцией частиц от 1,0 до 2,0 мм. Измельчение грибных блоков осуществляли с использованием сено-соломо измельчителя СИ-200, с производительностью 400 кг/ч. Разработана технология производства кормовой добавки, основанной на использовании грибных блоков. Зерновые компоненты (ячмень, пшеница, овес) смешивали с грибными блоками в соотношении 1:3. В этом соотношении объем зерновой части был одинаковым, в то время как количество грибных блоков изменяли на уровне 20%, 25% и 30%. В состав кормовой добавки включены следующие компоненты: пшеница экструдированная, ячмень экструдированный, овес экструдированный, трикальцийфосфат, лен, аминокислоты, премикс, BioFeed-P, соль поваренная, вода, грибные блоки. Определение химического состава и питательной ценности образцов кормовой добавки проводили на инфракрасном анализаторе кормов NIRS DS 2500 (FOSS). Проведен анализ по изменению компонентного состава кормовых добавок с включением 20 и 30% грибных блоков до и после экструдирования. Содержание протеина в кормовой добавке с добавлением 20% ГБ до экструдирования составило 17,3%, после экструдирования показатель незначительно снижается и составляет 16,3%

при этом белки переходят в более усвояемую форму. Содержание жира напротив повышалось после экструдирования, так в кормовой добавке с 20% ГБ до обработки составляло 5,5%, а после – 6,5%. Следует выделить снижение влажности после экструдирования с 13,1% до 10,1%. Содержание минеральных веществ отражает показатель зольности, который после экструдирования практически остается на том же уровне – 5,1%, что и до обработки. Содержание протеина в кормовой добавке с добавлением 30% ГБ после экструдирования составило 17,5%. Жирность после экструдирования также повысилась с 5,5% до 6,5%. Влажность снизилась до 13,9%, что позволяет пролонгировать срок хранения готового продукта. Микробиологический анализ кормовых добавок проводили на готовых питательных средах Compact Dry с изучением общего микробного числа, группы кишечных палочек, грибов, дрожжей и сальмонелл. По результатам исследований выявлено, что баротермическая обработка позволила уничтожить микробы группы кишечной палочки. Так до экструдирования образца с 30% ГБ выявлено 209 КОЕ, тогда как после экструдирования анализ данного образца показал отсутствие кишечной палочки. Также выявлено, что проба с 30% ГБ была контаминирована дрожжами, однако после экструдирования они обнаружены не были. В пробе с 20% ГБ до обработки были обнаружены множественные колонии плесневых грибов, которые после экструдирования не обнаружены. Сальмонеллы не обнаружены во всех исследуемых пробах. Для оценки продуктивности животных по принципу пар аналогов были сформированы 2 группы кроликов (учитывая возраст, живую массу и породу). Параметры микроклимата были одинаковыми во всех группах. Животные клинически здоровые: дыхание ритмичное, видимые слизистые оболочки бледно-розовые, животные охотно поедают корм, поза естественная. Для контроля весовых показателей было проведено индивидуальное взвешивание, средняя живая масса в опытной группе составила  $1,6 \pm 0,008$  кг, в контрольной  $1,59 \pm 0,15$  кг. Опытной группе задавали экструдированные кормовые добавки с включением 30% ГБ. Норма введения кормовой добавки 100 г/гол в сутки, 80 г/ гол сена в сутки. На 7-й день эксперимента проведено контрольное взвешивание животных, абсолютный прирост составил в ОГ 160 г, в контрольной группе – 140 г, таким образом среднесуточный привес составил в ОГ – 22,8 г и 20 г соответственно. До эксперимента взяты пробы крови для проведения биохимического анализа и оценки гомеостаза организма. Анализ крови проводили на ветеринарном биохимическом анализаторе модели SMT-120V (Chengdu Seamaty Technology Co., China, Sichuan). Результаты крови, взятой до эксперимента, указывает на потенциальные изменения в функции печени и обмене липидов у животных в опытной группе по сравнению с контрольной группой. Среднее значение общего белка в опытной группе составило  $63,87 \pm 2,47$  г/л, в то время как в контрольной группе  $60,10 \pm 2,99$  г/л. Уровень аланинаминотрансферазы в опытной группе равен  $107 \pm 16,54$  U/L, тогда как в контрольной группе он составляет  $81,00 \pm 23,46$  U/L. Повышенные значения ALT могут свидетельствовать о повреждении или стрессе печени у животных. Среднее значение общего холестерина в опытной группе составляло  $2,52 \pm 0,17$  ммоль/л, в то время как в контрольной группе показатель равен  $1,99 \pm 0,36$  ммоль/л. Это указывает на то, что уровень общего холестерина у животных в опытной группе выше, чем в контрольной группе. Повышенный уровень холестерина может быть связан с изменениями в обмене липидов или метаболическими процессами у животных в опытной группе. Глюкоза (GLU) несколько понижена в опытной группе и составляет  $1,51 \pm 0,30$  mmol/L, в контрольной группе  $3,39 \pm 1,40$  mmol/L. Остальные изучаемые показатели находились в пределах физиологической нормы, значительных расхождений между группами не наблюдали. На 7-й день эксперимента в крови животных опытной группы показатель ALT приходит в норму. Выявлено снижение уровня холестерина в крови кроликов опытной группы  $2,26 \pm 0,22$  mmol/L, что также приближается к верхней границе нормы. Концентрация глюкозы в крови кроликов ОГ –  $1,62 \pm 0,15$  mmol/L, в КГ  $3,03 \pm 0,74$  mmol/L. Исходя из этих данных, можно сделать вывод, что исследуемые кормовые добавки на основе грибных

блоков не оказывают отрицательного действия на организм животных, а напротив приводят такие показатели, как ALT и содержание общего холестерина в норму.

**Члены исследовательской группы:**

**руководитель проекта** – Хасанов В.Т., кандидат биологических наук, h-index – 1 (Web of Science), 2 (Scopus), Web of Science Researcher ID: O-7172-2017, ORCID: 0000-0002-9054-5551, Scopus Author ID: 57188854211.

**исследовательская группа:**

Mustafa Sevindik - Научный консультант. Ассоциированный профессор, PhD, h-index Scopus-28, Web of Science-16, Web of Science Researcher ID: J-1060-2019, ORCID: 0000-0001-7223-2220, Scopus Author ID: 57195056820.

Weixing Shan - Научный консультант. Профессор, PhD, h-index Scopus – 24, Web of Science- 23, Web of Science Researcher ID: GDY-7223-2022

ORCID: 0000-0001-7286-4041, Scopus Author ID: 35895917700.

Бейсембина Бибигуль – ЧС, PhD, h-index Scopus – 1, Web of Science - 1 Scopus Author ID 57188854892, Researcher ID: O-7166-2017, ORCID: 0000-0001-6667-8541.

Калашинова Л. К. - ЧС, PhD, h-index Scopus – 0 Web of Science - 0 Web of Science Researcher ID: AAD-4841-202, ORCID: 0000-0003-0716-633X Scopus Author ID: 57200213917.

Балджи Ю.А. - ЧС, кандидат ветеринарных наук, h-index Scopus – 1, Web of Science – 1, Web of Science Researcher ID: AAF-2915-2020 (C-6504-2017), ORCID: 0000-0002-5006-3224, Scopus Author ID: 57204942823.

Жатканбаева Ж.К. – НС, кандидат химических наук, h-index Scopus - 2, Web of Science – 2, Web of Science Researcher ID: O-8229-2014, ORCID: 0000-0001-6584-2565, Scopus Author ID -57202887991.

Жармакин Б.К. – НС, магистр технических наук, h-index Scopus - 0, Web of Science – 0, ORCID: 0000-0002-5323-3460.

Сүлейман М.А. – НС, магистр сельскохозяйственных наук, h-index - 0, Web of Science Researcher ID: ACQ-0840-2022, ORCID: 0000-0002-7670-5352.

Маханова М. М. – НС, магистр сельскохозяйственных наук, h-index Scopus – 0, ORCID: 0000-0002-7091-1163.

Даулет Д. – МНС.

Ахметжанов М.Т. – МНС.

**Список публикаций и патентов опубликованные в рамках данного проекта: (со ссылками на них):**

1. Vadim Khassanov, Celal Bal, Mustafa Sevindik. Lion's mane mushroom in terms of biological activity. II. International KORKUT ATA Scientific researches conference, October 7-8, 2023 / Ankara, Turkey, 1041-1048.

2. Vadim Khassanov, Celal Bal, Mustafa Sevindik. Fairy ring mushroom and biological activities. II. International KORKUT ATA Scientific researches conference, October 7-8, 2023 / Ankara, Turkey, 1064-1069.