

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201990504 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.07.31

(51) Int. Cl. A23K 1/18 (2006.01)
A01K 51/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.03.09

(54) КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПЧЕЛ С ПОМОЩЬЮ ГРИБОВ

(31) 61/967,117; 14/247,207; 62/074,023;
14/641,432

(32) 2014.03.10; 2014.04.07; 2014.11.02;
2015.03.08

(33) US

(62) 201691802; 2015.03.09

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
СТЕЙМЕТС ПОЛ ЭДВАРД (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится множеству полезных факторов экстрактов мицелиев индивидуальных видов грибов и смесей видов для получения средства защиты от множества стрессовых факторов, чтобы помочь пчелам пережить комплекс симптомов, в совокупности называемый синдромом краха колонии (CCD). Более конкретно, в рамках настоящего изобретения используются конкретные концентрации экстрактов чистого культивируемого мицелия образующих плодовое тело грибов для снижения уровня вредоносных вирусов у пчел и увеличения продолжительности жизни пчел.

201990504 A1

201990504

A1

КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПЧЕЛ С ПОМОЩЬЮ ГРИБОВ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/074023, поданной 11/02/2014, в настоящее время находящейся на рассмотрении, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Также настоящая заявка является частичным продолжением патентной заявки США № 14/247207, поданной 04/07/2014, в настоящее время находящейся на рассмотрении, по которой испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США № 61/967117, поданной 03/10/2014, в настоящее время находящейся на рассмотрении, обе из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим экстракты мицелиев видов грибов и их смеси, для обеспечения инструментария защиты от множества стрессовых факторов, чтобы помочь пчелам пережить комплекс симптомов, в совокупности называемый синдромом краха колонии (CCD). Более конкретно, в рамках настоящего изобретения используются конкретные концентрации пригодных для употребления экстрактов чистого культивируемого мицелия образующих плодовое тело грибов для снижения уровня вредоносных вирусов у пчел и для увеличения продолжительности жизни пчел.

[0003] УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Приблизительно 100000 видов насекомых, птиц и млекопитающих вовлечены в опыление цветковых растений. Они включают приблизительно 20000 известных видов пчел. Согласно оценке Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, из чуть более чем 100 сельскохозяйственных культур, которые обеспечивают 90 процентов продовольственных ресурсов для 146 стран, 71 опыляется пчелами (в основном, дикими пчелами), и некоторые другие опыляются трипсами, осаами, мухами, жуками, мотыльками и другими насекомыми. Ежегодная денежная стоимость услуг опыления в мировом сельском хозяйстве может составлять вплоть до \$200 миллиардов. *Protecting the Pollinators, Food and*

Agriculture Organization of the United Nations. Совместная эволюция растений и пчел (виды *Apis*) является фундаментальной для их взаимного выживания. Пчелы распространяют пыльцу, и многие растения в ответ продуцируют обильный нектар.

[0005] Приблизительно 4000 видов пчел являются нативными для Северной Америки. После внедрения европейских (или "западных") медоносных пчел (*Apis mellifera*) в Северной Америке колонистами, коммерческие фруктовые сады и фермы, которые ранее обычно не были способны выжить, стали процветать, хотя многие культуры Нового Света и нативные цветковые растения в основном зависят от опыления нативными видами пчел. Сельское хозяйство Азии также зависит от азиатских (или "восточных") медоносных пчел (*Apis cerana*), хотя, как правило, в меньшем и более региональном масштабе (*A. mellifera* также были внедрены). В целом, в сельском хозяйстве количество фруктовых, ореховых и овощных культур, имеющих пользу от опыления пчелами, является поразительным, как и количество цветковых деревьев, кустарников и диких цветов. Действительно, трудно преувеличить роль пчел в коммерческом производстве продуктов питания. Вымирание пчел, которое происходит в настоящее время, беспрецедентно и представляет огромную угрозу продовольственной безопасности по всему миру. В некоторых областях Китая, например, вымирание пчел потребовало опыления вручную для сохранения культур, что является невероятно трудной задачей.

[0006] Улей медоносных пчел представляет собой теплую, влажную, плотно населенную среду, в которой обитают близкородственные особи - идеальные условия для вирусов, бактерий, грибов, простейших и клещей. Пчелы успешно защищали сами себя в течение миллионов лет от таких угроз посредством уникальных защитных систем на уровне колонии и на индивидуальном уровне и иммунных ответов, однако эти средства защиты могли нарушиться в результате интенсивного одомашнивания европейской медоносной пчелы и множества угроз, включающих новые антропогенные стрессовые факторы, приведших к стремительному снижению количества диких медоносных пчел и нативных пчел в регионах, включающих Северную Америку, Европу и Китай с 1972 по

2006 годы, и к появлению синдрома краха колонии ("CCD") у медоносных пчел в 2006 году.

[0007] Промышленность домашнего пчеловодства зависит от вывода маток – процесса селекции, который обеспечивает линии, подлежащие размножению, и выращивания маток – процесса получения и отбраковки маток медоносных пчел. Значительную часть пчеловодства в США осуществляют 10-15 крупных продуцирующих матки компаний, которые осуществляют обмен генетической информации приблизительно 500 племенных маток. Такое ограниченное генетическое разнообразие может приводить к чувствительности к различным заболеваниям, паразитам или синдрому краха колонии. В частности, выращивание маток нарушается вирусами, особенно вирусом черных маточников и другими вирусами, включая вирус деформации крыла, израильский вирус острого паралича пчел и приблизительно две дюжины других. Ожидается, что будут открыты другие вирусы, которые вызывают заболевания у пчел, включая маток, их потомство, рабочих пчел, пчел-кормилиц и трутней.

[0008] Вымирания колоний и исчезновения пчел происходили на протяжении истории пчеловодства ("апидологии"), включая различные синдромы медоносных пчел в 1880-х, с 1900-х по 1920-е, 1960-х и 1990-х, такие как "болезнь исчезновения", "синдром весеннего истощения", "синдром осеннего истощения", "болезнь осеннего краха" и "таинственная болезнь". В 2006 году некоторые пчеловоды начали сообщать о необычно высоких потерях, составляющих 30-90 процентов их роев. Эта болезнь исчезновения пчел была переименована в "синдром краха колонии" (CCD, иногда называемый спонтанным крахом роя или синдромом Марии Селесты в Великобритании). CCD может быть связан или может не быть связанным с предшествующими синдромами вымирания колоний; он может представлять собой истинно новое нарушение или известное нарушение, которое ранее оказывало только незначительное влияние.

[0009] CCD в настоящее время достигает 30-40% у многих пчеловодов; в случае "больших фермерских хозяйств", где в одном месте содержится вплоть до 84000 ульев, CCD может истреблять

более 60%. Это увеличило стоимость опыления миндальных деревьев, например, от \$25-30 на колонию пчел на от ½ до 1 акра сада с миндальными деревьями в течение 3 недель до более чем \$250. Более 1/3 всего потребления американцами пищи неживотного происхождения зависит от опыления пчелами. Если эта тенденция к росту вымирания колоний продолжится, экономические и социальные расходы могут достигнуть сотен миллиардов долларов.

[0010] Потеря функций, выполняемых пчелами, имеет другие далеко идущие последствия. Например, ним, являющийся источником тысяч популярных продуктов медицинского назначения, косметических продуктов и инсектицидных продуктов, зависит от опыления пчелами, которые не являются подвергнутыми неблагоприятному воздействию. Интересно, что продукты нима, которые содержат активный ингредиент азадирактин, являются пригодными для ограничения или уничтожения клещей, включая клещей *Varroa*, которые передают заболевания пчелам, и включая клещей, которые передают заболевания другим животным и растениям. Если пчелы вымрут, также будет утрачен этот обширный источник продуктов медицинского назначения и природного инсектицида.

[0011] Основными симптомами CCD являются исчезновение рабочего класса (что приводит к малому количеству или отсутствию взрослых "рабочих" пчел в улье), живая матка и от малого количества до отсутствия погибших пчел на территории вокруг колонии. Часто в улье все еще имеется мед, присутствуют незрелые пчелы запечатанного расплода (пчелы обычно не покидают улей до тех пор, пока не произойдет полное вылупление из запечатанного расплода) и улей содержит мед и пчелиную пыльцу, которые не были немедленно разворованы соседними пчелами. Также такой рой является медленным и разворовывается паразитами колонии, такими как восковые огневки или малые ульевые жуки. Клеши *Varroa*, передающие вирус паразит медоносных пчел, часто обнаруживается в ульях, пораженных CCD. Разрушающиеся колонии, как правило, не имеют достаточно пчел для поддержания потомства колонии и имеют рабочих пчел, которые состоят из более молодых взрослых пчел; прогрессирование симптомов может быть быстрым или медленным

(вплоть до двух лет). Колония может иметь богатые запасы пищи и может отказываться употреблять пищу, предоставляемую пчеловодом. См., например, Honey Bees and Colony Collapse Disorder, United States Department of Agriculture Agricultural Research Service (2013).

[0012] Причины увеличения краха колоний являются комплексными и, по-видимому, являются результатом множества факторов. Предполагаемые причины включают увеличение урбанизации и потерю биоразнообразия, в частности, утрата диких лугов и "сорных растений", обеспечивавших высококачественную кормовую базу пчел, плохое питание и нарушение питания, иммунодефициты, микробные патогены, включая вирусы, бактерии, грибы и простейших, как летальное, так и сублетальное воздействие инсектицидов, фунгицидов и гербицидов, используемые пчеловодом митициды и антибиотики, паразитарные клещи (клещи *Varroa destructor* и *V. jacobsoni* и трахеальные клещи *Acarapis woodi*), грибы *Nosema ceranae* и *N. apis*, тяжелые металлы, токсические загрязнители, природные токсины растений, жалящие насекомые, селективное разведение в пчеловодстве и утрата генетического разнообразия, изменение климата, концентрирование ульев и усиление стрессовых факторов внешней среды вследствие засухи и внезапных похолоданий, и комбинации этих факторов. Другим фактором является новый характер коммерческого пчеловодства и изменение практики пчеловодства. В США мало или во многих регионах отсутствуют дикие пчелы, и одомашненные колонии пчел часто доставляются за сто миль от производственных "животноводческих" пасек пчел, что обеспечивает дополнительные стрессовые факторы для здоровья колоний и способствует более широкому распространению инфекций и паразитов среди популяций пчел.

[0013] Хотя точную причину(ы) и механизмы CCD еще предстоит выяснить, по-видимому, является важной комбинация стрессовых факторов, в частности 1) микробные вирусные и грибные патогены, такие как израильский вирус острого паралича ("IAPV"), вирус черных маточников ("BQCV") и вирус деформации крыла ("DWV") и *Nosema* (патогенные грибы); 2) паразитические клещи (в частности,

клещи *Varroa*); 3) пестициды в летальных или сублетальных дозах, включая неоникотиноидные инсектициды (такие как клотианидин, тиаметоксам и имидаклоприд) и используемые пчеловодами митициды ("ВАМ") и другие стрессовые факторы окружающей среды; 4) стрессовые факторы ведения пчеловодства, включая увеличение вирусного обмена от транспортируемых пчел (в частности, при миграции опыления миндаля средней зимы в Калифорнию), и 5) рационы медоносных пчел, включающие применение заместителей меда и воздействие пыльцы низкой питательной ценности в противоположность нативной многообразной пыльце и нектару высокой питательной ценности. Исследования указывают на то, что рационы медоносных пчел, паразиты, заболевания и множество пестицидов взаимодействуют, обеспечивая более выраженные отрицательные эффекты на контролируемые колонии медоносных пчел, в то время как ограничение питательных веществ и воздействие сублетальных доз пестицидов, в частности, может изменять чувствительность к или степень тяжести паразитов и патогенов пчел. Pettis et al., Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*, *PLOS ONE*, опубликовано: 24 июля 2013 года, DOI: 10.1371/journal.pone.0070182.

СИСТЕМА ЗАЩИТЫ И ИММУННАЯ СИСТЕМА МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ:

[0014] Колонии пчел могут инфицироваться несколькими видами паразитов или заболеваний в любое время, однако иммунные системы на уровне колоний и на индивидуальном уровне, как правило, справляются с инфекциями (за возможным исключением паразитических клещей *Varroa destructor*) при условии, что условия внешней среды являются благоприятными. В случае краха колоний, эта обычно эффективная иммунная функция явно дает сбой. После внедрения паразитарного ненативного клеща *Varroa destructor* в 1987 году в США и его обильного распространения в популяциях пасек, пчелы в настоящее время столкнулись с беспрецедентными угрозами от этих доставляющих вирус членистоногих – борьба с вирусами, которые они вносят, посредством иммунной системы ослабляется воздействием комплексных коктейлей ксенобиотических токсинов. Это стечение

стрессовых факторов является формулой бедствия и является эволюционно беспрецедентным. Дополнительными стрессовыми факторами являются утрата биоразнообразия растений, поскольку леса вырубаются, сорняки удаляются и монокультурные агропромышленные фермы сглаживают нативные ландшафты. Пчелы, как одомашненные, так и дикие, являющиеся основными опылителями, находятся под атакой с множества направлений. Уже сообщалось о вымирании пчел некоторых регионов Китая и, ожидается, что оно будет происходить с возрастающей частотой по всему миру.

[0015] Медоносные пчелы имеют многочисленные физические, химические и поведенческие средства защиты на уровне локальной популяции, колонии улья, клетки и особи. Первая линия защиты на уровне колонии и особи состоит в препятствовании закреплению паразитов – пчелы тратят большие количества энергии на кооперативное поведение "социального иммунитета", включающее чистку их поверхностей организма (как собственная чистка, так и чистка других особей улья), кооперативное гигиеническое поведение для обнаружения и устранения заболевших потомков и трупов взрослых пчел из улья, очистку внутренней полости гнезда и стерилизацию всех поверхностей антимикробными секретами их слюны (такими как глюкозооксидаза) и использование (иногда называемое "воровством") компонентов иммунной системы растений путем сбора в высокой степени противомикробных смол, находящихся на почках и в ранах листьев, включение их в прополис и использование прополиса для формирования противомикробного барьера вокруг колонии, включая интенсивное использование на входе, покрытие внутренних поверхностей полости и поверхности сот и заделывание трещин и щелей.

ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ СИСТЕМНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ:

[0016] Насекомые обладают врожденным иммунитетом, который характеризуется неспецифическими иммунными реакциями против вторгшихся патогенов, между тем как они лишены комплексного "адаптивного" или "приобретенного" иммунитета, такого как образование антител, специфичных к новым патогенам. Механизм защиты у насекомых состоит из клеточного и гуморального иммунитета. В клеточном механизме защиты плазмоциты и

гранулоциты являются основными гемоцитами, которые реагируют с чужеродными вторгающимися организмами посредством либо фагоцитоза и/либо инкасулирования. Отличительным признаком гуморальных реакций являются синтез и секреция противомикробных пептидов (AMP), которые накапливаются в гемолимфе и прямо лизируют чужеродные микробные клетки и ингибируют активность ферментов, необходимых для репликации патогенов. См. Yoshiyama, *Innate immune system in the honey bee*, Honey Bee Research Group, National Institute of Livestock and Grassland Science. Этот "индуцированный" ответ противомикробных пептидов может длиться неделями и, по-видимому, эти пептиды могут передаваться другим членам гнезда, сообщая резистентность до инфекции. Oliver, *Sick Bees - Part 3: The Bee Immune System*, American Bee Journal, October 2010.

[0017] Противовирусный ответ пчел основан на РНК-интерференции (РНК-*i*). РНК-*i* "подавляет" экспрессию генов между транскрипцией генетического кода и его трансляцией в функциональные белки. МикроРНК (мкРНК, малые некодирующие РНК, которые функционируют в сетях кодирующих белки генов и клеточных физиологических процессах посредством транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов) и малая интерферирующая РНК (миРНК, короткие двухцепочечные фрагменты) связываются со специфическими молекулами матричной РНК (мРНК) и повышают или снижают их активность, например продукцию белка или защиту клеток от вирусных нуклеотидных последовательностей. миРНК являются высококонсервативным эволюционно древним компонентом генетической регуляции, встречающимся во многих эукариотических организмах.

[0018] РНК-*i* инициируется ферментом Dicer, который расщепляет длинные двухцепочечные молекулы (дцРНК) на короткие двухцепочечные фрагменты миРНК. Каждая миРНК расплетается на две одноцепочечные оцРНК: пассажирскую цепь и направляющую цепь. Направляющая цепь включается в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC). После встраивания в RISC миРНК образуют пары с их мРНК-мишенью и расщепляют ее, тем самым препятствуя ее использованию в качестве матрицы для трансляции. Когда дцРНК

является экзогенной (например, является результатом инфекции вирусом), РНК импортируется непосредственно в цитоплазму и расщепляется на короткие фрагменты посредством Dicer.

[0019] Пчелы обладают большим количеством компонентов каскада РНК-*i*, чем мухи и, по-видимому, у них легче индуцируется системный ответ РНК-*i*, чем у мух. Из этого следует, что пчелы должны быть довольно способными к борьбе с вирусами и, вероятно, с другими патогенами посредством нокдауна, основанного на двухцепочечных РНК, экспрессируемых патогенами генов (Evans/Spivak 2009). Следует отметить, что эта форма ответа на вирусную атаку обеспечивает длительную память, аналогичную той, что является результатом антител, продуцируемых у млекопитающих. Oliver, Sick Bees - Part 4: Immune Response to Viruses, American Bee Journal, November 2010.

ВИРУСЫ, НОЗЕМЫ И МИКРОБНЫЕ ПАТОГЕНЫ

[0020] Пчелы являются хозяевами для по меньшей мере 18 вирусов, причем практически все из них являются одноцепочечными РНК-вирусами. Некоторые являются "новыми" патогенами, такими как вирус деформации крыла и вирус острого паралича пчел, которые ранее считались "экономически несущественными" (Genersch 2010), а затем с появлением *Varroa* в качестве вектора, начали заметно опустошать колонии. Oliver, Sick Bees - Part 4: Immune Response to Viruses, American Bee Journal, November 2010.

[0021] Вирусные заболевания включают вирус хронического паралича (CPV), вирус острого паралича пчел (ABPV), израильский вирус острого паралича (IAPV), кашмирский вирус пчел (KBV), вирус черных маточников (BQCV), вирус затемненного крыла (CWV), вирус мешотчатого расплода (SBV), вирус деформации крыла (DWV), вирус Какуго, радужный вирус беспозвоночных 6 типа (IIV-6), вирусы озера Сенай (LSV1 и LSV2) и вирус кольцевой пятнистости табака (TRSV). Среди этих вирусов присутствует множество подтипов, вирулентность которых в отношении пчел исследуется в настоящее время. Вероятно, будут открыты более патогенные вирусы. Совместное появление более чем одного интернализованного вируса далее ухудшает иммунологическое здоровье пчел. "Мне неизвестно никакого эффективного противовирусного способа

лечения на рынке для борьбы со спектром вирусов, о которых известно, что они встречаются у пчел" - Dr. Walter "Steve Sheppard, Chair, Department of Entomology, Washington State University, Pullman, Washington (личное сообщение)". Таким образом, существует потребность в перспективных средствах лечения, которые являются нетоксичными, но в то же время активными против более чем одного вируса.

[0022] Пчелы также являются подверженными переключению хозяев патогенов. Вирус кольцевой пятнистости табака может реплицироваться и продуцировать вирионы в медоносных пчелах *Apis mellifera*, что приводит к инфекциям во всем организме, включая обширную инфекцию нервной системы и, вероятно, влияет на выживаемость колоний. TRSV также был обнаружен в слепом отростке средней кишки клещей *Varroa*, что указывает на то, что клещи *Varroa* могут способствовать распространению TRSV у пчел, одновременно избегая системной инвазии. Li et al., Systemic Spread and Propagation of a Plant-Pathogenic Virus in European Honeybees, *Apis mellifera*, *mBio* 5(1):e00898-13. doi:10.1128/mBio.00898-13. Вирус, впервые обнаруженный в инфицированном табаке, распространяется через инфицированную пыльцу множества видов растений, включая сою и многочисленные культуры, сорняки и декоративные растения.

[0023] *Nosema apis* является микроспоридием, недавно переклассифицированным в грибок, который вторгается в кишечный тракт взрослых пчел и вызывает заболевание *Nosema*, также известное как нозематоз. Инфекция *Nosema* также ассоциирована с вирусом черных маточников и кашмирским вирусом пчел. *Nosema ceranae* становится растущей проблемой как для азиатских медоносных пчел *Apis cerana*, так и для западных медоносных пчел.

[0024] некоторые вирусы медоносных пчел (DWV и KBV) и грибы *Nosema ceranae* способны инфицировать другие виды пчел и ос, и, возможно, клетки кишечника *Varroa*; вероятно, медоносные пчелы являются источником патогенов шмелей. Fürst et al., Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators, *Nature*, Volume:506, 364-366, (2014). Этот новый вектор от пчелы к пчеле мог быть переломной точкой,

вызывавшей широкомасштабный коллапс многих нативных видов пчел, последствия которого выходят за рамки контроля или воображения. Исходя из исторической и биологической перспективы, это является "авральным" моментом. То, что эволюция обеспечивала в течение миллионов лет, может быть утрачено за десятилетия вследствие вмешательств людей, мотивы которых имеют кратковременную перспективу за счет долговременной.

[0025] Бактериальные заболевания пчел включают американский гнилец пчел (AFB), вызываемый *Paenibacillus larvae*, и европейский гнилец пчел (EFB), вызываемый бактериями *Melissococcus plutonius*. Грибные заболевания включают аскосфероз, вызываемый *Ascosphaera apis*, и каменный расплод – грибное заболевание, вызываемое *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* и *Aspergillus niger*. Ожидается, что также могут одновременно присутствовать или стать основной причиной заболеваний пчел в будущем новые, еще не идентифицированные грибные патогены, по мере того, как люди будут далее изменять естественную среду и вызывать непреднамеренные последствия применения трансгенных культур, более широко известных как ГМО – генетически модифицированные организмы. Такие потенциальные грибные патогены включают *Candida*, *Cryptococcus*, *Coccidioides* и другие подобные дрожжам организмы. Тем не менее, многие из этих так называемых патогенов, особенно, например, преспурулирующие формы энтомопатогенных грибов, обладают свойствами, которые могут обеспечивать пользу насекомым, в том числе пчелам, при условии, что их эндогенные токсины удалены, уменьшены в количестве или изменены так, чтобы не вредить пчелам, тем самым, снижая угрозу пчелам от вызывающих заболевание, переносящих заболевание или распространяющих заболевание организмов.

[0026] Все медоносные пчелы инфицируются более чем одним видом бактерий, включая полезных эндосимбионтов, которые обеспечивают защиту от дрожжей, аскосфероза и гнильца. Очевидно, что здоровые пчелы также могут быть инфицированы более чем одним видом вируса. Динамика взаимодействий пчела-бактерии, пчела-вирус и вирус-вирус является комплексной и малопонятной. Определенные вирусы пчел могут повышать вирулентность других

вирусов, в то время как некоторые вирусы пчел могут конкурентно подавлять репликацию других. Также еще вероятно существуют взаимосвязи бактерии-бактерии, бактериофаг-бактерии, грибы-бактерии и грибы-вирус, которые ученым еще предстоит выявить. Многие вирулентные вирусы пчел могут существовать в виде "неявной" инфекции – можно обнаружить присутствие вируса у пчел, однако отсутствуют заметные отрицательные эффекты вследствие инфекции. Инфекция вторым вирусом или другой стрессовый фактор могут привести к тому, что покоящийся вирус начнет реплицироваться. Ряд исследователей обнаружили, что одно только действие клещей *Varroa*, кормящихся на пчелах (которое включает инъекцию иммунодепрессантов клещом) может индуцировать или активировать репликацию неявных или обычно непатогенных вирусных инфекций. Исследования иммунных ответов также показали, что клещи и вирусы могут изменять уровни транскриптов связанных с иммунитетом генов у их соответствующих хозяев. Для разрушающихся колоний является распространенным одновременное инфицирование тремя или четырьмя вирусами, клещами *Varroa*, *Nosema* (*ceranae* и особенно *apis*) и трипаносомами. См. Oliver, Sick Bees – Part 3: The Bee immune System, American Bee Journal, October 2010.

[0027] *Crithidia bombi* представляют собой простейшее, относящееся к трипаносоматидам, являющееся паразитом пчел, о котором известно, что оно оказывает серьезные эффекты на шмелей, в частности, в условиях голодания. Родственные *Crithidia mellificaе* могут вносить вклад в смертность у медоносных пчел. Ravoet et al., Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals *Crithidia mellificaе* as a New Contributory Factor to Winter Mortality (2013), PLoS ONE 8(8): e72443.

КЛЕЩИ VARROA И ДРУГИЕ ПАРАЗИТЫ:

[0028] *Varroa destructor* и *Varroa jacobsoni* представляют собой паразитических клещей, питающихся жидкостями организма взрослых пчел, куколок и личинок. *Acarapis woodi* представляет собой трахеального клеща, который заражает дыхательные пути медоносной пчелы. Азиатские паразитические гнездовые клещи *Tropilaelaps clareae* и *T. mercedesae* считаются серьезной потенциальной угрозой для медоносных пчел, хотя на настоящий

момент они не встречаются в США или Канаде.

[0029] Азиатские медоносные пчелы *Apis cerana* являются природным хозяином для клеща *Varroa jacobsoni* и паразита *Nosema ceranae*. Поскольку они эволюционировали совместно с этими паразитами, *A. cerana* осуществляют более тщательную чистку, чем *A. mellifera*, и, таким образом, имеют более эффективный механизм защиты от *Varroa* и *Nosema*, которые становятся все более серьезными паразитами западной медоносной пчелы.

[0030] Клещи *Varroa*, разрушающие гигиенические, механические и физиологические барьеры пчел против инвазии, все в большей степени действуют в качестве вектора для вирусов, также вызывая значительный стресс у пчел. Широко распространенное вымирание колоний описано только для стран, в которых *Varroa* является проблемой (Neumann 2010). Колонии без клещей могут быть свободными от вирусов (Highfield 2009), однако вплоть до 100% колоний с *Varroa* могут быть инфицированными одним или несколькими вирусами, даже если отсутствуют заметные симптомы (Tentcheva 2004). Oliver, Sick Bees - Part 1, American Bee Journal, Aug 2010.

[0031] Было обнаружено, что клещи *Varroa* являются значительно более чувствительными к кислотам, чем медоносные пчелы. Органические кислоты, такие как щавелевая кислота, муравьиная кислота и молочная кислота, можно использовать в качестве "природных митицидов" или средств обработки против клещей в улье, поскольку все они естественным образом содержатся в меде. Щавелевую кислоту, как правило, смешивают с дистиллированной водой для предупреждения образования солей, что обеспечивает кислый раствор с pH часто <1. То, что пчелы могут переносить такие низкие значения pH, в то время как клещи не могут, имеет значение. Щавелевая кислота захватывает кальций и другие минералы из экзоскелета клещей, образуя оксалаты. Когда прямой контакт щавелевой или муравьиной кислоты с хитин-подобным экзоскелетом клещей вытягивает кальций, экзоскелет ослабевает, что, таким образом, делает клещей чувствительными к другим стрессовым факторам, включая, но не ограничиваясь ими инфекцию или воздействие токсинов энтомопатогенных грибов.

[0032] Помимо известных паразитов-насекомых, таких как большая и мелкая восковая моль и малый ульеый жук, угрозой медоносным пчелам могут стать горбатки, о которых ранее было известно, что они являются паразитами шмелей. Core et al., A New Threat to Honey Bees, the Parasitic Phorid Fly *Apoccephalus borealis* (2012), *PLoS ONE* 7(1): e29639. doi:10.1371/journal.pone.0029639; Ravoet, выше.

ПЕСТИЦИДЫ:

[0033] Пестициды вызывают множество форм стресса у пчел. Сельскохозяйственное опрыскивание может влиять на медоносных пчел, и крупномасштабные программы опрыскивания от москитов, непарников, листоверток еловых и других паразитов-насекомых вызывает прямое или не прямое уничтожение пчел, включая нативных шмелей и одиночных пчел. Также происходит переключение используемых типов пестицидов – многие, такие как неонитиноиды, являются менее токсичными для позвоночных, и необходимость в их многократном применении снижена, однако они действуют системно и всасываются и распределяются по растению при обработке семян и почвы, включая распределение в пыльцу и нектар.

[0034] Было обнаружено, что сублетальное воздействие пестицидов, включая воздействие холинэргических неонитиноидных инсектицидов (агонисты никотиновых рецепторов) и/или холинэргических митицидов на основе фосфорорганических соединений (ингибиторы ацетилхолинэстеразы), изменяют активность, развитие, кладку яиц, поведение, соотношение полов потомков, способность к полету и подвижность, способность к навигации и ориентации, пищевое поведение, обучение, память и иммунную функцию, популяционную динамику и увеличение предрасположенности и смертности пчел от заболеваний, включая *Nosema*. См., например, Pettis, Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*, выше на 1. Фунгициды и митициды, используемые пчеловодами, могут иметь выраженное влияние на способность пчел выдерживать паразитическую инфекцию, Pettis, выше на 4. Часто пчелы подвергаются воздействию нескольких

пестицидов, которые могут иметь эффект взаимодействия. См., например, Di Prisco et al., Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees, PNAS vol. 110, no. 46, Nov. 12, 2013, 18466-18471; Pettis et al., Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*, PLoS ONE (2013); Palmer et al., Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees, Nature Communications, 4:1634, (2013); Williamson et al., Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees, The Journal of Experimental Biology 216, 1799-1807 (2013); Derecka et al., Transient Exposure to Low Levels of Insecticide Affects Metabolic Networks of Honeybee Larvae, PLoS ONE 8(7), e68191 (2013), doi:10.1371/journal.pone.0068191.

[0035] Воздействие фунгицидов также уничтожает или снижает количество полезных грибов, находящихся на пыльце – результатом чего, вероятно, является более высокая встречаемость заболеваний у медоносных пчел, включая инфекции *Nosema* и аскосфероз (по иронии, грибное заболевание).

[0036] Геном пчел имеет относительно мало генов, которые связаны с детоксикацией, по сравнению одиночными насекомыми, такими как мухи и комары. Некоторые из наиболее выраженных различий между пчелами и другими насекомыми находятся в трех суперсемействах, кодирующих ксенобиотические детоксифицирующие ферменты. В то время как большинство геномов других насекомых содержит 80 или более генов цитохрома P450 (CYP), *A. mellifera* имеют только 46 гена цитохрома P450, между тем как у человека имеется 60 генов CYP. Медоносные пчелы имеют только приблизительно половину глутатион-S-трансфераз (GST) и карбоксил/холинэстераз (CCE) по сравнению с большинством геномов насекомых. Это включает нехватку в 10 раз или более дельта- и эпсилон-GST и CYP4 P450, причем представителей этих клад связывают с устойчивостью к инсектицидам в других видах. Claudianos et al., A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the

honeybee, *Insect Molecular Biology*, 15(5), 615-636 (2006).

[0037] В то время как пчелы эволюционировали, чтобы справляться с фитохимикатами растений и природными токсинами, в настоящее время они, кроме того, должны метаболизировать и детоксифицировать антропогенные инсектициды, митициды, гербициды, фунгициды и загрязнители внешней среды, что является беспрецедентной эволюционной нагрузкой.

КОНТРОЛЬ СТРЕССОРНЫХ ФАКТОРОВ ПЧЕЛОВОДСТВА

[0038] Применение заместителей меда или пыльцы (таких как сахарный сироп; кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы; пчелиный леденец; "лепешки из жира", содержащие жир, сахар и необязательно соль или эфирные масла; или "лепешки из пыльцы", содержащие сою, дрожжи и обезжиренное сухое молоко, в которые может быть добавлена пыльца, возможно из областей, загрязненных пестицидами) может быть фактором, вносящим вклад в снижение популяций пчел и CCD по нескольким причинам. Нарушение питания, вероятно, является основным фактором снижения популяций пчел. Синтезированные рационы пчел попросту не обеспечивают питательной ценности, получаемой пчелами из смеси качественной пыльцы. Хотя качественные белки, углеводы и витамины могут быть предоставлены медоносным пчелам в лаборатории, все еще невозможно поддерживать их живыми в условиях изоляции в течение более двух месяцев на самых лучших рационах; в неволе они, как правило, живут, в среднем приблизительно 30 суток. Garvey, About Bee Nutrition..., Posts Tagged: from the UC Apiaries newsletter-The California Backyard Orchard.

[0039] Мед содержит несколько веществ, которые активируют распознавание питательных веществ, метаболизм, детоксикацию и иммунные процессы у европейских медоносных пчел *Apis mellifera* плюс другие химические вещества, полезные для здоровья медоносных пчел. На стенках опыляемых цветов встречаются ферменты, и они попадают в мед посредством прилипания к конечностям пчел. Также известно, что употребление смол деревьев, смолистых растительных жидкостей и древесных соков путем включения в прополис или пчелиный клей снижает

чувствительность пчел как к инсектицидам, так и к микробным патогенам, и повышает транскрипцию генов, ответственных за детоксикацию. Заместители меда или лепешки из пыльцы, которые не содержат этих химических веществ, могут, таким образом, вносить вклад в синдром краха колонии. См. Mao, Wenfru, Schuler, Mary A. and Berenbaum, May R., Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 110(22), 8842-8846 (2013). Mao et al. обнаружили, что компоненты меда, происходящие из пыльцы и экссудатов деревьев, включая *п*-кумаровую кислоту (=4-гидроксикоричная кислота), пиноцембрин, пинобанксин и 5-метилловый эфир пинобанксина, являются мощными индукторами генов цитохрома P450, осуществляющих детоксикацию через ряд представителей семейств CYP6 и CYP9. Массово-параллельное секвенирование РНК и анализ РНК-seq показал, что *п*-кумаровая кислота специфически активирует все классы генов детоксикации, а также отдельные гены противомикробных пептидов, требуемых для защиты от пестицидов и патогенов.

[0040] Те виды медоносных пчел, которые гнездятся в дуплах деревьев, используют прополис для закрытия трещин в ульях, также как и пчелы в ульях одомашненных пчел, хотя дикие медоносные пчелы покрывают всю внутреннюю поверхность в их гнездовом дупле, в то время как одомашненные медоносные пчелы откладывают сравнительно мало смолы в пчеловодческих ульях. Было продемонстрировано, что покрытие из прополиса ингибирует AFB (Antúnez 2008), грибы и восковые огневки; Spivak продемонстрировал, что прополис из некоторых регионов является эффективным против *Varroa* и в настоящее время изучает его эффект на вирусы. Значительный интерес представляют данные (Simone 2009) о том, что обилие прополиса, по-видимому, снижает необходимые усилия для иммунной функции пчел – таким образом, колония пчел, посредством самолечения противомикробными химическими реагентами из растений, подвергается меньшим метаболическим затратам для борьбы с патогенами. Oliver, Sick Bees – Part 3: The Bee Immune System, American Bee Journal,

October 2010.

МЕДВЕДИ, ГРИБЫ И ПЧЕЛЫ:

[0041] Автор изобретения заметил, во время одного из его многих посещений реликтовых лесов Olympic Peninsula, Washington State, елку, поцарапанную медведем (фотография представлена в книге, автором которой он является: *Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World*, 2005, pg.70, figure 75. Ten Speed Press, Berkeley). В научной литературе, касающейся взаимодействиям между медведями и грибами, утверждается, что виды *Fomitopsis*, древесные трутовики коричневой гнили, включая часто встречаемый *Fomitopsis pinicola* и редко встречаемый *Fomitopsis officinalis*, были наиболее распространенными видами грибов, которые росли после нанесения медведем царапин в хвойных лесах Тихоокеанского северо-запада и в других местах. Ученые, изучающие леса, показали, что, когда медведи царапают живое дерево, они оставляют открытую рану и виды *Fomitopsis* оппортунистически получают область для вхождения инфекции. После оцарапывания богатая сахаром смола часто просачивается в качестве капель, привлекательных для медведей и пчел. Действительно, когда автор вернулся через несколько лет к тому же оцарапанному медведем дереву глубоко в реликтовых лесах вдоль южной ветви реки Хох, грибы *Fomitopsis pinicola* плодоносили из теперь упавшего дерева.

[0042] "На молодых хвойных деревьях, в частности, калифорнийской пихте, медведи сдирают полосы коры зубами, чтобы добраться до насекомых или сладкого сока, находящихся внутри. Зубы медведя оставляют длинные вертикальные борозды в заболони, и вокруг оснований деревьев, которые они обдирают, встречаются крупные полосы коры. Эти отметины, как правило, наносятся с апреля по июль, однако результаты можно наблюдать круглый год. Эта активность добывания является частой на плантациях деревьев, где большие группы деревьев имеют сходный возраст и относятся к одному виду". Link, *Living with Wildlife: Black Bears*, Washington State Dept. of Fish and Wildlife.

[0043] По этой причине за медведей была назначена награда заинтересованными в лесе сторонами, поскольку полагали, что

медведи снижают прибыльность производства из лесов пиломатериалов. Охотниками, нанятыми компаниями по заготовке пиломатериалов, были убиты десятки тысяч медведей. В 1990-х было открыто, что медведи в действительности приносят пользу лесам, доставляя морские минералы, в частности, фосфор и азот, вследствие их добычи лосося и форели в реках, соседних с лесами. Одной из причин того, что низинные реликтовые леса значительно больше, чем реликтовые леса на возвышении на несколько тысяч футов выше пределов досягаемости мигрирующей рыбы, является то, что медведи приносят останки рыб на берег, доставляя соседним деревьям полезный фосфор и другие минералы, которые влияют на рост деревьев. Люди часто склонны к принятию решений, противоположных их долгосрочным наибольшим интересам, вследствие фундаментального непонимания взаимосвязанности в природе.

[0044] В Stamets, *Growing Gourmet и Medicinal Mushrooms*, 1993, р. 42-43, автор настоящего изобретения утверждает: "В течение 6 недель одного лета пчелы атаковали грибницу королевской строфарии, обнажая мицелий для воздействия воздуха и высасывали обогащенную сахарами цитоплазму из ран. Можно было отследить непрерывный конвой пчел с утра до вечера от наших ульев до грибного участка, до тех пор, пока грибница королевской строфарии буквально не была разрушена. Когда сообщение об этом феномене было опубликовано в *Narrowsmith Magazine* (Ingle, 1988), пчеловоды Северной Америки написали мне, чтобы сообщить, что они давно озадачены влечением пчел к кучам опилок". Хотя специалисту в данной области может не быть очевидно, то ли пчел привлекал мицелий, то ли лигнин в древесных опилках или древесные смолы в опилках, автор изобретения заключил "Теперь очевидно, что пчелы искали расположенный ниже сладкий грибной мицелий".

[0045] Требуется срочное решение проблем ухудшения здоровья пчел и синдрома краха колоний.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0046] Автор настоящего изобретение считает, что объединение и взаимодействие нескольких микологических способов и композиций являются возможным комплексным решением проблемы

CCD. Каждый из этих элементов может быть достаточным для обеспечения эффекта, приводящего к предупреждению или снижению CCD. В качестве комплексной платформы частичных решений, совокупность этих способов достигнет синергической пользы. Более конкретно, настоящее изобретение сфокусировано на противовирусных и повышающих продолжительность жизни эффектах экстрактов чистого культивируемого мицелия, разбавленного до конкретных диапазонов, которые являются полезными для пчел.

[0047] Основы этих композиций и способов включают внеклеточные экссудаты и экстракты, полученные из них, чистого культивируемого мицелия до формирования плодового тела в видах грибов Agaricales, Polyporales и Hymenochaetales в комбинации или независимо. Преконициальный мицелий и экстракты преконициального мицелия энтомопатогенных грибов необязательно можно использовать для контроля клещей и других паразитов пчел и ульев. Смеси этих экстрактов и продуктов для пчел, таких как корм для пчел и спреи для обработки пчел, обеспечивают множество решений, помогающих предотвратить CCD или помогающих пчелам преодолеть CCD. Рациональные решения проблем, приносящих вред пчелам, являются результатом стимуляции их природной защиты посредством улучшения условий обитания с помощью полезных грибов, например, путем внесения формирующих плодовые тела грибов, которые обладают противовирусными свойствами, в древесину, обеспечения гниения и в конечном итоге увлажнения гнездовых дупел, которые могут быть полезными для пчел.

[0048] Автор изобретения выделил различные штаммы формирующих плодовые тела грибов, включая *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* и *Psilocybe azurescens*, которые продемонстрировали улучшенную способность к "биоремедиации" или "микоремедиации" различных токсинов, включающих нефть, пестициды и нервные газы, такие как зарин, зоман и VX (диметилметилфосфонат), работая с Battelle Laboratories, и открытый отчет по этой теме был опубликован в Jane's Defence Weekly (Fungi could combat chemical weapons, *Jane's Defence Weekly*, 1999. 32(7):37.)

[0049] Автор изобретения также выделил различные штаммы грибов, включая *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma annularis*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Irpex lacteus*, *Phellinus linteus*, *Piptoporus betulinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus umbellatus*, *Schizophyllum commune* и *Trametes versicolor*, которые продемонстрировали улучшенные противовирусные, антибактериальные, противогрибные и антипротозойные свойства.

[0050] Без связи с какой-либо теорией, автор настоящего изобретения полагает, что эти виды грибов обогащены соединениями, которые активируют гены для детоксикации и защиты от загрязнителей, пестицидов и патогенов у животных, включая человека и пчел. Путем многократного культивирования и расширения неспорулирующих секторов энтемопатогенных грибов, автор изобретения также открыл, что такой "преспорулирующий" или "преконициальный" мицелий и экстракты преконициального мицелия испускают запахи и ароматы (в диапазоне от "ириски" *Metarhizium anisopliae* и *Aspergillus flavus* до "ванильной колы" и "рождественского леденца" *Beauveria bassiana*), и их вкусы являются привлекательными для животных, в том числе человека и как несоциальных, так и социальных насекомых, что обеспечивает преимущества для борьбы с паразитами, такими как клещи *Varroa*.

[0051] Далее, автор изобретения полагает, что колонизация *Fomitopsis* древесины вследствие добывательства медведей и попадание их в область раны (см. выше) приводит к продуцированию ферментов (лаказы, лигнинпероксидазы, целлюлазы), эргостеринов и других стеридов, микофлавоноидов и особенно ряда питательных комплексных полисахаридов, которые размягчают древесину, обеспечивают воду, питательные вещества и испускают ароматы, все из которых привлекают пчел, в то время как внеклеточные экссудаты, секретлируемые мицелием, могут быть обогащены п-кумаровой кислотой и кумаринами и гликозидами незамещенных и замещенных бензойной, коричной и кумаровой кислот, все из которых стимулируют активацию генов и ферментов природного цитохрома р450 и также обеспечивают противовирусные и

антибактериальные средства, все из которых экспрессируются в процессе разложения инфицированного дерева. Происходит экссудация комплексного грибного нектара, что обеспечивает физиологическую пользу и усиливает врожденный иммунитет пчел через многочисленные каскады по мере того, как деревья разлагаются. В некоторых случаях пчелы гнездятся в этих бревнах или в почве под ними, получая пользу длительного контакта. Затем пчелы могут включать эти полезные вещества в их мед, прополис и соты, чтобы защитить потомство, матку и в итоге колонию.

[0052] Также автор изобретения полагает, что комбинации видов грибов, описанных выше и ниже, включая, но не ограничиваясь ими, находящиеся в них фенолы, могут иметь аддитивные или даже синергические последствия, включая регуляцию и активацию распознавания питательных веществ, метаболизма, детоксикации, иммунитета и генов и систем противомикробных пептидов. Настоящее изобретение выступает непосредственно в поддержку связи между контактами пчел с грибами, которые являются полезными, не только с точки зрения питательности, но особенно с точки зрения активации каскадов цитохрома P450 для дезактивации и метаболизма ксенобиотиков и антропогенных токсинов.

[0053] Настоящее изобретение относится к множеству частичных решений для предоставления ученым, фермерам, биотехнологам, политическим деятелям и идейным лидерам биологических инструментов в виде практических и масштабируемых лекарственных средств до того, как экологическая катастрофа приведет человечество к как никогда ограниченным возможностям по мере того, как биоразнообразие снизится. Комбинации этих частичных решений кумулятивно и синергически обеспечат то, что необходимо пчелам для преодоления CCD.

[0054] Было обнаружено, что экстракты *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Inonotus obliquus* *Ganoderma resinaceum* (*Ganoderma lucidum* var. *resinaceum*) и *Schizophyllum commune* являются эффективными в отношении вирусной нагрузки у медоносных пчел и продления жизни рабочих пчел. "Будучи энтомологом с

опытом исследования пчел, составляющим 39 лет, мне неизвестны никакие сообщения о материалах, которые продлевают жизнь рабочих пчел больше, чем это" - Dr. Walter "Steve Sheppard, Chair, Department of Entomology, Washington State University, Pullman, Washington (личное сообщение). Теперь автор изобретения предполагает, в качестве следствия изобретения, что другие лесные трутовые грибы, например, березовый трутовик, *Piptoporus betulinus*, и многочисленные другие лесные виды могут иметь более высокие или менее высокие противовирусные и повышающие длительность жизни эффекты на здоровье пчел, когда экстракты чистого культивируемого мицелия получают и разбавляют до оптимального диапазона, и предоставляют в качестве пищи, в питьевой воде, в меде, в лепешках из пыльцы, прополисе, или даже включают в древесные рамы, используемые для конструирования пчелиных ульев или включают в липкие полоски, наклеиваемые на пчелиные улья. Преобладающими представляющими интерес видами вирусов являются вирус деформации крыла, вирус мешотчатого расплода, израильский вирус острого паралича и вирус черных маточников, каждый из которых может усиливать активность других вирусов и патогенов, поскольку иммунитет не выдерживает вредоносного кумулятивного эффекта этих и других множественных стрессовых факторов.

[0055] Как заметил Альберт Эйнштейн, "мы не можем решить наши проблемы, размышляя тем же путем, которым мы создали их". Данный патент следует этой философии, предлагая комплексную платформу синергических решений, направленных на множество проблем, которые в конечном итоге помогут пчелам преодолеть синдром краха колонии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0056] На фиг.1 представлен линейный график, демонстрирующий процентную выживаемость пчел с течением времени, которым давали экстракты мицелия *Inonotus obliquus* (0,1%, 1% и 10%) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром.

[0057] На фиг.2 представлен линейный график, демонстрирующий процентную выживаемость пчел с течением времени,

которым давали экстракты мицелия *Ganoderma resinaceum* (0,1%, 1% и 10%) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром.

[0058] На фиг.3 представлен линейный график, демонстрирующий процентную выживаемость пчел с течением времени, которым давали экстракты мицелия *Fomitopsis pinicola* (0,1%, 1% и 10%) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром.

[0058] На фиг.4 представлен линейный график, демонстрирующий процентную выживаемость пчел с течением времени, которым давали экстракты мицелия *Fomes fomentarius* (1%) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром.

[0060] На фиг.5 представлена оценка выживаемости с помощью графика Каплана-Мейера (ограничение продукта), демонстрирующая долю пчел, выживших с течением времени, когда им давали экстракты *Fomes fomentarius* (0,1%, 1% и 10%) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром.

[0061] На фиг.6 представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая общий уровень вирусных частиц в контрольной популяции и у пчел, которым давали экстракты мицелия *Inonotus obliquus* (0,1%, 1% и 10%) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром в нулевой момент времени, через одну неделю и две недели.

[0062] На фиг.7 представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая общий уровень вирусных частиц в контрольной популяции, которую кормили только водой с сахаром, и у пчел, которым давали экстракты мицелия *Ganoderma resinaceum* (0,1%, 1% и 10%) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией в нулевой момент времени, через одну неделю и через две недели.

[0063] На фиг.8 представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая общий уровень вирусных частиц у пчел, которым давали экстракты мицелия *Fomitopsis pinicola* (0,1%, 1% и 10%) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром в нулевой момент времени и через

одну неделю.

[0064] На фиг.9 представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая общий уровень вирусных частиц у пчел, которым давали экстракты мицелия *Schizophyllum commune* (0,1%, 1% и 10%) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром в нулевой момент времени и через две недели.

[0065] На фиг.10 представлен линейный график, демонстрирующий пороговое значение числа циклов для вируса черных маточников с течением времени в контрольной популяции и у пчел, которым давали экстракты мицелия *Inonotus obliquus* (1%) и *Ganoderma resinaceum* (1%) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром.

[0066] На фиг.11 представлен линейный график, демонстрирующий пороговое значение числа циклов для вируса черных маточников с течением времени в контрольной популяции и у пчел, которым давали экстракты мицелия *Inonotus obliquus* (1%) и *Ganoderma resinaceum* (1%) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром.

НАИЛУЧШИЙ СПОСОБ(Ы) ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ И ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ

[0067] Пчелы все больше сталкиваются с новыми антропогенными стрессовыми факторами. На протяжении сотен миллионов лет грибы эволюционировали, чтобы бороться с вирусами, бактериями и другими грибами; эволюционировали, чтобы инфицировать паразитов, в том числе насекомых; эволюционировали их ферменты для разрушения токсинов; и эволюционировали их вещества для активации таких процессов. Это означает, что они обеспечивают потенциальный пищевой клад из соединений, полезных для защиты пчел и других опылителей от таких угроз, включая множество противовирусных, антибактериальных, противогрибных и антипротозойных соединений и соединений, пригодных для активации пищеварительной системы, системы детоксикации и иммунной системы пчел.

[0068] Без связи с какой-либо теорией, автор изобретения полагает, что экстракты мицелия грибов специфически модулируют,

индуцируют и повышают экспрессию осуществляющих детоксикацию и ксенобиотических метаболизирующих генов, в частности, активируя все классы генов детоксикации, увеличивая метаболизм пестицидов в средней кишке, функционируя в качестве питательных веществ, регулирующих иммунные процессы и процессы детоксикации, активируя иммунные, метаболические и пищевые каскады (каскады метаболизма липидов и глюкозы) и активируя гены, кодирующие противомикробные пептиды. Более того, отдельные виды грибов поддерживают микробиом полезных микроорганизмов в пищеварительной системе пчел, и их совместимость является важным мостом между видами, согласуя действие полезных вызывающих гниль древесины грибов с полезными микробами, находящимися в задней кишке пчел. Ожидается, что экстракты по настоящему изобретению будут пребиотиками для природного микробиома в органах пищеварительной системы пчел, а также будут сообщать противовирусную пользу, которая будет вносить вклад в увеличение продолжительности жизни пчел и их колоний и их совокупную функциональность. Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является фермент мицелия медицинских грибов *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc lactis*, *Streptococcus thermophiles* и бактериофагов для получения пригодных для употребления в пищу и экологически пригодных композиций, полезных для микробиома пчел, животных (людей).

[0069] Поскольку пчелы подвергаются атаке множества патогенов – клещей, вирусов, микроспоридий, простейших, горбатов, и воздействию переносимых воздухом загрязнителей, поиск надежной универсальной платформы защиты для содействия поддержанию иммунной защиты пчел, имеет первостепенное значение. Например, разработка способов для получения композиций с использованием внеклеточных экссудатов мицелия отдельных видов грибов, включая, но не ограничиваясь ими, *Stropharia rugoso-annulata* и другие представители *Strophariaceae*, *Fomitopsis pinicola* и другие представители *Fomitopsidaceae*, и *Metarhizium anisopliae* и другие представители *Clavicipitaceae*, может помочь предотвратить синдром краха

колонии. Также ожидается, что многие другие виды базидиомицет и аскомицетов будут обеспечивать сходную пользу в ходе исследования пользы полезных для пчел экссудатов, секретлируемых выращенным в лаборатории чистым культивируемым мицелием.

[0070] Что касается экстрактов грибов, экстракты мицелия являются предпочтительными относительно "экстрактов плодового тела", поскольку гифа продуцирует внеклеточные экссудаты, которые обогащены доступной водой, маслами, полисахаридами, аминокислотами, витаминами группы В, кумаринами, л-кумаровой кислотой, фенолами и полифенолами, а также эргостеринами, ферментами, кислотами, в том числе жирными кислотами, антибактериальными веществами и противовирусными веществами. Отдельные гифальные нити мицелия испускают комплексные запахи, которые улетучиваются в воздух, в то время как плодовые тела имеют тенденцию к наличию питательной ценности, но не имеют обширных экспонированных областей клеточной поверхности, как и та же масса мицелия. Плодовое тело гриба состоит из гифы с уплотненными клетками, наслоенными друг на друга, так что только малая часть массы мицелия в плодовом теле экспонирована в атмосферу. Таким образом плодовые тела грибов лишены признака запаха мицелия, из которого они образованы. Поскольку эти внеклеточные экссудаты могут быть без труда растворены в раствор, эти экссудаты могут быть более эффективно включены в улучшающие средства, такие как лепешка из пыльцы, растворы сахара или вода, спреи опрыскивания пчел или спреи для опрыскивания листьев, и являются лучшими аттрактантами для пчел и других насекомых, чем плодовые тела грибов. В настоящее время это не является очевидным специалистам в областях микологии и энтомологии, внимание которых было сосредоточено в большей степени на плодовых телах и спорах плодовых тел, а не на мицелии.

[0071] Хотя пчелы могут искать обогащенные сахаром капли, выделяющиеся из мицелия гниющего дерева, 100% экстракты – то, что пчелы собирают – являются чрезмерно концентрированными и токсичными в большинстве видов в их природной форме, чтобы быть полезными. Даже в 10% концентрации большинство исследованных

экстрактов были токсичными. Таким образом, если бы пчелы поглощали эти капли в природе, они бы, вероятно, заболели, преждевременно погибли и не получили пользы. Автор изобретения и его коллеги открыли, что, когда лабораторно чистые экстракты культур разбавляли в высокой степени до 10%, сохранялась некоторая токсичность, но, когда они их разбавляли до 1% или 0,1% или менее, продолжительность жизни существенно увеличивалась, особенно среднем возрасте, когда рабочие пчелы находятся на пике их активности и являются наиболее продуктивным в их добычательстве и сборе пыльцы. Аналогично, когда экстракты разбавляли, наблюдали противовирусную пользу, и в то же время происходило увеличение продолжительности жизни, в случае нескольких исследованных видов грибов. Это является особенно важным, поскольку снижение нагрузки патогеном оказывает общую суммарную пользу для качества общего состояния здоровья и эффективности улья. Путем объединения экстрактов, оптимизированных для противовирусной активности, с экстрактами, оптимизированными для увеличения продолжительности жизни, ожидается большая польза, чем в каждом случае отдельно. В результате комбинации с пользой для продолжительности жизни, пчелы могут быть более продуктивными в качестве собирателей, в качестве пчел-кормилиц, ухаживающих за потомством, и в качестве помощников, контролирующих гигиену, с меньшей заболеваемостью и улучшенной способностью выдерживать экзогенные стрессовые факторы. В сущности, функции, которые пчелы выполняют внутри улья и снаружи во внешней среде, существенно усиливаются при использовании способов и композиций, описанных в рамках настоящего изобретения.

[0072] Экстракт чистой культуры лабораторного мицелия на стерилизованных субстратах существенно отличается от встречающейся в природе формы мицелия - структурно, количественно и качественно. Более того, выращивание чистой культуры мицелия, например, на рисе, являющемся ненативным субстратом, без многочисленных других совместно встречающихся микробов, обитающих на естественным образом разлагающейся древесине, возможно обеспечивает получение другого вещества, чем

экссудаты из разлагающейся древесины, в которой присутствует множество других организмов (грамм гниющей древесины в природе содержит сотни других микроорганизмов, включая бактерии, простейшие, другие грибы, совместно обитающие с или на разлагающем древесину мицелии). Таким образом экссудаты обычного мицелия в природе, содержащего множество организмов, значительно отличаются, и маловероятно, что они будут обеспечат пчелам такую же противовирусную пользу и пользу увеличения продолжительности жизни, что и польза, которая наблюдается в случае специально разбавленных чистых культуральных экстрактов, полученных из мицелия, как описано в настоящем описании. Иными словами, для пчел являются полезными некоторые изменения и манипуляции, проводимые автором настоящего изобретения, вне природы: экссудаты из мицелия чистой культуры должны быть значительно разбавленными до определенных концентраций, чтобы они демонстрировали пользу. После обнаружения того, что первоначальные экстракты являются токсичными, большинство исследователей отказались бы от этого направления исследований. Действительно, когда автор изобретения предложил идею энтомологам и микологам, квалифицированным в данной области, они не торопились поддерживать контакты с автором изобретения, поскольку они ожидали токсичности и не хотели приносить вред пчелам. Первоначальные результаты, по иронии, подтвердили их предположения. Некоторые даже называли идеи автора изобретения "бессмысленными" и не хотели их рассматривать далее.

[0073] Как и в ботанике, можно ожидать, что экстракты грибов могут быть более эффективными, чем отдельные компоненты или лекарственные средства. См., например, Elfawal et al., Dried whole-plant *Artemisia annua* slows evolution of malaria drug resistance and overcomes resistance to artemisinin, *Proc Natl Acad Sci USA* 112(3):821-6 (2015).

[0074] Только недавно в исследовании было открыто, что мицелий имеет больше включенных генов, чем плодовые тела грибов, которые в итоге образуются из него. Как было отмечено Li et al., 2013, "Кодирующие белки гены экспрессировались на более высоком уровне в мицелии или на первоначальных стадиях по сравнению с

генами в плодовых телах", Li et al., "Complete mitochondrial genome of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*." PLoS ONE 8(8):e72038 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0072038.

[0075] Более того, подобная сети структура мицелия позволяет эпигенетическую эволюцию штаммов, которые могут быть преобразованы для испускания веществ, предназначенных специально для принесения пчелам пользы. Такие улучшения ожидаются автором настоящего изобретения в качестве способа повышения привлекательности для пчел штаммов и композиций и увеличения пригодности для способствования преодолению пчелами CCD.

[0076] В сущности, автор изобретения обнаружил новое питательное вещество, которое обогащено широким набором кумаринов, фенолов и полифенолов; и противовирусными, противогрибными, антибактериальными и антипротозойными средствами и большим разнообразием специализированных метаболитов, таких как антиоксиданты и антимуtagens, которые образуются в результате расщепления мицелием зерен или древесины и являются привлекательными для пчел и поддерживают их защиту от стрессовых факторов и заболеваний. Экстракты грибов, используемые в медицине для здоровья человека, имеют неожиданную пользу для здоровья пчел, включая снижение количества вирусов и увеличение продолжительности жизни. Действительно, вклад грибов в прополис и мед, а также в пыльцу, усиливает иммунную систему пчел и, более того, человека, на определенных, фундаментальных, комплексных уровнях. Автор изобретения отмечает, что экстракты мицелия, выращенные на древесине, инокулированной зерном, предположительно будут содержать больше полифенолов, кумаринов и соединений, которые активируют гены детоксикации и иммунитета у пчел, в противоположность экстрактам мицелия, выращенным посредством жидкостной ферментации.

[0077] Поскольку природе могут потребоваться десятилетия и даже тысячелетия для установления новых полезных ассоциаций, вследствие того, что пчелы неспособны достаточно быстро реагировать на последние внедрения новых гербицидов, пестицидов, фунгицидов и митицидов, то можно запустить - заходя вперед эволюции - этот процесс, отдав этим полезным видам грибов

главную роль в путях биологии и биохимии пчел для поддержания их иммунной защиты и предупреждения CCD. Химический состав мицелия грибов является сложным и вариабельным в и среди различных типов, семейств и родов грибов, что является признаком, который делает экстракты грибов хорошим средством защиты против быстро эволюционирующих паразитов и патогенов.

АТТРАКТАНТЫ:

[0078] Одним компонентом изобретения является применение экстрактов грибов, причем экстракты получены из мицелия видов трутовиков, базидиомицет и аскомицет, для привлечения пчел. Пчел привлекают обогащенные полисахаридами внеклеточные и внутриклеточные метаболиты, секретируемые мицелием. В эти экссудаты входят соединения, которые привлекают пчел, предоставляют им обогащенные сахаром и другие питательные вещества, обеспечивают противовирусную, противогрибную и антибактериальную защиту, одновременно поддерживая их устойчивость к пестицидам и улучшая здоровье колонии и продукцию меда. В действительности, мед, содержащий эти компоненты грибов, может обеспечить медицинскую пользу для пчел и других животных, в том числе человека.

[0079] Эти внеклеточные экссудаты, например, из королевской строфарии или морщинисто-кольцевой строфарии (*Stropharia rugoso-annulata*), обладают эффектом привлечения пчел, особенно в то время, когда предпочитаемые ими цветковые растения ограничены. Пчел привлекают как внеклеточные экстракты, так и живой мицелий. Ожидается, что другие нетоксичные виды грибов, которые могут обладать или могут не обладать противовирусными свойствами и свойством увеличения продолжительности жизни, включая деликатесные и медицинские грибы, будут привлекать пчел в различной степени аналогичным образом.

[0080] Приятный аромат *Stropharia rugoso-annulata*, выпускаемый мицелием, может привлекать пчел, хотя никто из других ученых, несколько известно автору изобретения, никогда не обнаруживал или не утверждал этого. Автор настоящего изобретения открыл, что мицелий *Stropharia rugoso-annulata* испускает богатый привлекающий подобный цветочному аромат. Устричные грибы рода

Pleurotus, особенно *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. lignatilis*, *P. sapidus*, *P. eryngii*, *P. populinus* и другие родственные виды, испускают приятный похожий на анис аромат, как и *Clitocybe odora*. Другим кандидатом является трутовик Сплит гилл, *Schizophyllum commune*, являющийся одним из наиболее распространенных лесных базидиомицет, который испускал сильный сладкий аромат в культуре, временами пересыщающий обонятельные ощущения лабораторного персонала, и он является источником кумаринов и кумаровых кислот. Интересно, что только те, кто выращивает *Schizophyllum commune* в больших количествах *in vitro* на злаковых зернах или древесине, знают об этом сильном испускаемом аромате. Автору изобретения неизвестно о ком-либо за его 40-летний опыт, кто упоминал бы или сообщал бы об этом явлении испускания аромата этим видом. *Schizophyllum commune* является одним из наиболее известных агентов белой гнили лесным видом среди умеренных и тропических областей мира, и он образует смягченную сладкую древесину, которая может быть полезной для пчел. Возможно, многие другие виды испускают привлекательные ароматы для пчел, которые не обнаруживаются человеком или не являются заметно привлекательными.

[0081] Мицелий Agaricomycetes и экстракты, полученные из чистой культуры мицелия, могут быть источниками новых аттрактантов для пчел. Agaricomycetes являются единственными грибами, которые деградируют лигнин, и они включают пластинчатые грибы, такие как *Stropharia rugoso-annulata*, и трутовые грибы, такие как грибы, родственные виду *Fomitopsis*. Agaricomycetes охватывают ~16000 описанных видов. Многие Agaricomycetes двойственно разлагают целлюлозу и лигнин. Нативные пчелы используют гнилые бревна для гнездования, как рассмотрено выше в разделе "Медведи, грибы и пчелы", которые, как полагает автор настоящего изобретения, предоставляют пчелам богатые сахаром и кодирующие и активирующие цитохром P450 соединения через водяные капли и нектар, секретируемый мицелием Agaricomycetes.

[0082] В настоящее время регенерирующие леса имеют приблизительно 10-15% древесных остатков относительно нативных лесов! Эта относительно недавняя потеря разлагаемых древесных

остатков ограничивает доступность этих полезных грибов нативным и импортированным пчелам, обеспечивая прежде неописанный дополнительный стрессовый фактор. Продолжающееся ограничение областей с остатками далее разрушает пищевые цепи не только для пчел, но также и для большинства организмов, которые зависят от здоровых и поддерживающихся экосистем.

[0083] Например, автор настоящего изобретения показал, что экстракты грибов преконидиального (преспорулирующего) мицелия грибов, не являющихся Agaricomycetes, включая *Metarhizium anisopliae* и *Aspergillus flavus*, привлекают горбатов (и других насекомых) (см. патенты США № 6660290, 7122176, 7951388, 7951389 и 8501207), останавливая их миграцию и, таким образом, препятствуя переносу этими мухами заболеваний. Более того, с использованием этих экстрактов на основе мицелия также привлекаются переносимые патогены клещи и предотвращается их передвижение в пчелиные колонии, таким образом, снижая не только нагрузку патогенами, которую несут клещи, но также снижая количества клещей, которые могут в ином случае инфицировать пчел. При необходимости сходные подходы можно использовать для контроля паразитов пчелиных ульев, таких как большая и мелкая восковая моль и малый ульевый жук. Более того, штаммы этих преспорулирующих энтомопатогенных грибов могут быть выбраны вследствие их высокой термической устойчивости и их способности привлекать и уничтожать клещей и мух, которые причиняют вред пчелам, или переносимых ими патогенов. Исследование технологий постспоруляционных и основанных на спорах *Metarhizium anisopliae* (которые могут иметь недостаток отталкивания клещей и/или насекомых по сравнению с привлекающей способностью преконидиального мицелия) продемонстрировали относительную простоту, с которой штаммы могут быть отобраны для термической устойчивости к высоким температурам улья и высокой патогенности и/или смертности для клещей *Varroa*. Rodriguez et al., Selection of entomopathogenic fungi to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), *Chilean J. Agric. Res.*, 69(4): 534-540 (2009); Rodriguez et al., Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* Qu-M845 isolate to control *Varroa destructor* (Acari:

Varroidae) in laboratory and field trials, *Chilean J. Agric. Res.*, 69(4): 541-547 (2009); Boyle, New Brunswick Department of Agriculture, Aquaculture and Fisheries, Integrated Pest Management - Compatible Biological Control of Varroa Mite of Honey Bee; Fungi help combat honeybee killer, BBC News Science/Nature, August 9, 2002.

[0084] Более того, автор изобретения отчетливо показал, что преконидиальный мицелий энтомопатогенных грибов, таких как, но не ограничиваясь ими, виды *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* и *Cordyceps*, индуцирует стимулирующий пищевой ответ (фагостимуляция) у многих насекомых и других членистоногих после ощущения запаха и последующего употребления экстрактов, полученных из преспорулирующего (преконидиального) мицелия. Однако пчелы демонстрируют уникальную толерантность к токсинам из спор и мицелия *Metarhizium anisopliae*, который является вредоносным для клещей и горбатов. Таким образом, наличие смеси энтомопатогенных грибов до споруляции или их экстрактов, смешанных со спорами (конидиями) этих грибов, может стимулировать пчел к употреблению большего количества мицелия и его экстрактов, в том числе из полезных трутовиков, что приводит к уникальному набору синергических преимуществ, который включает факторы продолжительности жизни, противовирусные, антибактериальные и противогрибные эффекты, активацию каскадов детоксикации цитохрома (p450), предоставление комплексных сахаров, витаминов и питательных веществ, одновременно снижая токсичность антропогенных инсектицидов, гербицидов, фунгицидов, антропогенных токсинов, и также сокращая популяции клещей и горбатов, одновременно внося виды грибов, поддерживающие здоровый бактериальный микробиом кишечника пчел. Каждый из этих факторов помогает пчелам уменьшить действие стрессовых факторов нарушений, вызывающих крах колонии. Комбинирование этих полезных факторов в одной системе доставки – в качестве композиции или способа – является беспрецедентным подходом насколько известно автору настоящего изобретения. Способы выбора и оптимизации штаммов в каждом виде вероятно приведут к улучшениям, поскольку каждую переменную исследуют и комбинируют.

[0085] Люди ограничены в восприятии цветовых длин волн приблизительно от 390 до 750 нанометров (нм). Пчелы, подобно многим насекомым, видят цвета приблизительно от 300 до 650 нм. Многие виды грибов, такие как устричные грибы (*Pleurotus ostreatus*) инициируются к плодоношению при приблизительно 360 нанометрах, что выходит за пределы, которые человек способен обнаружить (см. Action spectra for Hyphal Aggregation, the first stage of fruiting, in the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*, Richartz and Maclellan in *Photochemistry and Photobiology* pages 815-820, May 1987). Мицелий грибов поглощает часть этого света и отражает значительную его часть, вследствие ограничений поглощения через пропускающие свет прозрачные клеточные стенки мицелия.

[0086] Когда мицелий, растущий глубоко в древесине или в земле, достигает поверхности земли или древесины и подвергается воздействию света, происходит изменение фазы в жизненном цикле гриба, начиная с мицелия до первой стадии образования плодового тела, агрегации гифа и формирования примордия ("детеньша гриба"). Мицелий многих видов не формирует примордий, если не произойдет воздействие света, близкого к ультрафиолетовому или имеющего длину 360 нанометров или ниже. Это входит в диапазон, который пчелы могут обнаружить, но выходит за пределы того, что может видеть человек.

[0087] Привлекательность мицелия, стимулируемого синим светом, невидимым для человека, но видимым для пчел, является открытием высокого значения, поскольку пчелы наиболее легко обучаются ассоциировать пищу с ультрафиолетовыми длинами волн цвета. Как определили Menzel и Backhaus в 1989 году, пчелы могут обучаться быстрее, когда пища ассоциирована с фиолетовым цветом по сравнению со всеми другими цветами. Menzel, R. and Backhaus, W. 1989. "Color vision in honey bees: Phenomena and physiological mechanisms". D. Stavenga and R. Hardie (eds.): *Facets of vision*, Berlin-Heidelberg-New York: 281-297.

[0088] Таким образом, пчелы ищут поверхностный мицелий тогда, когда питательные вещества транспортируются вверх в формирующий препримордий или примордий мицелий в ответ на

фиолетовые длины волн, и когда эта длина является ключевой для стимуляции мицелия к переключению на формирование плодового тела, такое обнаружение пчелами может быть подходящим временем для поиска поверхностного мицелия и усвоения насыщенных питательных веществ, когда мицелий является настолько метаболически активным. Хотя это и является гипотетическим и спекулятивным мнением автора изобретения, это взаимодействие заслуживает дальнейшего исследования, поскольку пчелы могут быть обучены к поиску пищи на основе ассоциаций со спектрами света. Этот дополнительный элемент настоящего изобретения может ускорить процесс обучения пчел к поиску новых источников пищи с использованием признаков мицелия. В результате, варианты осуществления настоящего изобретения также обеспечивают пользу повышения полезности и привлекательности других форм пищи для способствования здоровью пчел с использованием этих вышеупомянутых свойств мицелия, в частности, способствования выявлению пчелами мицелия на стадиях формирования примордия.

[0089] Выходящий на поверхность мицелий выделяет диоксид углерода и испускает запахи, и автор настоящего изобретения полагает, что пчелы могут обнаруживать мицелий не только по запаху, но также привлекаются к мицелию в ответ на этот свет синего спектра, когда грибной мицелий начинает упаковывать белки, витамины и богатые сахаром питательные вещества на поверхности между средой с высоким содержанием диоксида углерода в субстратах и высоко оксигенированной средой непосредственно выше их, и посредством этого конструирует богатый питательными веществами, но доступный примордий – первую стадию формирования плодового тела или формирования базидиоспор (в случае резупинатных трутовиков, таких как виды *Inonotus*, формирующих экспонированные гимениальные поверхности или корки, которые ярко окрашены, как например, *Inonotus andersonii*). Многие из ярко окрашенных пигментов грибов, особенно, но не ограничиваясь ими, желтоватые, которыми обладает мицелий, могут состоять из биофлавоноидов грибов, многие из которых являются полифенолами. Автор настоящего изобретения считает, что при исследовании этой богатой среды поверхности контакта – поверхности желтоватых

мембран мицелия грибов, экспонированных в атмосферу окажутся богатым резервуаром для сбора пчелами внеклеточных и внутриклеточных метаболитов, содержащих питательные вещества и соединения, поддерживающие иммунную систему, включая "мик флавоноиды" и "микостерины", включающие фенолы и полифенолы, не ограниченные кумаринами и производными бензойной и коричной кислоты, включая кумаровые кислоты и их гликозиды.

[0090] В качестве неограничивающего примера, мицелии некоторых видов, особенно рода *Phellinus* и *Inonotus*, продуцируют ярко окрашенные желтоватые пигменты в их мицелии, включающие полифенолы, например, гисполон, такие как 6-(3,4-дигидроксифенил)-4-гидроксигекса-3,5-диен-2-он ($C_{12}H_{12}O_4$), светло-желтая биологически активная группа соединений с антиоксидантными и усиливающими иммунитет свойствами, происходящая из видов трутовиков, таких как *Inonotus hispidus* и *Phellinus linteus*. Автор изобретения полагает, что эти окрашенные светло-желтым цветом мицелии, кроме того, могут привлекать пчел, собирающих сахара, полифенолы, влагу, питательные вещества и другие секреты, которые имеют усиливающие иммунитет противовирусные, антибактериальные, противогрибные и антипротозойные свойства. Поскольку пчел особенно привлекает желтый цвет, те виды грибов, такие как *Phellinus* и *Inonotus*, которые имеют светло-желтый цвет, предпочтительно будут привлекать пчел и также прямо ассоциированы с желтоватыми полифенолами, содержащими кумарины, помогая пчелам активировать их каскады фермента цитохрома P450. Автор настоящего изобретения считает, что выращивание этих разлагающих древесину видов, которые продуцируют ярко пигментированный мицелий, является предпочтительным для создания платформ и экстрактов на основе мицелия для оказания помощи пчелам. Следовательно, экстракты формирующего мицелий примордия и экстракты окрашенного мицелия являются предпочтительными аттрактантами пчел.

[0091] Мицелий многих видов грибов не формирует спорулирующие структуры, включая, но не ограничиваясь ими, формирование плодового тела; такие грибы также являются предпочтительными для исследования их экстрактов мицелия для

привлечения и здоровья пчел.

ВИРУСЫ, ГРИБЫ, БАКТЕРИИ И ПРОСТЕЙШИЕ

[0092] Пчелы, инфицированные вирусами, могут утрачивать иммунную функцию, а также способность выполнять другие метаболические функции в результате того, что вирусы "похищают" рибосомальный аппарат для их пользы, химически препятствуя ключевому каскаду фенолоксидазы, подавляя иммунные ответы до их начала, манипулируя иммунной сигнальной сетью хозяина, блокируя противомикробные пептиды хозяина, препятствуя ответу РНК-*i* и/или создавая "суперантигены", которые могут подавить иммунную систему хозяина и иным образом неблагоприятно влияя на здоровье пчел.

[0093] Исключительная зависимость вирусов от клеточного аппарата хозяина для их размножения и выживания делает их в высокой степени чувствительными к характеристикам клеточной среды, таким как опосредуемая короткой РНК интерференция. Также она дает вирусу возможность бороться и/или модулировать хозяина для своих нужд. Таким образом диапазон взаимодействий, возможных через взаимодействия микроРНК-мРНК на поверхности контакта хозяин-патоген, является большим. Эти взаимодействия могут быть далее скорректированы у хозяина посредством изменения экспрессии генов, мутаций и полиморфизмов. В патогене высокая частота мутаций способствует комплексности сети взаимодействий. Вирусы либо продуцируют микроРНК, либо нацелены на микроРНК хозяина, необходимые для иммунной системы хозяина. Scaria et al. (2006) Host-virus interaction: a new role for microRNAs, *Retrovirology*, 2006, 3:68; Oliver, Sick Bees - Part 4: Immune Response to Viruses, *American Bee Journal*, November 2010.

[0094] Мицелий грибов продуцирует широкий диапазон соединений, которые могут быть антибактериальными или противовирусными. В патенте США № 8765138, выданном автору изобретения, описана противовирусная активность *Fomitopsis officinalis*, которая включает активность против вируса гриппа птиц и вирусов простого герпеса I и II. Ожидается, что другие вирусы будут чувствительными к противовирусным соединениям, кодируемым и экспрессируемым мицелием *Fomitopsis officinalis*, и,

в действительности, многих видов трутовых грибов и базидиомицет. Экстракты мицелия являются активными против многочисленных вирусов, которые наносят вред пчелам, в частности, но не ограничиваясь ими, BQCV (вирус черных маточников), IAPV (израильский вирус острого паралича), DWV (вирус деформации крыла), TRV (вирус кольцевой пятнистости табака) и родственных им вирусов. Активные ингредиенты, ограничивающие вирусы, в экстрактах варьируются, однако двумя группами являются полифенолы, включающие кумарины, и стерины, включающие дегидросульфериновые кислоты, эбуриковые кислоты и родственные соединения. Синергическая польза от этих полифенолов и стерина может далее усиливать иммунную защиту пчел. Эти соединения находятся в комплексах, которые включают жирные кислоты, липиды и стерины. По существу, ожидается, что многие другие активные ингредиенты, родственные жирным кислотам, липидам и стеринам, имеющие противовирусные свойства, будут полезными для пчел. Многие из этих вышеупомянутых соединений известны как биофлавоноиды, и виды, продуцирующие их, представляют интерес, поскольку некоторые из этих видов продуцируют мицелий ярко-желтого цвета, который также может служить для привлечения пчел. Очень мало работы проводилось, или даже не проводилось, микологами для обнаружения "цветов" мицелированной древесины, видимых для пчел, но невидимых или практически невидимых для глаза человека, особенно света, отражаемого в ультрафиолетовом диапазоне.

[0095] Автор настоящего изобретения также открыл антибактериальные свойства экстрактов мицелия *Fomitopsis officinalis* против стафилококков, бактерий туберкулеза и *E. coli*. Эта антибактериальная активность, вероятно, сообщает дополнительный уровень защиты от заболеваний, передаваемых другими организмами. Эти экстракты, аналогично, будут оказывать положительное влияние, ограничивая вредоносные эффекты известных и еще неоткрытых бактерий, которые наносят вред пчелам, животным и растениям. См. патентную заявку США с серийным номером № 13/998914 и родственные заявки, описанные выше.

[0096] Предполагается, что вещества медицинских видов

грибов, пригодных у человека, аналогичным образом окажутся полезными в отношении активации иммунных генов и пользы для иммунной системы пчел. Поскольку многие такие гены являются эволюционно консервативными или сходными, ожидается, что экстракты мицелия таких грибов аналогично могут быть использованы для активации у пчел генов и систем, деградирующих и борющихся с инфекциями.

[0097] Предпочтительная эффективная доза варьируется от вида к виду, частично поскольку экстракты могут быть, как и большинство лекарственных средств, лечебными при низких дозах и токсичными при высоких дозах. Кроме того, некоторые виды, такие как *Fomitopsis officinalis*, могут иметь выраженные противовирусные эффекты и более низкий токсический порог по сравнению с другими медицинскими видами. Как правило, для всех медицинских видов грибов, упоминаемых в настоящем описании автором настоящего изобретения, предпочтительные дозы находятся в диапазоне от 0,0001% до 50%, причем более предпочтительным является диапазон 0,001%-25% и наиболее предпочтительным является диапазон от 0,01% до 15%. В случае многих из экстрактов трутовиков в частности, результаты, как правило, указывают на то, что экстракты должны быть разбавлены до менее 10%, или менее 1%, или менее 0,1% для многих из этих экстрактов трутовых грибов, чтобы обеспечить противовирусную пользу и пользу увеличения продолжительности жизни пчелам. Предпочтительная доза, добавляемая в жидкие или твердые пищевые вещества для пчел, в случае *Fomitopsis officinalis* составляют 0,0001%-0,1%; предпочтительная доза для *Trametes versicolor* или *Fomes fomentarius* и *F. pinicola* составляет от 0,1% до 10%, исходя из результатов, которые показывают как увеличение продолжительности жизни, так и улучшение снижения вирусной нагрузки в концентрациях 10%. За исключением *Trametes versicolor* и *Fomes fomentarius*, как правило, 10% концентрации не помогали увеличить продолжительность жизни пчел. Соответственно, более высокие концентрации, превышающие 10%, оказывали неблагоприятные эффекты на общую продолжительность жизни.

[0098] Медицинские грибы и мицелий медицинских грибов

определяют как грибы и мицелий, которые поддерживают здоровье и усвоение питательных веществ. В контексте пчел, они включают грибы и мицелий, которые оказывают эффект увеличения продолжительности жизни, увеличения способности к собирательству, увеличения устойчивости к заболеваниям, увеличения способности детоксифицировать антропогенные токсины, увеличения устойчивости к паразитам, наличия противовирусной, антибактериальной и/или противогрибной активности и увеличения способности пчел лучше выдерживать стрессовые факторы, ассоциированные с комплексом, в совокупности называемым синдромом краха колонии.

[0099] Пригодные и предпочтительные роды грибов включают, в качестве примера, но не ограничиваясь ими: пластинчатые грибы (Agaricales) *Agaricus*, *Agrocybe*, *Armillaria*, *Clitocybe*, *Collybia*, *Conocybe*, *Coprinus*, *Coprinopsis*, *Flammulina*, *Giganopanus*, *Gymnopilus*, *Hypholoma*, *Inocybe*, *Hypsizygus*, *Lentinula*, *Lentinus*, *Lenzites*, *Lepiota*, *Lepista*, *Lyophyllum*, *Macrocybe*, *Marasmius*, *Mycena*, *Ompagolotus*, *Panellus*, *Panaeolus*, *Sarcomyxa*, *Pholiota*, *Pleurotus*, *Pluteus*, *Psathyrella*, *Psilocybe*, *Schizophyllum*, *Stropharia*, *Termitomyces*, *Tricholoma*, *Volvariella*, и т.д.; трутовые грибы (Polyporaceae) *Albatrellus*, *Antrodia*, *Bjerkandera*, *Bondarzewia*, *Bridgeoporus*, *Ceriporia*, *Coltricia*, *Coriolus*, *Daedalea*, *Dentocorticium*, *Echinodontium*, *Fistulina*, *Flavodon*, *Fomes*, *Fomitopsis*, *Ganoderma*, *Gloeophyllum*, *Grifola*, *Heterobasidion*, *Inonotus*, *Irpex*, *Laetiporus*, *Meripilus*, *Oligoporus*, *Oxyporus*, *Phaeolus*, *Phellinus*, *Piptoporus*, *Poliporus*, *Poria*, *Schizophyllum*, *Schizopora*, *Trametes*, *Wolfiporia*; игольчатые грибы *Hericium*, *Sarcodon*, *Hydnum*, *Hydnellum* etc.; базидиомицеты, такие как *Auricularia*, *Calvatia*, *Ceriporiopsis*, *Coniophora*, *Cyathus*, *Lycoperdon*, *Merulius*, *Phlebia*, *Serpula*, *Sparassis* и *Stereum*; аскомицеты, такие как *Cordyceps*, *Ophiocordyceps*, *Morchella*, *Tuber*, *Peziza*, и т.д.; "желейные грибы", такие как *Tremella*; микоризные грибы, грибы, такие как *Phanerochaete* (включая грибы, такие как *P. chrysosporium* на несовершенной стадии и *P. sordida*).

[0100] Подходящие виды и роды грибов включают, только в

качестве неограничивающего примера: *Agaricus augustus*, *A. blazei*, *A. brasiliensis*, *A. brunnescens*, *A. campestris*, *A. lilaceps*, *A. placomyces*, *A. subrufescens* и *A. sylvicola*, *Acaulospora delicata*; *Agrocybe aegerita*, *A. praecox* и *A. arvalis*; *Albatrellus hirtus* и *A. syringae*; *Alpova pachyploeus*; *Amanita muscaria*; *Antrodia carbonica*, *A. cinnamomea* и *A. radiculosa*; *Armillaria bulbosa*, *A. gallica*, *A. matsutake*, *A. mellea* и *A. ponderosa*; *Astraeus hygrometricus*; *Athelia neuhoffii*; *Auricularia auricula* и *A. polytricha*; *Bjerkandera adusta* и *B. adusta*; *Boletinellus merulioides*; *Boletus punctipes*; *Bondarzewia berkeleyi*; *Bridgeoporus nobilissimus*; *Calvatia gigantea*; *Cenococcum geophilum*; *Ceriporia purpurea*; *Ceriporiopsis subvermispora*; *Clitocybe odora*, *Collybia albuminosa* и *C. tuberosa*; *Coltricia perennis*; *Coniophora puteana*; *Coprinus comatus*, *C. niveus* и "навозник серый"; *Cordyceps bassiana*, *C. variabilis*, *C. facis*, *C. subsessilis*, *C. myrmecophila*, *C. sphecocephala*, *C. entomorrhiza*, *C. gracilis*, *C. militaris*, *C. washingtonensis*, *C. melolanthae*, *C. ravenelii*, *C. unilateralis*, *C. clavulata* и *C. sinensis*; *Cyathus stercoreus*; *Daedalea quercina*; *Dentocorticium sulphurellum*; *Echinodontium tinctorium*; *Fistulina hepatica*; *Flammulina velutipes* и *F. populicola*; *Flavodon flavus*; *Fomes fomentarius*, *F. lignosus*; *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis cana*, *F. subtropica* и *F. pinicola*; *G. resinaceum*, *annularis*, *G. australe*, *G. atrum*, *G. brownii*, *G. collosum*, *G. sinensis*, *G. lingzhi*, *G. curtisii*, *G. japonicum*, *G. lucidum*, *G. lucidum* var. *resinaceum*, *G. neo-japonicum*, *G. oregonense*, *G. sinense*, *G. tornatum* и *G. tsugae*; *Gigaspora gigantia*, *G. gilmorei*, *G. heterogama*, *G. margarita*; *Gliocladium virens*; *Gloeophyllum saeparium*; *Glomus aggregatum*, *G. caledonium*, *G. clarus*, *G. fasciculatum*, *G. fasciculatus*, *G. lamellosum*, *G. macrocarpum* и *G. mosseae*; *Grifola frondosa*; *Gymnopus dryophilus*, *Gymnopus peronatus*, *Hebeloma anthracophilum* и *H. crustuliniforme*; *Hericium abietis*, *H. coralloides*, *H. erinaceus* и *H. capnoides*; *Heterobasidion annosum*; *Hypholoma capnoides* и *H. sublateritium*; *Hypsizygus ulmarius* и *H. tessulatus* (= *H. marmoreus*); *Inonotus hispidus* и *I. obliquus*;

Irpex lacteus; *Lactarius deliciosus*; *Laetiporus sulphureus* (= *Polyporus sulphureus*), *L. conifercola*, *L. cinncinatus*; *Lentinula edodes*; *Lentinus lepideus*, *L. giganteus*, *L. ponderosa*, *L. squarrosulus* и *L. tigrinus*; *Lentinula species*; *Lenzites betulina*; *Lepiota rachodes* и *L. procera*; *Lepista nuda* (= *Clitocybe nuda*); *Lycoperdon lilacinum* и *L. perlatum*; *Lyophyllum decastes*; *Macrocybe crassa*; *Marasmius oreades*; *Meripilus giganteus*; *Merulius incarnatus*, *M. incrassata* и *M. tremellosus*; *Morchella angusticeps*, *M. crassipes* и *M. esculenta*; *Mycena citricolor*, *M. alcalina* и *M. chlorophos*; *Omphalotus olearius*; *Panellus stypticus*, *P. serotinus*; *Paxillus involutus*; *Phaeolus schweinitzii*; *Phellinus igniarius*, *P. pini*, *P. linteus* и *P. weirii*; *Pholiota nameko*, *P. squarrosa*, *Piloderma bicolor*; *Piptoporus betulinus*; *Pisolithus tinctorius*; *Pleurotus citrinopileatus* (= *P. cornucopiae* var. *citrinopileatus*), *P. cystidiosus*, (= *P. abalonus*, *P. smithii*), *P. djamor* (= *P. flabellatus*, *P. salmoneo-stramineus*), *P. dryinus*, *P. eryngii*, *P. lignatils*, *P. euosmus*, *P. nebrodensis*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* (= *P. sajor-caju*) и *P. tuberregium*; *Pluteus cervinus*; *Polyporus indigenus*, *P. saporema*, *P. squamosus*, *P. tuberaster* и *P. umbellatus* (= *Grifola umbellata*); *Psathyrella hydrophila*, *Psilocybe allenii*, *aztecorum*, *P. azurescens*, *P. baeocystis*, *P. bohemica*, *P. caerulescens*, *P. coprophila*, *P. cubensis*, *P. cyanescens*, *P. hoogshagenii*, *P. mexicana*, *P. ovoideocystidiata*, *P. pelliculosa*, *P. semilanceata*, *P. serbica*, *P. subaeruginosa*, *P. tampanensis* и *P. weilii*; *Rhizopogon nigrescens*, *R. roseolus* и *R. tenuis* (= *Glomus tenuis*); *Schizophyllum commune*; *Schizopora paradoxa*; *Sclerocytis sisuosa*; *Serpula lacrymans* и *S. himantioides*; *Scleroderma albidum*, *S. aurantium* и *S. polyrhizum*; *Scutellospora calospora*; *Sparassis crispa* и *S. herbstii*; *Stereum complicatum* и *S. ostrea*; *Stropharia ambigua*, *S. aeruginosa*, *S. cyanea*, *S. albocyanea*, *S. caerulea*, *S. semiglobata*, *S. semigloboides*, и *S. rugoso-annulata*; *Suillus cothurnatus*; *Talaromyces flavus*; *Termitomyces robustus*; *Trametes elegans*, *Trametes T. gibbosa*, *T. villosa*, *T. cingulata*, *T. hirsuta*, *T. suaveolens* и *T. versicolor*; *Trichoderma viride*, *T. harmatum*;

Tricholoma giganteum и *T. magnivelare* (Matsutake); *Tremella aurantia*, *T. fuciformis* и *T. mesenterica*; *Volvariella volvacea*; и многочисленные другие полезные грибы.

[0101] Предпочтительные штаммы, которые продемонстрировали исключительные характеристики, пригодные для применения настоящего изобретения на практике, включают в качестве неограничивающего примера *Fomes fomentarius* (NY state), *Ganoderma applanatum* (штамм Duckabush), *Fomitopsis officinalis* (штаммы I, VI, X), *Fomitopsis pinicola* (штамм I), *Ganoderma oregonense* (Meadow Lake), *Heterobasidion annosum* (Dosewalips), *Pleurotus ostreatus* (штаммы PW-OST, Nisqually), *Psilocybe azurescens* (штамм Stamets), *Stropharia rugoso-annulata* (штамм F), *Trametes versicolor* (Kamilche Point) и *Inonotus obliquus* (Stamets NY).

[0102] Дополнительные подходящие роды и виды грибов могут быть найдены в стандартных руководствах по микологии, таких как *Mushrooms Demystified* (1979, 1986), David Arora, *The Audubon Society Field Guide to North American Mushrooms* (1981, 1995), Gary Lincoff, и *Psilocybin Mushrooms of the World* (1996), Paul Stamets. Непрерывно обновляемые перечни подходящих видов на основе последних анализов ДНК могут быть найдены в интернет-проектах Tree of Life and Encyclopedia of Life (EOL).

[0103] Экстракты мицелия *Fomitopsis officinalis*, в частности, *Inonotus obliquus*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma resinaceum*, и других видов Polyporaceae, как правило, снижают патогенность вирусов для пчел посредством прямого снижения популяций вирусных частиц, также укрепляя иммунную систему пчел, таким образом, ограничивая их вирулентность и передаваемость. Более того, пчелам полезна комбинация смеси противовирусных компонентов, продуцируемых мицелием, с противомикробными свойствами кумаринов, и других соединений, продуцируемых мицелием *Fomitopsis officinalis*. Внеклеточные экссудаты, секретлируемые мицелием полезных грибов, описанных в настоящем описании, имеют комбинацию этих компонентов, но сбалансированы так, чтобы они имели суммарную пользу привлечения пчел, чтобы происходило их укрепление усиливающими иммунитет и питательно

полезными компонентами. Этот многогранный эффект приводит к укреплению иммунной системы пчел и их колоний, делая их менее подверженными вирусным, бактериальным, обусловленным простейшими и грибным смягченным заболеваниям.

[0104] Автор настоящего изобретения обнаружил, что виды *Ganoderma*, *Fomes*, *Fomitopsis*, *Fomitoporia*, *Ganoderma*, *Antrodia*, *Inonotus*, *Irpex*, *Lenzites*, *Phellinus*, *Sparassis*, *Hypholoma*, *Pleurotus*, *Schizophyllum* и *Stropharia* демонстрируют выраженные противогрибные свойства, и ожидает, что они также будут полезными для борьбы с грибными патогенами, поражающими пчел, включая, но не ограничиваясь ими виды *Nosema* и другие патогенные микроспоридии, аскосфероз и каменный расплод.

[0105] Первым открытым противовирусным соединением из гриба было соединение из трутовика "Ice Man" *Fomes fomentarius* против вируса табачной мозаики, первого открытого вируса, и родственного вирусу кольцевой пятнистости табака. Этот трутовый гриб является сапрофитом на березе, буке и других лиственных деревьях умеренных широт. Когда он растет, древесина размягчается, выделяя влагу, привлекающие насекомых запахи, и подслащивается богатыми комплексными полисахаридами, а также белками и другими веществами, продуцируемыми мицелием этого гриба. Этот гриб привлекает жуков, чьи норы впоследствии могут быть оккупированы нативными пчелами. В сущности, это является одним из примеров того, что, как предвидит автор изобретения, будет иметь множество примеров роли, которую трутовики и другие базидиомицеты играют в предоставлении пчелам питательных веществ. Интересно, что *Fomes fomentarius* является известным эндофитом березовых деревьев, что означает, что они являются частью природной иммунной системы деревьев. Автор изобретения полагает, что многие из этих эндофитных грибов сообщают противовирусные свойства растениям и пчелам - если они встречаются в определенном разбавленном окне концентраций, а также другим насекомым, если они занимаются собирательством или гнездятся в древесине, в которой содержатся эти грибы. Однако, если они встречаются в их чистой форме, многие из них, в действительности, могут быть токсичными. Именно в этом случае

вмешательство человека может помочь развить мост для противовирусной пользы, который в ином случае маловероятно возникнет в природе. Автор изобретения полагает, что взаимосвязанные форматы, при которых биология пчел, грибов и разлагающихся деревьев и растений пересекается, станет плодотворной областью научного поиска для оказания помощи экосистемам и их развития, которое происходило бы десятилетиями.

[0106] Агрессивные вызывающие гниение древесины грибы, приведенные в настоящей заявке, конкурируют с многими другими грибами за достижение их доминирования в экологических нишах. Виды трутовых грибов, в частности, виды *Antrodia*, *Fomes*, *Fomitopsis*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Heterobasidion*, *Inonotus*, *Stereum* и *Trametes*, обладают противогрибными свойствами, присутствующими в экстрактах, которые, как считает автор настоящего изобретения, будут эффективными против *Nosema*, грибного паразита-микроспоридия, приносящего вред пчелам по всему миру.

[0107] Безусловно, медведи являются не единственным путем распространения на деревья *Fomitopsis* и других грибов, которые могут улучшить здоровье пчел. Любая активность, результатом которой является создание ран в деревьях или обеспечение погибших деревьев создает потенциальную грибную платформу для пользы пчелам. Применение человеком щепы в качестве "декоративной коры" или для формирования троп, или в качестве верхнего слоя вокруг декоративных растений, также может служить для создания мицелиальной платформы для пользы пчелам. В конечном итоге, это означает, что можно выращивать мицелий этих грибов массово в преспорулирующем или преконидиальном состоянии, создавать мицелиальные "посадочные площадки" для пчел или получать экстракты, и посредством этого создавать новое поколение аттрактантов для пчел и питательные вещества, скорректированные соответствующим образом.

[0108] С учетом этой гипотезы, автор настоящего изобретения предвидит применение широкого набора базидиомицет, разлагающих древесину грибов, для разработки грибной биозащиты, "биозащиты пчел", для защиты от стрессовых факторов, ведущих к синдрому

краха колонии.

[0109] Более того, антибиотический эффект этих экстрактов на паразитов пчел, относящихся к микроспоридиям, в частности *Nosema apis*, являющихся причиной "Nosema", которые недавно были переклассифицированы в простой гриб, окажется полезным сопутствующим фактором.

[0110] Другим преимуществом настоящего изобретения являются противовирусные, антибактериальные и противогрибные свойства мицелия широкого диапазона. Многие из фракций экстрактов мицелия, полученных автором изобретения, демонстрируют противовирусную активность, даже когда путь биологически направляемого фракционирования обеспечивал антибактериальные свойства. Часто полагают, что противомикробные средства являются специфичными к типам микробов (существует некоторый перекрест между антибактериальными и антипаразитарными средствами, и в настоящее время может существовать даже по меньшей мере один класс как с антибактериальной, так и противогрибной активностью), однако учитывая, как трудно достигнуть противовирусной специфичности отдельно, и отсутствие известных общих молекулярных мишеней между бактериями и вирусами, которые также проявляют какую-либо степень специфичности в отношении хозяина, широкая противомикробная активность является редкой. Без связи с какой-либо теорией, автор изобретения полагает, что экстракты действуют в качестве иммуностимуляторов, усилителей иммунной системы и иммунорегуляторов с противовирусными, антибактериальными и противогрибными эффектами.

[0111] Предполагается, что мицелиальные компоненты, описанные выше, и/или другие известные и неизвестные соединения являются антибактериальными и противогрибными, помогая иммунитету, и, таким образом, взаимодействие между пчелами и экстрактами чистого культивируемого мицелия в определенных концентрациях является неожиданным преимуществом настоящего изобретения.

[0112] *Hyphodermella corrugata*, *Polyporus umbellatus* и *Piptoporus betulinus* являются видами трутовиков, о которых автору настоящего изобретения из его исследования известно, что

они проявляют выраженные антипротозойные свойства. Полагают, что агарициновая кислота является одним из средств, ответственных за антипротозойную активность *Piptoporus betulinus*. Агарициновая кислота также продуцируется *Fomitopsis officinalis*, и, возможно, другими видами трутовых грибов. Продуцирование акантоцитов в *Stropharia rugoso-annulata*, о которых известно, что они уничтожают круглых червей, также может обеспечить антипротозойную и акарицидную пользу для пчел. По существу, эти виды родственные им виды могут быть предпочтительными для исследования в отношении антипротозойной активности и активации антипротозойных генов у пчел.

ПЕСТИЦИДЫ:

[0113] Поскольку пчелы ограничены в количестве и разнообразии ферментов, требуемых для разрушения природных и антропогенных токсинов, эти токсины нарушают их основной иммунитет, что делает их более чувствительными к патогенам различных направлений – клещам *Varroa*, *Nosema* и грибам микроспоридиев, горбаткам, и вирусам и бактериям, которые в них содержатся. Посредством усиления способности пчел деградировать эти токсины и путем активации большего количества генов цитохрома P450, генов GST и/или генов CCE, иммунное состояние пчел улучшается, чтобы лучше противостоять этим атакам и другим стрессовым факторам. Более того, путем предоставления пчелам смеси грибных экстрактов, которые специфически ограничивают тяжесть атак горбатов, клещей *Varroa*, грибов *Nosema* и вирусов, здоровье колоний пчел может быть укреплено для длительного здоровья потомков, рабочих пчел, королевы и ее трутней. Эти компоненты грибов естественным образом включаются в мед и прополис, таким образом, обеспечивая преимущество развивающимся поколениям. В конечном итоге, ожидается, что не только пчелы станут защищенными, но также увеличится продукция меда, и качество меда будет лучше поддерживать здоровье последующих поколений и их способность к выживанию.

[0114] Ожидается, что те виды грибов, которые пригодны для биоремедиации ("микоремедиации") токсинов, загрязнителей и пестицидов и экстракты их мицелия содержат различные вещества,

пригодные для включения, активации и модулирования генов, необходимых для биодegradации пестицидов. Поскольку многие такие гены или системы, такие как система цитохрома, являются эволюционно консервативными или сходными, ожидается, что экстракты мицелия таких грибов аналогично могут быть использованы для активации генов и систем у пчел, чтобы деградировать такие пестициды и справиться с ними. Полезные и предпочтительные виды включают сапрофитные грибы *Pleurotus ostreatus* и другие виды *Pleurotus*, *Trametes versicolor*, *Trametes elegans* и другие виды *Trametes*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis officinalis* и *F. pinicola*, *Ganoderma lucidum*, *G. annulare*, *G. brownii*, *G. collosum*, *G. lingzhi*, *G. curtisii*, *G. oregonense* и *G. tsugae*; *Heterobasidion annosum*, *Inonotus obliquus*, *I. hispidus*, *Irpex lacteus*, *Laetiporus sulphureus*, *L. conifericola*, *L. cincinnatus*, *Polyporus umbellatus*, *Polyporus elegans*, *Polyporus squamosus*, виды *Antrodia*, *Phaeolus schweinitzii*, *Boletus mirabilis*, *Gymnopus peronatus*, *Mycena alcalina*, *M. aurantiadisca*, *M. haematopus*, *Psilocybe azurescens*, *P. allenii*, *P. subaeruginosa*, *P. ovoideocystidiata*, *P. cubensis*, *P. cyanescens*, *Panaeolus cyanescens*, *Stropharia ambigua*, *Stropharia rugoso-annulata*, *Stropharia coronilla*, *Hypholoma capnoides*, *H. fasciulare*, *H. aurantiaca* и другие виды *Strophariodeae* и *Strophariaceae*, *Lenzites betulinus*, *Pholiota adiposa*, *Pholiota terrestris*, *Pholiota nameko*, *Agrocybe aegerita*, *A. praecox*, *A. arvalis*, *Collybia tuberosa*, *Collybia*, *Psathyrella hydrophila*, *P. epimyces*, *Marasmius oreades*, и ассоциированные с ними многочисленные "сателлитные роды", а также другие пластинчатые и трутневые роды и виды, известные микологической науке в качестве первично и вторично разлагающих целлюлозу и лигнин.

[0115] Мицелий видов *Stropharia rugoso-annulata*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Schizophyllum commune*, *Trametes elegans*, *Trametes versicolor* и многих трутовиков и пластинчатых базидиомицет продуцирует биофлавоноиды, фенолы и полифенолы, включая кумарины и кумаровые кислоты (как транс-, так и *cis*- *o*- и *p*-кумаровые кислоты), которые активируют гены у пчел, которые кодируют ферменты цитохрома P450, а также другие

ферменты, важные для пищеварения, метаболизма и разрушения токсинов. Эффект этих компонентов мицелия, таких как кумарины, *п*-кумаровая кислота, *о*-кумаровая кислота или их гликозиды, состоит в том, что они включают больше генов у пчел, которые позволяют пчелам детоксифицировать широкий диапазон токсинов, в частности, инсектицидов, митицидов, гербицидов, фунгицидов и пестицидов, и усиливают врожденный иммунитет пчел.

[0116] *П*-кумаровая кислота, встречающаяся как в зерне, так и в лигнине, является мономером спорополленина, основного компонента клеточных стенок пыльцы и прополиса, являющегося смолистым соединениям, собираемым и перерабатываемым пчелами для покрытия восковых сот. *П*-кумаровая кислота необходима для увеличения уровня лакказы в грибах, вызывающих гниение древесины, которая является ферментом-целлюлазой, разрушающим лигнин в древесине, создавая соединения-производные, имеющие привлекательный вид для насекомых в качестве пищи, а также создавая среду обитания (пчелы могут занимать места в туннелях, пробуренных жуками-микофагами). По мере того, как грибы осуществляют гниение древесины, разрушая лигнин, они также выделяют воду, обогащенную этой *п*-кумаровой кислотой и питательными соединениями, полезными для пчел. Чем больше *п*-кумаровой кислоты, тем больше лакказ экспрессируется мицелием, тем больше древесина гниет, больше грибных полисахаридов (сахаров) и, в конечном итоге, больше этих соединений будет находиться в экссудатах грибов, которые ищут пчелы и которые могут быть им полезными. Другим преимуществом настоящего изобретения является то, что грибы, вызывающие гниение древесины, продуцируют *п*-кумаровые кислоты и кумарины, которые могут быть биологически конвертированы в *п*-кумаровые кислоты.

[0117] Как отмечалось Terrón *et al.*, структурно близкородственные ароматические соединения имеют различные эффекты на активность лакказы и на экспрессию гена *lcc* в лигнинолитическом грибе *Trametes sp.* 1-62, *Fungal Genet. Biol.*, Oct 2004;41(10):954-62: "Девять фенольных соединений (*п*-кумаровая кислота, феруловая кислота, гваякол, сирингол, *п*-метоксифенол, пирокатехол, флороглюцинол, 3,5-

дигидроксibenзойная кислота и синингалдазин) исследовали в отношении их способности увеличить продукцию лакказы у лигнолитических базидиомицет *Trametes* sp. I-62. Все эти соединения привели к увеличению активности лакказы, причем наиболее высокие уровни обнаруживались в присутствии п-кумаровой кислоты (в 273 раз) и гваякола (в 73 раза)".

[0118] Интересно, что многие зерна, предпочтительные для получения мицелиальной грибницы в грибной промышленности (см. *Growing Gourmet & Medicinal Mushrooms* автора настоящего изобретения, Paul Stamets, 1993, 2000, Ten Speed Press, Berkeley) также являются богатыми источниками п-кумаровых кислот и могут быть полезными в аттрактантных композициях для пчел. В качестве основных фенольных кислот в зернах риса были идентифицированы п-кумаровая кислота, феруловая кислота и синапиновая кислота.

[0119] П-кумаровая кислота находится не только в зернах, предпочтительных для получения грибницы, но также она образуется в ходе нормального жизненного цикла грибов, особенно перед формированием примордия. П-кумаровая кислота является мощным ингибитором тирозиназы – фермента, необходимого для меланинизации. Присутствие и распространенность п-кумаровой кислоты препятствует продукции пигментов темного цвета. Ультрафиолетовый свет стимулирует фотораспад п-кумаровых кислот, обеспечивая меланинизацию и запуская формирование примордия. После формирования примордия п-кумаровые кислоты деградируют в п-гидроксibenзойную кислоту. Sachan et al., Transforming p-coumaric acid into p-hydroxybenzoic acid by the mycelial culture of a white rot fungus *Schizophyllum commune*, 2010, *African Journal of Microbiology* 4:267-273. В качестве неограничивающего примера, мицелий *Auricularia auricula* (*A. auricularia-judae*), когда его выращивают в культуре, имеет беловатый цвет и лишен меланина, но содержит п-кумаровые кислоты. Когда мицелий грибов подвергается воздействию света, мицелий биологически трансформируется, формируя темно-коричневые плодовые тела, которые имеют более высокое содержание меланина, когда они созревают, причем одновременно снижается количество п-кумаровых

кислот, ингибитора меланина. Это является одним из примеров и убедительным доказательством пользы применение мицелия светлого цвета до меланинизации в качестве источника мицелия для получения экстрактов, полезных для пчел, вследствие их высокого присущего им содержания п-кумаровой кислоты, усиленного нативным содержанием п-кумаровых кислот в зернах, которые используют для получения грибницы для выращивания мицелия. Интересно, что идеальным моментом для получения наибольшей пользы от мицелия вследствие его содержания питательных веществ и п-кумаровой кислоты, является короткое окно, часто длительностью всего несколько суток, до и сразу после воздействия света, но до развития плодового тела темного цвета за пределы белой примордиальной стадии.

[0120] Учитывая, что некоторыми из наиболее интенсивных продуцентов лакказы, еще исследуемыми на настоящий момент, являются *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor* и *Pleurotus ostreatus*, эти виды являются особенно предпочтительными для создания полезных для пчел смесей.

[0121] Когда пчелы не подавлены иммунологически вследствие созданных человеком и природных токсинов, естественная иммунная защита пчел может лучше защищать пчел от других вредоносных агентов, включая вирусы и патогены, передаваемые клещами *Varroa*.

[0122] Автор настоящего изобретения полагает, что по мере расширения знаний о многих производных настоящего всеохватывающего изобретения, отдельные виды грибов будут обеспечивать уникальный набор полезных факторов. Некоторые будут в большей степени противовирусными. Некоторые будут активировать каскады детоксикации у пчел лучше, чем другие, против различных токсинов. Некоторые будут испускать ароматы с более высокими привлекающими свойствами. По существу, смеси или "грибные коктейли" определенного типа можно корректировать в соответствии с потребностями пчел, пчеловодов, исходя из их желаемой намеченной пользы, конкретных факторов экосистемы, и кондиционировать при доступности базовых материалов.

[0123] Например, для промышленности пчеловодства является важной защита и получение новых маток. Маток разводят и

выращивают специальные специалисты по разведению, и они имеют риск заражения клещами, передающими вирус черных маточников (BQCV). Поиск селективного противовирусного препарата для защиты маток, является другим существенным преимуществом настоящего изобретения. Для разведения и выращивания маток, как *Inonotus obliquus*, так и *Ganoderma resinaceum*, являются очень активными противовирусными добавками для снижения уровня вируса черных маточников (BQCV), но не являются настолько же активными против вируса деформации крыла (DWV), в то время как другие виды являются более активными против DWV. Таким образом, смесь двух или более видов грибов является предпочтительной для обеспечения широкой биозащиты пчел в виде противовирусной активности.

КЛЕЩИ VARROA И НАСЕКОМЫЕ-ПАРАЗИТЫ:

[0124] Автор настоящего изобретения получил несколько патентов на композиции и способы с использованием преспулирующего мицелия энтомопатогенных грибов в качестве аттрактанта и средства обработки для контроля насекомых, и более широкие патенты находятся на рассмотрении (патентная заявка США № 13/986978) в отношении членистоногих, и вызывающих заболевания насекомых и членистоногих-векторов (патентные заявки США № 13/317613 и 13/373719). Клеши *Varroa* известны в качестве вектора для израильского вируса острого паралича и вирусов кольцевой пятнистости табака. Клеши *Varroa*, являющиеся клещами, кусающими как растения, так и насекомых, содержат более одного вирусного или бактериального патогена, что означает, что клещи являются одним, хотя и значительным, вектором, несущим и вносящим множество патогенов при атаке, угрожающей здоровью улья. Поскольку пчелы ослабевают под воздействием вируса, например, они в меньшей степени способны избавляться от прикрепляющихся клещей *Varroa*. Однако мицелий энтомопатогенных грибов, в частности, *Aspergillus flavus*, *Metarhizium anisopliae* и *Beauveria bassiana*, можно использовать для привлечения, истощения или уничтожения клещей *Varroa*, снижая их активность, доставку патогенных грузов и количеств патогенов, таким образом, склоняя равновесие в сторону улучшения иммунной защиты колонии против CCD. Аналогично, споры энтомопатогенных грибов, включая

Metarhizium, *Beauveria* и *Entomophthorales*, можно использовать для истощения или уничтожения клещей *Varroa*, хотя клещи могут находить споры отталкивающими по сравнению с преконидиальным мицелием.

[0125] Более того, экстракты *Metarhizium anisopliae* можно получать специально для привлечения, но не уничтожения, насекомых, в том числе пчел, путем выращивания штаммов *Metarhizium anisopliae*, которые не содержат деструктинов или имеют сниженные уровни их или других токсинов или сниженную вирулентность и патогенность. Существует вариабельность токсинов по сравнению с многими штаммами *Aspergillus flavus*, известного энтомопатогенного гриба, в основном токсичного вследствие его содержания афлатоксина. В настоящее время доступны свободные от афлатоксина штаммы *Aspergillus flavus*, которые являются встречающимися в природе или могут быть получены посредством селекций культур или генетических модификаций. Также можно создавать свободные от деструктинов штаммы *Metarhizium anisopliae*, подвергать селекции или получать на основе природных геномов. Также можно получать штаммы, которые не полностью свободны от деструктинов или афлатоксинов, но продуцируют настолько низкие их уровни, что они могут быть токсичными для клещей, но не очень токсичными для пчел вследствие того факта, что уровни и каскады цитохрома P450 пчел усиливаются под воздействием кумаринов и других полифенолов, презентруемых мицелием. По существу, активация цитохромов p450 (CYP) может помочь пчелам лучше переносить или детоксифицировать деструктины или афлатоксины, воздействию которых пчелы подвергаются из *Metarhizium anisopliae* и *Aspergillus flavus*, и других токсинов, продуцируемых энтомопатогенными грибами.

[0126] Преимущество свободного от деструктина штамма или штамма со сниженным уровнем деструктина *Metarhizium anisopliae* состоит в том, что могут быть получены экстракты мицелия с высоким содержанием сахаров и терпенов, которые могут одновременно привлекать пчел и клещей. Применение решетки соответствующего размера или барьера или других средств селекции позволяет отделение клещей от пчел, так что как пчелы, так и

клещи, могут первоначально привлекаться в одну и ту же область с экстрактами (или аналогично привлекаться к преконициальному мицелию). Пропорциональность эндемических энтомопатогенных токсинов может быть сбалансирована так, чтобы истощать клещей, но не пчел. Использование одного или нескольких экстрактов грибов, как описано в настоящем описании, обеспечивает свободу и гибкость индивидуального исполнения, так что можно получать многочисленные устройства, системы доставки, композиции и способы, доступные впервые, чтобы улучшить состояние здоровья пчел и снизить CCD. Горбатки, комары и клещи, питающиеся грибами, хорошо известны в грибной промышленности. Не было известно, что экстракты энтомогенных грибов перед споруляцией являются привлекательными для этих насекомых и членистоногих. Автор настоящего изобретения полагает, что водно-этанольные экстракты грибов или мицелия грибов с этими аттрактантными свойствами не были известны в грибной промышленности до описания автором изобретения в совместно рассматриваемых и одобренных патентах.

[0127] Комбинирование щавелевой кислоты с обогащенной сахаром водой, нагруженной спорами или преконициальным мицелием энтомопатогенных грибов, таких как *Metarhizium anisopliae* и *Beauveria bassiana*, улучшит митотическое действие комбинации щавелевой кислоты и энтомопатогенных грибов и митотические свойства других компонентов, находящихся или добавленных, например, к воде с сахаром, лепешкам из пыльцы или средствам для опрыскивания пчел. Однако щавелевая кислота реагирует с минералами в экстрактах грибов, и это является препятствием для эффективного составления.

[0128] При комбинировании щавелевой кислоты с экстрактами нитчатых грибов базидиомицет, содержащиеся в них минералы (кальций, фосфор, железо) могут связываться с щавелевой кислотой, таким образом, снижая выщелачивание минералов, митотический потенциал щавелевой кислоты. Таким образом, вариантом осуществления настоящего изобретения является деминерализация экстрактов грибов до комбинирования щавелевой кислоты с экстрактами грибов. Для деминерализации можно использовать любой

из многочисленных способов, пригодных для деминерализации экстрактов грибов, чтобы предотвратить преобразование реакционноспособной щавелевой кислоты в нерастворимые в воде соли посредством устранения кальция и других минералов, находящихся в экстрактах грибов. Одним из множества доступных способов является применение технологий ионообменных смол. Экстракты грибов можно добавлять в дистиллированную воду предпочтительно в соотношении 1:10, с диапазонами от соотношения 1:1, являющегося наиболее концентрированным, до 1:100, являющегося наиболее разбавленным, но они являются менее предпочтительными. После завершения минералы в экстрактах грибов, которые в ином случае могут нейтрализовать митицидные свойства щавелевой кислоты, могут быть по большей части, или даже полностью, удалены. После этого щавелевую кислоту можно добавлять к экстрактам грибов с уменьшенным содержанием минералов в достаточном количестве, чтобы они имели митицидный эффект, в диапазоне 1-10% щавелевой кислоты по массе раствора, достигая низкого значения pH в диапазоне pH 0,5-3,5 с оптимальным диапазоном pH 0,5-2,0.

[0129] "Мы пытаемся понять ботанические источники и виды биологической активности смол в полевых условиях и то, как поведение добывания смолы изменяется в ответ на факторы внешней среды, такие как инфекция и другие биологические стрессовые факторы. Если бы мы могли открыть растения с предпочтительными и более антимикробными смолами в различных областях, было бы возможным создание окружающей среды, которая улучшает здоровье пчел путем поддержания поведения и организационных стратегий, которые приводит к естественной устойчивости к заболеваниям". Wilson et al., Metabolomics reveals the origins of antimicrobial resins collected by honey bees. *PLoS One* 8(10): e77512, page 11. Автор настоящего изобретения полагает, что чистые культивируемые грибы и мицелий грибов, включая аттрактанты грибов, энтомопатогены грибов, иммуностимуляторы грибов, противовирусные соединения, антибактериальные соединения и противогрибные соединения грибов могут аналогичным образом поддерживать здоровье пчел и приводить к природной устойчивости к

заболеваниям и пестицидам. Пчелы полезны для экосистем и экономики, которые в ином случае будут страдать без этих грибных лекарственных средств.

[0130] Автор настоящего изобретения также ожидает, что эффекты изобретения также будут полезными для опыляющих насекомых и животных (летучие мыши). Также ожидается, что аналогично птицам могут быть полезны сходные комплексные решения на основе грибов посредством добавления в корм питающихся нектаром животных и птиц, вследствие активации иммунологических генов и генов детоксикации, а также получения противовирусной пользы, таким образом, продлевая продолжительность жизни.

[0131] Нитчатые базидиомицеты также являются источниками нейродегенеративных соединений. Виды *Hericium* (включая, но не ограничиваясь ими *Hericium erinaceus*, *Hericium corralloides* и *Hericium abietis*) продуцируют мощные факторы роста нервов, вызывающие регенерацию миелина на аксонах нервов и регенерацию нервов. См. Stamets, Lion's Mane: A Mushroom That Improves Your Memory and Mood?, The Blog, Huffington Post Healthy Living, 08/08/2012. Псилоцибин и псилоцибин-содержащие грибы, включая, но не ограничиваясь ими, виды *Psilocybe*, *Panaeolus*, *Gymnopilus*, *Pluteus* и *Conocybe*, такие как *Psilocybe azurescens*, *Psilocybe cyanescens*, *Psilocybe allenii*, *Psilocybe cyanofibrillosa*, *Psilocybe cubensis*, *Psilocybe ovoideocystidiata*, *Psilocybe subaeruginosa*, *Copelandia Panaeoli* (*Copelandia cyanescens*, *Copelandia tropicalis*, *Copelandia bispora*), *Pluteus salicinus*, *Gymnopilus luteofolius*, *Gymnopilus spectabilis*, *Conocybe cyanopus* и *Conocybe smithii* могут запускать нейрогенез. (См. Catlow et al., Effects of psilocybin on hippocampal neurogenesis and extinction of trace fear conditioning, *Exp Brain Res* (2013) 228:481-491 DOI 10.1007/s00221-013-3579-0). По отдельности или в комбинации, смеси экстрактов содержащих псилоцибин грибов и плодовых тел грибов *Hericium*, или, более предпочтительно, экстрактов их мицелия, могут способствовать восстановлению нейронов, поврежденных токсинами, холинэргическими пестицидами, окислением, старением или другими источниками нейротоксинов.

Суммарный эффект употребления этих смесей регенерирующих нервы грибов *Hericium* и псилоцибиновых видов могут улучшить нейрологическое здоровье пчел посредством нейрогенеза и ремиелинизации, и, безусловно, животных, в том числе человека. Другая улучшенная форма "микологического меда" может включать эти элементы для пользы пчел и людей, улучшая когнитивные способности, препятствуя или восстанавливая после нейропатий, которые проявляются как заболевания у человека, входящие в объем определений болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, паркинсонизма, MS (рассеянный склероз) или еще некатегоризированных форм нейрологических нарушений. Действительно такие комбинации могут улучшить умственные способности, способности к ощущению, память, рефлексы, время реакции и способность к решению проблем. В сущности, предполагается, что такой "интеллектуальный микологический мед" входит в объем настоящего изобретения.

[0132] *Ganoderma lucidum* являются одним из представляющих особый интерес видов (вместе с *Ganoderma resinaceum*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma brownii*, *Ganoderma curtisii*, *Ganoderma oregonense*, *Ganoderma tsugae*, *Ganoderma lingzhi*, *Ganoderma capense*, *Ganoderma annularis* и *Ganoderma collosum*) для автора изобретения, поскольку они не только обладают выраженными противовирусными свойствами, но также имеют комплексы сахаров, которые обеспечивают мицелий, продуцирующий подобный вязкому сиропу "микологический мед", который можно использовать для способствования выживанию пчел при CCD. Автор изобретения и его коллеги в Fungi Perfecti, LLC, также отметили, что экстракты *Ganoderma resinaceum* не замерзают, даже когда сублимационные сушилки достигают температур менее -50 C° в высоком вакууме, в то время как экстракты исследованных видов за пределами рода *Ganoderma* быстро сублимируются в сухое состояние в тех же условиях. Автор изобретения полагает, что экстракт мицелия *Ganoderma resinaceum*, и, вероятно, экстракты родственных видов *Ganoderma*, сохраняют жидкое состояние даже в криогенных условиях вследствие их уникального ассортимента комплексных сахаров,

стеринов и гликопротеинов, связывающихся с образованием уникальной жидкой матрицы, значительно отличающейся от любых других исследованных видов. Этот экстракт может иметь потенциал в качестве средства против замерзания с широкими применениями для медицины, авиационной радиоэлектроники, космических полетов, и может быть использован в условиях крайних температур для химии смазок, консервантов и экстремофилов.

[0133] Во всех из представленных ниже примеров автор настоящего изобретения ожидает, в качестве следствий его открытия, что способы биологически направленного фракционирования обеспечат увеличению активности, повышению эффективности и снижению стоимости получения, производства и внедрения указанных изобретений и его многих вариантов, которые станут очевидными после этого сдвигающего парадигму открытия.

ПРИМЕР 1

[0134] *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune* и другие виды грибов культивируют и мицелий выращивают на рисе, ячмене, льняном семени и других зернах, сельскохозяйственных отходах или продуктах лесоводства, таких как древесные опилки или древесная щепа (для перечня субстратов см. Stamets, *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*, 1993, Ten Speed Press, Berkeley, Ca. и Stamets & Chilton, *The Mushroom Cultivator*, Agarikon Press, Olympia, WA). Когда мицелий достигает массы роста (предпочтительно после выращивания в течение 5-60 суток при ферментации или твердофазной ферментации после инокуляции, но задолго до образования плодового тела) мицелиальную массу можно экстрагировать простым промыванием субстрата водой, смесью вода/этанол (оба из которых являются предпочтительными) или этанолом, или путем сжатия субстрата, все из которых приводят к жидкому текучему или пригодному для поглощения экстракту, включающему внеклеточные экссудаты. Эти экстракты можно использовать как есть, или к водным экстрактам можно добавлять спирт (25-50% по объему) в качестве консерванта и растворителя (который будет преципитировать растворимые в воде полисахариды).

Водно-этанольный экстракт можно выпаривать или удалять, или спирт и воду можно выпаривать или удалять по отдельности. Неочищенный экстракт можно подвергать фильтрованию для удаления клеток с использованием 0,12-0,20-мкм фильтра. Этот экстракт можно замораживать или сушить для последующего применения. Альтернативно можно использовать экстракты в неводных или неэтанольных растворителях, таких как DMSO, этилацетат, простой эфир и другие растворители или комбинации растворителей, известных в данной области, или можно использовать субкритические или сверхкритические жидкие экстракты с использованием, например, диоксида углерода или воды, и необязательных соразтворителей, таких как спирты, или можно использовать экстракты, полученные посредством обработки микроволновым излучением.

[0135] Экстракт можно добавлять к любой форме пищевого сырья для употребления пчелами. Исходный экстракт можно использовать непосредственно или разбавлять и добавлять в их питьевую воду, воду с сахаром, пчелиный леденец, мед, прополис, лепешку из пыльцы, лепешку из жира и белковые добавки для получения улучшенных кормов для пчел и питательных продуктов и улучшенных добавок к пыльце, пищевых добавок, добавок в корм и питательных добавок. Экстракты также можно включать в спреи, используемые для опрыскивания ульев, компонентов ульев, липких полосок, пчел и растений, и включать в воск, используемый для изготовления сот и магазинов. Употребление и контакт с ними пчел улучшает способность пчел к формированию иммунитета посредством активации ферментов, деградирующих токсины, снижает нагрузку патогенами и обеспечивает полезный для здоровья источник разнообразных сахаров, аминокислот, витаминов группы В и питательных веществ. Более того, преципитат, хотя и отделенный от супернатанта, является богатым питательными веществами и обладает противовирусными поддерживающими здоровье свойствами, и его также можно использовать в качестве сырья для пользы пчел. Как супернатант, так и преципитат, можно комбинировать и ферментативно конвертировать с использованием амилазы и других ферментов для дальнейшей трансформации крахмалов и других

ингредиентов в более эффективную композицию.

ПРИМЕР 2

[0136] Мицелий медицинских грибов выращивают с использованием способов жидкой культуры. В то время как выращивание на рисе может обеспечивать 30-40% конвертирование риса в мицелий, жидкая культура в емкости может иметь по существу полную конверсию с в >3х большим количеством мицелия на единицу массы. Таким образом жидкая культура мицелия в емкости и его внеклеточные метаболиты проще использовать для разработки по настоящему изобретению, поскольку процесс с использованием культуры в емкости устраняет необходимость в удалении не метаболизированных ингредиентов субстрата.

ПРИМЕР 3

[0137] Для получения экстракта мицелия используют равные объемы мицелия, выращенного на зерне (ячмень, льняное семя, рис, рожь, millet, пшено, рожь, кукуруза), семенах, в том числе орехах, древесных опилках или древесной щепе (калифорнийская пихта, сосны, дубы, березы, хлопковые деревья, оливы), и его погружают в раствор вода-этанол 50:50. Ему позволяют стоять при комнатной температуре в течение двух недель, а затем прессуют для выдавливания жидкого экстракта. В течение нескольких суток из водно-этанольного раствора выпадает преципитат. Водно-этанольный супернатант сливают с пастообразного преципитата. Через несколько дополнительных недель с использованием центрифуги преципитат далее концентрируют в полутвердое состояние. Эти влажные полутвердые вещества удаляют и нагревают до 50°C в течение 6-8 часов при перемешивании. Влажный объем полутвердых веществ уменьшают до приблизительно 40% от исходных влажных полутвердых веществ. Высушивание полутвердых веществ в карамелеобразное "подобное меду" вещество дает выход приблизительно 16% от первоначальной массы влажного твердого вещества. Таким образом, использование 1000 мл влажного твердого вещества (которое составляет 40% от первоначального экстракта) дает выход приблизительно 170 мл густого подобного сиропу карамелеобразного вещества. Продолжающееся нагревание и

перемешивание концентрирует это вещество в заметно более сладкое вещество. Экстракт можно кристаллизовать, преобразовывать в порошок и использовать в качестве замены другим способам обработки. Жидкие, полутвердые и кристаллизованные формы имеют заметно сладкий вкус и могут считаться медицинским подобным леденцу веществом, полезным как пчелам, так и людям, для широкого множества применений.

ПРИМЕР 4

[0138] Экстракт мицелия получают путем экстракции плодовых тел или мицелия базидиомицетных грибов, включая *Ganoderma resinaceum*, в горячей воде (80–100°C) в течение нескольких часов и комбинируют с водным экстрактом комнатной температуры (10–30°C) мицелия *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor* и/или *Schizophyllum commune*, выращенного на зерне или древесине. К этим водным экстрактам добавляют этанол для получения раствора с более чем 22% EtOH (этанол), предпочтительно 35–45% EtOH. После добавления этанола полисахариды преципитируются из раствора и оседают на дне сосуда для экстракции. После удаления супернатанта преципитированные полисахариды, обогащенные гликозидами, гликопротеинами и другими "подобными нектару" питательными веществами, собирают и нагревают при 50–70°C в течение нескольких часов, что приводит к образованию сладкого остатка, привлекательного и полезного для пчел. Альтернативно, супернатант можно хранить в течение нескольких суток, что дополнительно обеспечивает полезные преципитированные полисахариды. Эти преципитаты содержат комплексные сахара, противовирусные соединения, антибактериальные соединения, активирующие цитохром p450 кумаровые кислоты и кумарины, и их можно комбинировать с другими ингредиентами, используемыми в питьевой воде, лепешках из пыльцы, прополисе, пчелином воске, спреях или в любой системе доставки, при помощи которой пчелы могут контактировать с этими преципитатами, что помогает пчелам преодолеть стрессовые факторы, ассоциированные с синдромом краха колонии.

ПРИМЕР 5

[0139] Экстракт мицелия, полученный путем экстракции плодовых тел или мицелия базидиомицетных грибов, в том числе *Ganoderma resinaceum*, сначала помещают в 100% этанол (соотношение 1:1 по массе) на 1-7 суток. После дренирования этанола грибную или мицелиальную выжимку погружают в горячую воду (80-100°C) на несколько часов и комбинируют с полученным помещением в воду комнатной температуры (10-30°C) экстрактом мицелия *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor* и/или *Schizophyllum commune*, выращенного на зерне или древесине. К этим водным экстрактам добавляют экстракты в этаноле, описанные выше, для получения общего комбинированного раствора с более чем 22% EtOH, предпочтительно 35-45% EtOH. После добавления этанольной фракции полисахариды преципитируют из раствора и оседают на дне емкости для экстракции. *п*-кумаровая кислота, являющаяся более растворимой в этаноле, чем в воде, в большем количестве содержится в супернатанте, экстрагированном этанолом (этанольный супернатант с концентрированными *п*-кумаровыми кислотами является резервуаром полезных для пчел кодирующих р450 соединений). Этот водно-этанольный супернатант можно хранить в течение нескольких суток, что далее приводит к смеси полисахаридов, в которой пропорционально больше *п*-кумаровой кислоты, чем во фракциях горячей воды отдельно. Преципитат также содержит *п*-кумаровые кислоты и, кроме того, другие питательные вещества, которые можно использовать для кормления пчел. Эти обогащенные *п*-кумаровой кислотой преципитаты также содержат комплексные сахара, противовирусные соединения, антибактериальные соединения и семейства кумаринов, и могут быть комбинированы с другими ингредиентами, такими как растворимые в воде полисахариды грибов, кукурузный сироп или сахара, используемые для подслащения питьевой воды, или, кроме того, включаемые в качестве ингредиента в лепешки из пыльцы, прополис, пчелиный воск, спреи или в любую систему доставки, с помощью которой

пчелы контактируют с этими преципитатами, помогая пчелам преодолеть стрессовые факторы, ассоциированные с синдромом краха колонии.

ПРИМЕР 6

[0140] Для каждого типа экстракта мицелия (вида грибов), медоносных пчел смешанного возраста из одного улья собирали в один день и распределяли случайным образом в 16 клеток приблизительно по 100 пчел в каждой. Каждый набор из 16 клеток состоял из четырех контрольных клеток (кормление сахарным сиропом), четырех клеток низкой концентрации (кормление экстрактом мицелия в сахарном сиропе в концентрации 0,1% об./об.), четырех клеток средней концентрации (кормление экстрактом мицелия в сахарном сиропе при 1% об./об.) и четырех клеток высокой концентрации (кормление экстрактом мицелия в сахарном сиропе при 10% об./об.). В каждой группе из четырех клеток три клетки использовали для тестов продолжительности жизни и оставшуюся клетку реплики использовали для исследования общего количества вирусных частиц. Отдельный эксперимент проводили для оценки эффекта экстрактов грибов на конкретные типы вирусов.

Повышение продолжительности жизни

[0141] Для исследования продолжительности жизни (выживаемости), каждые сутки проводили мониторинг каждой реплики (три клетки для каждой концентрации в корме и контрольная группа) и подсчитывали погибших пчел. Для каждых суток эксперимента общее количество пчел, которые погибли в этот день, вносили в таблицу для каждой клетки реплики для каждого экстракта грибов и для контрольных групп. Затем эти таблицы с погибшими пчелами за каждые сутки использовали для вычисления процента пчел, которые все еще были живыми на каждые сутки эксперимента, от исходного количества. Затем, исходя из данных от трех клеток реплики для каждого экстракта грибов и для контрольной группы, вычисляли процентную частоту выживаемости.

[0142] Графики выживаемости строили с использованием времени, измеренного в сутках, в качестве независимой переменной (ось x), и среднего процента пчел, выживших в любой момент

времени в эксперименте, в качестве зависимой переменной (ось y); на графиках продолжительности жизни показан % выживших особей от первоначальной популяции в различные моменты времени. См. фиг.1-4. На фиг.1 представлен линейный график, демонстрирующий процентную выживаемость пчел с течением времени, которым давали экстракты мицелия *Inonotus obliquus* (0,1%, 1% и 10%, как показано, соответственно, точечной, пунктирной и двойной пунктирной линиями) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром (показана сплошной линией). На фиг.2 представлен линейный график, демонстрирующий процентную выживаемость пчел с течением времени, которым давали экстракты мицелия *Ganoderma resinaceum* (0,1%, 1% и 10%, как показано, соответственно, точечной, пунктирной и двойной пунктирной линиями) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром (показана сплошной линией). На фиг.3 представлен линейный график, демонстрирующий процентную выживаемость пчел с течением времени, которым давали экстракты мицелия *Fomitopsis pinicola* (0,1%, 1% и 10%, как показано, соответственно, точечной, пунктирной и двойной пунктирной линиями) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром (показана сплошной линией). На фиг.4 представлен линейный график, демонстрирующий процентную выживаемость пчел с течением времени, которым давали экстракты мицелия *Fomes fomentarius* (1%, показано светлой сплошной линией) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром (показано темной сплошной линией). Эти и сходные подходы можно использовать при применения настоящего изобретения на практике для демонстрации эффекта изобретения на здоровье и продолжительность жизни пчел. На фигурах представлены средние значения в экспериментах; планки стандартной погрешности были удалены для ясности.

[0143] Некоторые, но не все, из результатов этих предварительных экспериментов были статистически значимыми; после продолжения экспериментов с большим количеством реплик ожидаются улучшенные результаты. Статистическую значимость

оценивали с использованием оценки выживаемости Каплана-Мейера (ограничение по продукту), проведенной с использованием статистического программного обеспечения для исследований JMP® от SAS Institute, Inc. См. фиг.5, график оценки выживаемости Каплана-Мейера (ограничение по продукту), демонстрирующий долю пчел, выживших с течением времени в сутках, когда им давали экстракты мицелия *Fomes fomentarius* (0,1%, 1% и 10%, как соответственно показано точечной, пунктирной и двойной пунктирной линиями) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром (показано сплошной линией). Этот анализ сравнивал среднее время выживания для группы введения со средним временем выживания для контроля (кормление только водой с сахаром), и в нем использовался критерий Вилкоксона для оценки того, отличалась ли выживаемость статистически от случайного варьирования времени выживания пчел. На фиг.5 иллюстрируется этот вариант осуществления изобретения. В этом анализе композиция *Fomes fomentarius* при кормлении в концентрации 1% об./об., повышала среднюю выживаемость пчел на 9,7% ($p < 0,0006$).

[0144] Как продемонстрировано на фиг.1-5, продолжительность жизни пчел, которых кормили экстрактами различных видов грибов, повышалась, причем увеличение продолжительности жизни зависело как от вида гриба, так и от концентрации, употребляемой пчелами. При применении настоящего изобретения на практике, в большинстве случаев это увеличение продолжительности жизни, возможно, является следствием снижения вирусной нагрузки (как описано ниже), но также обуславливалось другими аспектами изобретения в случаях, когда продолжительность жизни повышалась, однако количество вирусов не снижалось.

[0145] Увеличение продолжительности жизни может быть продемонстрировано при применении настоящего изобретения на практике с использованием графиков выживаемости, таких как, но не ограничиваясь ими, графики, описанные выше. Увеличение продолжительности жизни можно численно измерять при применении настоящего изобретения на практике посредством вычисления

отличий в выживаемости. Один такой способ основан на средней величине функции:

$$f_{avg} = \frac{1}{b-a} \int_a^b f(x) dx$$

[0146] Где величины "a" и "b" обозначают исходные и конечные сутки, на протяжении которых измеряли эффект изобретения, и "f(x)" обозначает функцию графика выживаемости, как описано выше. Отличие этих чисел на протяжении указанного временного интервала соответствует среднему процентному увеличению продолжительности жизни, достигаемому путем применения настоящего изобретения на практике по изобретению на протяжении указанного временного интервала.

[0147] Другие способы измерения отличий в продолжительности жизни, выживаемости или увеличении популяции, включая статистические способы, такие как анализ Каплана-Мейера, способ Нельсона-Аалена и другие способы, которые известны специалистам в данной области, являются альтернативами при применении настоящего изобретения на практике.

[0148] Аналогично, для применения на настоящего изобретения практике можно использовать различные количественные способы оценки количеств вирусов у пчел, включая полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и ОТ-ПЦР в реальном времени на основе амплификации кДНК способом ПЦР, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), включая как обычный, так и сэндвич-ELISA с различными блокирующими агентами, первичными/вторичными антителами, репортерными ферментами и растворами их специфических колориметрических субстратов для обнаружения и количественного определения, мультиплексные микрочипы с использованием молекулярных зондов для различных РНК-мишеней или ДНК-мишеней AGID (иммунодиффузия в агарозном геле), серологические способы на основе профилей белков или поликлональных и моноклональных антител и широкое множество других способов молекулярной биологии, таких как технологии высокопроизводительного секвенирования, технологии секвенирования на основе пирофосфатов, секвенирование по методу Сэнгера (также называемое способом терминации цепи) и

интегрированные системы обнаружения вирусов (IVDS). См., например, De Miranda, Diagnostic techniques for virus detection in honey bees, Aubert et al. (Eds.), *Virology and the honey bee*, EEC Publications (2008), pp. 121-232 и Evans et al., Standard methodologies for molecular research in *Apis mellifera*, *Journal of Apicultural Research* 52(4) (2013).

[0149] С использованием этого способа для измерения отличий в продолжительности жизни, автор изобретения определяет улучшение продолжительности жизни, как являющееся осуществлением настоящего изобретения. См. таблицу II, "Среднее процентное увеличение продолжительности жизни пчел". В таблице представлено отличие между средними величинами % выживших пчел при оценке на протяжении различных временных интервалов. Это отличие приведено в качестве числовой разности этих процентов причем средний процент выживших на протяжении различных временных интервалов вычисляли, как описано ранее:

Увеличение продолжительности жизни = $\frac{\text{средний \% ВЫЖИВШИХ}_{\text{при кормлении экстрактом грибов}} - \text{средний \% ВЫЖИВШИХ}_{\text{контроль}}}{\text{средний \% ВЫЖИВШИХ}_{\text{контроль}}}$

[0150] Увеличение продолжительности жизни увеличивает количество "пчелиных дней", когда рабочие или другие классы пчел доступны для сбора пыльцы и поддержания улья и выполнения другой работы, при этом улучшение состояния здоровья и увеличение выживаемости особей приводит к улучшению здоровья и выживаемости колонии.

Снижение общего уровня вируса

[0151] Для исследования противовирусных свойств каждого типа экстракта мицелия (вида грибов), медоносных пчел смешанного возраста из одного улья собирали в один день и распределяли случайным образом в четыре клетки приблизительно по 100 пчел в каждой. Это испытание проводили параллельно испытанию продолжительности жизни, описанному выше, с использованием пчел из тех же ульев на протяжении того же временного интервала. Набор клеток для каждого вида грибов состоял из контрольной клетки (кормление сахарным сиропом), клетки низкой концентрации (кормление экстрактом мицелия в сахарном сиропе в концентрации 0,1% масс./об.), клетки средней концентрации (кормление

экстрактом мицелия в сахарном сиропе в концентрации 1% об./об.) и клетки высокой концентрации (кормление экстрактом мицелия в сахарном сиропе в концентрации 10% об./об.).

[0152] Образцы пчел извлекали из клеток и замораживали на 0 сутки, 7 сутки и 14 сутки. Анализ общего количества вирусных частиц, безотносительно вида вирусов, проводил Dr. David Wick из BVS, Inc. с использованием технологии IVDS; см. патенты США № 8524155, 8309029, 8146446, 8021884, 7850908, 7250138, 6491872, 6485686 и 6051189 (все Charles Wick) и Charles H. Wick, Integrated Virus Detection, CRC Press (2014). Для анализа каждого образца 6,0 граммов пчел смешивали с 100 мл воды, очищенной обратным осмосом (RO) и подвергали грубой фильтрации через двухслойную марлю. Затем субобразец объемом 90 мл центрифугировали в течение 60 минут при 20000*g. Супернатант выделяли и подвергали ультрафильтрации через фильтрационную систему с полыми волокнами с порогом 500000 Дальтон, а затем промывали 200 мл RO воды и уменьшали в объеме до приблизительно 2 мл. Раствор подготавливали для анализа с использованием интегрированной системы обнаружения вирусов (IVDS) с использованием разведения 1:10 ацетатом аммония (AA). Каждый образец фильтровали через 20-мкм бумагу w-41 или 0,45-мкм фильтр PTFE. Образцы сканировали пять раз с использованием IVDS и регистрировали средние уровни вируса.

[0153] Как продемонстрировано на фиг.6, 7, 8 и 9, общая вирусная нагрузка на пчел, которых кормили экстрактами различных видов грибов, была снижена, причем уменьшение уровня вирусов зависело как от вида грибов, так и от концентрации, употребляемой пчелами. На фиг.6 представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая общий уровень вирусных частиц у пчел, которым давали экстракты мицелия *Inonotus obliquus* (0,1%, 1% и 10%, как соответственно показано точечной, пунктирной и двойной пунктирной линиями) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром (показано сплошной линией) в нулевой момент времени, через одну неделю и две недели. На фиг.7 представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая общий уровень вирусных частиц у пчел, которым

давали экстракты мицелия *Ganoderma resinaceum* (0,1%, 1% и 10%, как соответственно показано точечной, пунктирной и двойной пунктирной линиями) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром (показано сплошной линией) в нулевой момент времени, через одну неделю и две недели. На фиг.8 представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая общий уровень вирусных частиц у пчел, которым давали экстракты мицелия *Fomitopsis pinicola* (0,1%, 1% и 10%, как соответственно показано точечной, пунктирной и двойной пунктирной линиями) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром (показано сплошной линией) в нулевой момент времени и через одну неделю. На фиг.9 представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая общий уровень вирусных частиц у пчел, которым давали экстракты мицелия *Schizophyllum commune* (0,1%, 1% и 10%, как соответственно показано точечной, пунктирной и двойной пунктирной линиями) с водой с сахаром по сравнению с контрольной популяцией, которую кормили только водой с сахаром (показано сплошной линией) в нулевой момент времени и через две недели. Эти и сходные фигуры можно использовать при применении настоящего изобретения на практике для демонстрации эффекта изобретению на здоровье пчел. При применении настоящего изобретения на практике, большинство, но не все, из видов, которые обеспечивали увеличенную продолжительность жизни, также снижали вирусную нагрузку. Это подразумевает, что снижение уровня вирусов может способствовать увеличению продолжительности жизни, однако это улучшение продолжительности жизни можно было наблюдать без снижения уровня вирусов вследствие других благоприятных аспектов изобретения, таких как общая стимуляция иммунитета роя и антибиотическая активность против невирусных патогенов, таких как *Nosema*. При применении на практике настоящего изобретения возможно множество причин увеличения продолжительности жизни, поскольку различные виды грибов, по-видимому, имеют различные и специфические способы действия против различных патогенов пчел, как описано ниже в качестве неограничивающего примера.

[0154] Снижение общей вирусной нагрузки можно измерять при применении настоящего изобретения на практике путем вычисления разности в обнаруженном вирусе между пчелами, к которым применяли изобретение, и пчелами, которых не подвергали воздействию настоящего изобретения. Один такой способ количественного определения этой разности основан на средней величине функции:

$$f_{avg} = \frac{1}{b-a} \int_a^b f(x) dx$$

[0155] Где величины "a" и "b" обозначают исходные и конечные сутки, на протяжении которых измеряли эффект изобретения, и "f(x)" обозначает уровень обнаружения вируса в зависимости от времени взятия образца. "Процентное отличие" этих величин на протяжении указанного временного интервала соответствует среднему "процентному снижению" уровня вируса, достигнутому посредством применения настоящего изобретения на практике на протяжении указанного временного интервала. Другие способы измерения отличий в уровнях вирусов с течением времени, включая процентное отличие в отдельные моменты времени взятия образцов, среднее отличие и статистические способы, такие как анализ Каплана-Мейера, являются приемлемыми альтернативами при применении настоящего изобретения на практике и включены в качестве ссылок. С использованием способа, описанного выше, для измерения отличия между уровнями вирусов на протяжении различных временных интервалов, автор изобретения определяет снижение вируса как являющееся осуществлением настоящего изобретения. См. таблицу I, "Среднее процентное снижение общей вирусной нагрузки".

[0156] В таблице представлено отличие между средними величинами % выживших пчел при оценке в различные временные интервалы. Это отличие приведено не в качестве числовой разности этих процентов, а вместо этого в качестве "процентного снижения":

$$\begin{aligned} &\% \text{ снижение вирусной нагрузки} \\ &= \frac{\text{средний титр вирусов}_{\text{кормление экстрактом грибов}} - \text{средний титр вирусов}_{\text{контроль}}}{\text{средний титр вирусов}_{\text{контроль}}} \times 100 \end{aligned}$$

Виды грибов/специфичность к заболеваниям

[0157] Конкретные типы экстракта мицелия (вид грибов) при кормлении пчел смешанного возраста могут снизить уровень этиологических факторов заболеваний, таких как вирусные частицы, видоспецифическим образом. Этот вариант осуществления изобретения был продемонстрирован путем кормления экстрактами грибов пчел в клетках и измерения уровней конкретных типов вирусов у пчел с течением времени. Для этого анализа собирали пчел смешанного возраста из одного улья в один день и равномерно распределяли случайным образом в 12 клеток. В четырех клетках проводили кормление экстрактом мицелия *Ganoderma lucidum* var. *resinaceum* в концентрации 1% об./об. в сахарном сиропе, в четырех клетках проводили кормление экстрактом мицелия *Inonotus obliquus* в концентрации 1% об./об. в сахарном сиропе, и четыре клетки использовали в качестве контроля и в них проводили кормление только сахарным сиропом.

[0158] Образцы пчел извлекали из клетки и замораживали на 0 сутки, 3 сутки, 7 сутки и 14 сутки. Пчел отправляли Dr. Yanping (Judy) Chen в United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service для анализа с использованием ОТ-ПЦР в реальном времени, как описано в Chen et al., Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of Deformed Wing Virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.), Appl. Environ. Microbiol., Vol. 71 (2005), p. 436-441 и Khongphinitbunjong et al., Differential viral levels and immune gene expression in three stocks of *Apis mellifera* induced by different numbers of *Varroa destructor*, Journal of Insect Physiology, Vol. 72 (2015), p. 28-34.

[0159] В этом анализе количественно определяли уровни вируса на основе накопления флуоресцентного сигнала по мере того, как ДНК вируса амплифицировалась в реакции ПЦР. Порог числа циклов определяют как количество циклов, требуемое для того, чтобы флуоресцентный сигнал превысил фоновый уровень флуоресценции. Уровни порога числа циклов, таким образом, обратно пропорциональны количеству вирусной нуклеиновой кислоты-мишени (например, титру вируса) в образце (т.е. чем ниже уровень СТ, тем больше количество нуклеиновой кислоты-мишени в образце).

Как продемонстрировано на фиг.10, у пчел, которых кормили экстрактами мицелия *Ganoderma lucidum* var. *resinaceum* и *Inonotus obliquus*, происходило предотвращение увеличения уровней вируса черных маточников (как количественно определяли на основе порога числа циклов). См. фиг.10, линейный график, демонстрирующий порог числа циклов для вируса черных маточников с течением времени в контрольной популяции, которую кормили только водой с сахаром (показано сплошной линией 111), по сравнению с пчелами, которым давали экстракты мицелия *Inonotus obliquus* (1%) (показано пунктирной линией 112) и *Ganoderma resinaceum* (1%) (показано пунктирной линией 113) с водой с сахаром. Напротив, те же экстракты не имели значительного эффекта на уровни вируса деформации крыла. См. фиг.11, линейный график, демонстрирующий порог числа циклов для вируса деформации крыла с течением времени в контрольной популяции, которую кормили только водой с сахаром (показано сплошной линией 121) и у пчел, которым давали экстракты мицелия *Inonotus obliquus* (1%) (показано точечной линией 122) и *Ganoderma resinaceum* (1%) (показано пунктирной линией 113) с водой с сахаром.

[0160] Этот пример экстракта вида грибов, обладающего специфичностью против одного вирусного патогена, но не против других, является противовирусным вариантом осуществления изобретения. Также он подтверждает довод, что конкретные композиции экстрактов грибов аналогично могут быть специфичными к другим патогенам пчел (которые снижают продолжительность жизни), таким как *Nosema* и бактерии, и/или могут, главным образом, активировать метаболические, иммунные и детоксикационные системы пчел. Такие эффекты против невирусных патогенов или эффекты общего усиления метаболизма и иммунитета могут быть ответственными за те случаи, когда продолжительность жизни повышалась, однако вирусная нагрузка оставалась неизменной.

Обобщение, преимущества и значение

[0161] На сегодняшний день, автор настоящего изобретения имеет данные (как эксперимент по продолжительности жизни, так и эксперимент по снижению общей вирусной нагрузки) для 8 видов

медицинских грибов. Автор изобретения также провел третий эксперимент по снижению уровня определенного вируса, вируса черных маточников, только для *Ganoderma resinaceum* и *Inonotus obliquus*.

[0162] Автор настоящего изобретения в настоящем описании определяет меру, "индекс LV", который представляет собой: индекс LV=среднее процентное увеличение продолжительности жизни пчел, умноженное на среднее процентное снижение общей вирусной нагрузки.

[0163] Это вычисление дает число, которое присваивает равную значимость обоим аспектам, для измерения улучшения состояния здоровья колонии. Пустые рамки в таблицах ниже для противовирусной активности, продолжительности жизни или LV указывают на то, что либо продолжительность жизни, либо уменьшение вирусной нагрузки, были отрицательными или равными нулю в одном или обоих наборах данных.

[0164] Существует множество других возможных математических представлений, которые могут вывести взаимосвязь между этими наборами данных, например, такие как процентное увеличение продолжительности жизни, деленное на процентное снижение вирусной нагрузки. Это вычисление делает акцент на части, представляющей собой продолжительность жизни, которая теоретически может быть связана со снижением вирусной нагрузки, если бы соответствие между этими показателями составляло 1:1. Многочисленные возможности мероопределений будут очевидны специалистам в данной области и все такие способы мероопределения для улучшения состояния здоровья пчел должны считаться входящими в объем изобретения.

[0165] Общий подход, использованный в настоящем описании, состоит в сравнении "площади под кривой" для измерений продолжительности жизни и результатов измерения общего снижения вирусной нагрузки, как описано выше. Разность между площадями под кривой на протяжении данного временного интервала, равна числам в таблицах, касающихся продолжительности жизни. Разность площадей под кривой на протяжении данного временного интервала, выраженная как "процентное улучшение", равна числам в таблицах

общего снижения вирусной нагрузки. См. таблицу I "Среднее процентное снижение общей вирусной нагрузки" и таблицу II "Среднее процентное увеличение продолжительности жизни пчел". Затем эти величины могут быть соотнесены математически для иллюстрации представляющих интерес признаков при применении на практике настоящего изобретения, таких как композиции, которые являются наиболее предпочтительным для повышения продолжительности жизни и снижения общей вирусной нагрузки у пчел. См. таблицу III, Среднее процентное увеличение продолжительности жизни пчел × среднее процентное снижение общей вирусной нагрузки (индекс LV).

ТАБЛИЦА I				
Среднее процентное снижение общей вирусной нагрузки				
		Концентрация		
Вид		0,1%	1%	10%
	Временные рамки			
<i>Trametes versicolor</i>	0-7 сутки	7,5		9,0
	0-14 сутки	4,8		3,6
<i>Fomitopsis pinicola</i>	0-7 сутки	20,4	22,8	
	0-14 сутки	25,5	32,2	2,1
<i>Fomitopsis officinalis</i>	0-7 сутки			
	0-14 сутки	4,5		
<i>Schizophyllum commune</i>	0-7 сутки			3,8
	0-14 сутки	19,5	20,8	26,7
<i>Inonotus obliquus</i>	0-7 сутки	47,5	41,6	42,2
	0-14 сутки			
<i>Fomes fomentarius</i>	0-7 сутки	9,6		10,0
	0-14 сутки	9,3		
<i>Ganoderma applanatum</i>	0-7 сутки	2,5	3,6	1,0
	0-14 сутки	4,5	14,2	
<i>Ganoderma lucidum</i> var. <i>resinaceum</i>	0-7 сутки	73,4	64,4	76,7
	0-14 сутки	65,4	58,3	85,9
Предпочтительное	1-25% или большее снижение уровня вируса			
Более предпочтительное	15-25% или большее снижение уровня вируса			
Наиболее предпочтительное	>25% снижение уровня вируса			

ТАБЛИЦА II		
Среднее процентное увеличение продолжительности жизни пчел		
		Концентрация

Вид		0,1%	1%	10%
	Временные рамки			
<i>Trametes versicolor</i>	0-7 суток	4,1	0,2	5,0
	0-14 суток	3,8		7,8
	0-28 суток	1,6		3,7
<i>Fomitopsis pinicola</i>	0-7 суток	9,2	14,6	
	0-14 суток	13,5	14,1	
	0-28 суток	8,5	3,7	
<i>Fomitopsis officinalis</i>	0-7 суток	5,2	3,8	
	0-14 суток	2,3	1,0	
	0-28 суток	1,0		
<i>Schizophyllum commune</i>	0-7 суток	0,1		0,8
	0-14 суток	3,7	0,5	
	0-28 суток	0,1		
<i>Inonotus obliquus</i>	0-7 суток		1,6	1,2
	0-14 суток		4,1	2,1
	0-28 суток		3,7	
<i>Fomes fomentarius</i>	0-7 суток	1,7	22,1	13,5
	0-14 суток		16,1	
	0-28 суток		11,2	
<i>Ganoderma lucidum</i> var. <i>resinaceum</i>	0-7 суток			
	0-14 суток	2,2	3,7	
	0-28 суток	3,7	9,5	
Предпочтительное	1-5% или большее увеличение продолжительности жизни			
Более предпочтительное	3-5% или большее увеличение продолжительности жизни			
Наиболее предпочтительное	>5% увеличение продолжительности жизни			

ТАБЛИЦА III				
Среднее процентное увеличение продолжительности жизни пчел × среднее процентное снижение общей вирусной нагрузки (индекс LV)				
		Концентрация		
Вид		0,1%	1%	10%
	Временные рамки			
<i>Trametes versicolor</i>	0-7 суток	30,9		44,8
	0-14 суток	18,1		27,7
<i>Fomitopsis pinicola</i>	0-7 суток	187,5	332,7	
	0-14 суток	344,1	453,1	
<i>Fomitopsis officinalis</i>	0-7 суток			

	0-14 суток	10,4		
<i>Schizophyllum commune</i>	0-7 суток			3,1
	0-14 суток	72,6	9,6	
<i>Inonotus obliquus</i>	0-7 суток		67,0	51,2
	0-14 суток			
<i>Fomes fomentarius</i>	0-7 суток	16,2		135,2
	0-14 суток			
<i>Ganoderma applanatum</i>	0-7 суток			
	0-14 суток			
<i>Ganoderma lucidum</i> var. <i>resinaceum</i>	0-7 суток			
	0-14 суток	147,1	212,9	
Предпочтительный	индекс LV 1-200+			
Более предпочтительный	индекс LV 50-200+			
Наиболее предпочтительный	индекс LV 200+			

[0166] При применении настоящего изобретения на практике, композиции экстракта грибов можно по-разному ранжировать в отношении предпочтительности, в зависимости от предполагаемого применения композиции. Примеры включают, но не ограничиваются ими, ранжирование по улучшению продолжительности жизни, ранжирование по общему снижению вирусной нагрузки, ранжирование по увеличению продолжительности жизни и снижению вирусной нагрузки. Примечательно, что предпочтение также можно отдавать композициям, которые увеличивают продолжительность жизни, но не снижают вирусную нагрузку. Предполагается, что такие композиции будут повышать продолжительность жизни путем действия на стрессовые факторы пчел, которые не связаны с вирусами (примеры включают инфекцию Nosema, воздействие пестицидов, стрессовое воздействие холодных температур и т.д.).

ПРИМЕР 7

[0167] Экстракт *Ganoderma resinaceum* через 14 дней привел практически к 20% повышению выживаемости пчел относительно контролей. Также см.фиг.5. Это отличие может иметь большое значение для способствования выживанию колоний, поскольку продолжительность жизни рабочих пчел в течение этого критического времени приводит к тому, что пчелы-кормильцы не привлекаются преждевременно, что позволяет им лучше осуществлять уход, поддерживая потомство, следующее поколение, здоровым.

Добавление экстрактов мицелия из *Ganoderma resinaceum* приводило к резкому снижению общей нагрузки вирусными патогенами у пчел (от множества вирусов), в то время как контроль в виде сахара без экстрактов мицелия приводил к увеличению общей популяции вирусов. Поскольку многие энтомологи полагают, что вирусы являются наиболее существенной проблемой здоровья, часто способствующей последующей инфекции другими видами бактерий (т.е. гнилец) и грибов, снижение уровня вирусов может быть краеугольным преимуществом для защиты пчел от синдрома краха колоний и многих других ассоциированных с ними стрессовых факторов.

[0168] С точки зрения увеличения продолжительности жизни, добавление 1% экстрактов мицелия *Fomes fomentarius* и *Ganoderma resinaceum* в воду с сахаром (вода - 50 граммов, сахар 49,5 граммов, экстракт мицелия 0,5 граммов), статистически значимо увеличивало продолжительность жизни пчел - в значениях "количества суток жизни пчел" - на 17,6% и 8,9%, соответственно. Увеличенная средняя продолжительность жизни приводит к тому, что больше рабочих пчел становятся доступными для рабочих задач, что является значительным преимуществом для подвергнутых стрессу пчелиных колоний с очень низкой рабочей мощностью и подвергнутых стрессу колоний на краю краха. Когда в любой момент времени пчел больше, это имеет значение для сбора пыльцы и поддержания улья. Более того, может быть сохранено значительно больше ульев при кормлении пчел экстрактами мицелия в их воде с сахаром относительно пчел, которых кормят только водой с сахаром без экстрактов мицелия. До проведения полевых испытаний неизвестно, насколько больше пчелиных дней приведет к смещению равновесия в сторону способствования преодолению CCD, поскольку существует множество трудностей. Однако, среди ученых, исследующих пчел, имеется согласие, что увеличение продолжительности жизни рабочих пчел в стрессовых условиях является значительным преимуществом. Более того, когда экстракты получены, как в этих случаях, из древесины березы (вид *Betula*), являющейся тем же видом деревьев, на которых обитают трутовые грибы, и тем же видом деревьев, в которых гнездятся пчелы, экстракты могут стать более

эффективными при меньших расходах на получение. То, что может быть показана такая высокая выраженная активность мицелия, выращенного на рисе, служит в поддержку довода, что мицелий является причинным фактором пользы (контроли в виде риса не продемонстрировали активности). Использование мицелия, выращенного на рисе в качестве источника для инокуляции в 10-100х большей массы в форме березовых опилок, приводит к экспоненциальному расширению мицелия относительно экстрактов мицелия на рисе, описанных в настоящем описании. Мицелий растет в виде более разветвленных и компактных мицелиальных сетей на березовых опилках по сравнению с рисом, что означает, что образуются более высокие площади поверхности для экспрессии внеклеточных компонентов. Таким образом, автор настоящего ожидания полагает, что экстракты мицелия из березовых опилок будут предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0169] Предполагается, что многие *Ganoderma* и другие виды трутовых грибов также будут обеспечивать сходную "биозащиту". Не исключено, что существуют пластинчатые грибы, вследствие их тесного эволюционного родства с трутовыми грибами, которые будут обеспечивать аналогичную пользу.

ПРИМЕР 8

[0170] Жидкий экстракт мицелия, или преципитат такого экстракта, или концентрированный экстракт, из которого удален весь растворитель или его часть, содержащие эти активные вещества, можно добавлять в мед, обогащенную медом воду, воду с сахаром или пчелиный леденец, в пыльцу, в заместители пыльцы или к другим веществам иным образом, очевидным специалистам в области науки пчеловодства или коммерческой практики. Экстракт можно использовать в качестве дополнения к другим лекарственным средствам, делая их более эффективными. Экстракты могут быть в жидкой, замороженной, лиофилизированной, высушенной воздухом, осушенной вакуумом, дегидратированной с использованием технологии *Refractance window*, дегидратированной посредством обработки ультразвуковым излучением или частично очищенной форме в количествах, достаточных для наличия эффекта привлечения пчел

и/или пользы для здоровья пчел, продукции меда и опыления. Более того, эти производные формы экстрактов могут быть полезными для употребления человеком, поскольку они имеют приятный вкус, имеют высокое содержание антиоксидантов и другие свойства, полезные для людей, других животных, включая пчел.

ПРИМЕР 9

[0171] Предпочтительной системой доставки является включение экстрактов мицелия в лепешки из пыльцы или лепешки из жира. Лепешки из пыльцы изготавливаются пчеловодами и помещаются выше гнездового корпуса в качестве источника пищи. Они могут быть изготовлены из широкого диапазона материалов, включая сою, пивные дрожжи, сахарный сироп, и необязательно могут включать органически выращенную пыльцу. Эти лепешки из пыльцы служат в качестве питательной добавки для пчел. Поскольку их широко используют осенью, они помогают пчелам дожить до следующего года. Эти экстракты также содержат пищеварительные ферменты, которые помогают пчелам лучше метаболизировать источники пищи и помогают деградировать токсины и повышают базовый иммунитет.

ПРИМЕР 10

[0172] Смесь композиций, содержащих экстракты *Stropharia rugoso-annulata*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor* и/или *Schizophyllum commune*, которые вместе обеспечивают множество полезных факторов, можно добавлять в воду. *Stropharia rugoso-annulata* привлекает пчел, имеет подобный цветочному аромат и обеспечивает богатый сахарами (вплоть до 75 полисахаридов) источник питательных веществ. Экстракты *Fomes fomentarius* и *Fomitopsis officinalis* обеспечивают противовирусную пользу, плюс дополнительные полезные факторы, упомянутые для *Stropharia rugoso-annulata*. Все три экстракта содержат полифенолы и, более конкретно, кумарины, которые помогают активировать каскады фермента p450, который помогает пчелам детоксифицировать эндогенные, природные, чужеродные и антропогенные токсины и ассоциированные с ними вредоносные эффекты. Смесь этих экстрактов можно давать пчелам через их питьевую воду, их

обогащенную воду, мед, прополис, лепешки из пыльцы или даже в воске, используемом для получения заранее формируемых сот при создании магазинов для продуцирования меда.

ПРИМЕР 11

[0173] Добавление экстрактов мицелия *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Inonotus obliquus*, *Schizophyllum commune*, *Ganoderma resinaceum*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor* и/или *Inonotus obliquus* в воду с сахаром, которой обычно кормят пчел ранней весной до повышения уровней пыльцы, может помочь снизить нагрузку резидентными вирусами на ранних этапах сезона, препятствуя увеличению их количества до уровня, когда они становятся изменяющим поведение заболеванием или вызывают передачу патогенов между пчелами. Экстракты можно просто смешивать с водой с сахаром на уровне, достаточном для положительного эффекта. Диапазон предпочтительно может составлять 0,01-20% или более предпочтительно 0,1-10% от объема композиций сахара в воде, используемых пчеловодами. Экстракты сначала можно смешивать с водой, а затем добавлять к сахару для получения типичного сиропа. Высокое содержание сахара может действовать как консервант, обеспечивая высокую длительность противовирусных и антибактериальных свойств.

ПРИМЕР 12

[0174] Экстрактами мицелия медицинских грибов можно пропитывать бумажные ленты. Эти бумажные ленты можно комбинировать с адгезивом. Низкое значение pH многих экстрактов мицелия медицинских грибов, находящееся в диапазоне pH 0,5-4, является токсичным для клещей, но безвредным для пчел при контакте. Необязательно можно добавлять раствор щавелевой кислоты в эффективных количествах.

ПРИМЕР 13

[0175] Использование экстрактов мицелия или плодовых тел *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis officinalis*, *Inonotus obliquus*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor* и *Schizophyllum commune*, где экстракты являются концентрированными до формы, привлекательной для пчел и

достаточной при контакте для наличия эффекта снижения уровня вируса кольцевой пятнистости табака, израильского вируса острого паралича, вируса черных маточников, радужного вируса беспозвоночных, или IIV6, и микроспоридий *Nosema*, приводит к тому, что пчелы становятся способными лучше преодолевать синдром краха колонии.

ПРИМЕР 14

[0176] Применение экстрактов мицелия или плодовых тел *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis officinalis*, *Schizophyllum commune*, *Inonotus obliquus* и *Stropharia rugoso-annulata*, где экстракты являются концентрированными в форму, которая напоминает текстуру и консистенцию меда, в форме, привлекательной для пчел и достаточной при контакте для наличия эффекта снижения уровней вирусов, включая, но не ограничиваясь ими вирус кольцевой пятнистости табака, израильский вирус острого паралича, вирус черных маточников и микроспоридий *Nosema*, и вызывающей активацию каскадов фермента цитохрома р450, повышение общей иммунной функции, способности к собирательству, способности к перезимовке, устойчивости к засухе, способности переживать вымирание предоставляющих нектар растений, приводит к увеличению здоровья пчел, так что существует поддающаяся измерению польза для выживания и преодоления CCD в ульях и появления последующих поколений. Этот "микологический мед" можно использовать отдельно или можно смешивать с пчелиным медом для привлечения пчел и для обеспечения пользы для них. Более того, "микологический мед" может быть частично растворен в воде в качестве спрея для листьев растений, или его можно наносить непосредственно на пчел. Кроме того, этот "микологический мед" может выпускаться в продажу в качестве питательной добавки для употребления человеком.

ПРИМЕР 15

[0177] Пчелы, летающие к или от воды с сахаром, на входе в улей зависают и встряхивают их тела для устранения клещей. Если клещи падают через сетку, они контактируют или привлекаются к энтомопатогенному микоаттрактанту, который сам по себе может

быть летальным, или к инсектицидному мицелию, где клещи истощаются или погибают, что снижает способность клещей к перемещению и инфицированию, таким образом, уменьшая их угрозу для пчел. Более того, если пчел опрыскивают спреем, обогащенным щавелевой кислотой, паразитические клещи становятся более чувствительными к инфекционным или летальным свойствам энтомопатогенных грибов.

ПРИМЕР 16

[0178] Экстракты, фрагменты гифа или спор полезных грибов, таких как *Stropharia rugoso-annulata*, и споры энтомопатогенных грибов, таких как Entomophthorales, можно включать в качестве смеси в обогащенную экстрактом воду с сахаром, пищу для пчел или мед, что позволяет передачу в систему производства меда, обеспечивая пользу для потомства, трутней, матки и улья в целом.

ПРИМЕР 17

[0179] Экстракты мицелия или спор фрагментов гифа или ткани *Stropharia rugoso-annulata* можно предоставлять на бумажных полосках или в воде, доступной для пчел. Аромат *Stropharia rugoso-annulata*, к которому пчелы могут быть приучены, помогает собирающим пчелам возвращаться в их колонии, если эти ароматы находятся вблизи или в ульях. Такие ароматы могут испускаться любым способом, известным в области доставки ароматов, с помощью опрыскивателей, спреев или диспенсеров аэрозолей. Предполагается, что экстракты мицелия *Stropharia rugoso-annulata* и экстракты мицелия других грибов будут индуцировать следование по следу или навигационное поведение посредством "языка танцев" и следов запаха.

ПРИМЕР 18

[0180] Споры и гифы *Metarhizium anisopliae* можно смешивать с мицелием *Fomes fomentarius* для получения спреев и дымов против клещей Varroa, чтобы способствовать устойчивости пчел к клещам, вирусам и т.д. для преодоления CCD. Многие штаммы *Metarhizium* являются относительно нетоксичными; "Не ожидается вреда для людей от воздействия *Metarhizium anisopliae* штамма F52 вследствие проглатывания, ингаляции или касания продуктов, содержащих этот активный ингредиент". *Metarhizium anisopliae*

strain F52 (029056), Biopesticide Fact Sheet.

ПРИМЕР 19

[0181] Смесь композиций экстрактов *Stropharia rugoso-annulata*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor* и/или *Schizophyllum commune* и *Metarhizium anisopliae*, которые вместе обеспечивают множество полезных факторов, можно добавлять к воде. *Stropharia rugoso-annulata* привлекает пчел, имеет подобный цветочному аромат и обеспечивает богатый сахарами (вплоть до 75 полисахаридов) источник питательных веществ. Различные экстракты обеспечивают противовирусную и антибактериальную пользу и увеличение продолжительности жизни, плюс способность к привлечению *Stropharia rugoso-annulata*. Экстракты *Metarhizium anisopliae* могут быть предоставлены на клейких полосках или пленках, или в любом липком улавливающем клещей или горбатов веществе, или в воде, доступной им, для привлечения клещей и горбатов, где после контакта они истощаются или уничтожаются, снижая их способность быть векторами заболеваний; популяции клещей *Varroa* могут быть снижены с использованием экстракта *Metarhizium anisopliae* до изолирования гнездовой камеры, что снижает гибель пчел от воздействия клещей и заболеваний, которые они переносят. Все три экстракта содержат полифенолы и, более конкретно, кумарины, которые способствуют активации каскадов фермента p450, которые способствуют детоксикации эндогенных, чужеродных, природных и антропогенных токсинов и снижают ассоциированные с ними вредоносные эффекты. Раствор этих смешанных экстрактов может быть предоставлен пчелам через кормушки с нектаром, содержащие их питьевую воду или их обогащенную сахаром или фруктозой воду, посредством примешивания к пчелиному леденцу, меду, прополису, лепешкам из пыльцы или даже путем примешивания к воску, используемому для получения заранее формируемых сот при создании магазинов для продуцирования меда.

ПРИМЕР 20

[0182] Экстракты преконидиального мицелия *Metarhizium anisopliae*, патогенных для клещей и/или мух, можно смешивать со

спорами или фрагментами их гиф, и предоставлять на клейких полосках или пластинках, или в любом липком улавливающем клещей или горбатов веществе, или в воде, доступной для клещей. Эта комбинация привлекает клещей или мух, и при контакте инфицирует их энтомопатогенным грибом или подвергает их воздействию летальных доз энтомопатогенных токсинов.

ПРИМЕР 21

[0183] Экстракты преконидиального мицелия *Metarhizium anisopliae*, смешанные с экстрактами, спорами или фрагментами гифа *Stropharia rugoso-annulata*, могут быть предоставлены на бумажных полосках или в воде, доступной для пчел. Эта комбинация привлекает клещей или мух, и пчел, и при контакте наносит вред клещам и мухам, но не пчелам.

ПРИМЕР 22

[0184] Экстракты преконидиального мицелия *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* и *Aspergillus fumigatus* можно смешивать со спорами или фрагментами гиф *Stropharia rugoso-annulata* и предоставлять на бумажных полосках или в воде, доступной для пчел. Эта комбинация привлекает клещей или мух, и пчел, и при контакте наносит вред клещам и мухам, но не пчелам. Необязательно, можно использовать штаммы *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* и *Aspergillus fumigatus*, которые имеют сниженные уровни афлатоксина и нейротоксина ниже уровней, которые являются вредоносными для пчел, но выше уровней, наносящих вред клещам и мухам, таким образом, обеспечивая суммарную пользу для здоровья колонии пчел.

ПРИМЕР 23

[0185] Экстракты преконидиального мицелия *Metarhizium anisopliae* можно смешивать со спорами или фрагментами гиф *Stropharia rugoso-annulata* и предоставлять на бумажных полосках или в воде, доступной для пчел. Эта комбинация привлекает клещей или мух, и пчел, и при контакте наносит вред клещам и мухам, но не пчелам. Необязательно, можно использовать штаммы *Metarhizium anisopliae*, которые имеют сниженные уровни деструктина ниже уровней, которые являются вредоносными для пчел, но выше уровней, наносящих вред клещам и мухам, таким образом,

обеспечивая суммарную пользу для здоровья колонии пчел.

ПРИМЕР 24

[0186] Экстракты мицелия плодового тела и/или экстракты преконидиального мицелия *Metarhizium anisopliae* можно смешивать с экстрактами и производными из мелии индийской и предоставлять на бумажных полосках, в воде, доступной для пчел, или в спреях для местного нанесения. Эта комбинация привлекает клещей или мух, и пчел, и при контакте наносит вред клещам и мухам, но не пчелам. Необязательно, можно использовать штаммы *Metarhizium anisopliae*, которые имеют сниженные уровни деструктина ниже уровней, которые являются вредоносными для пчел, но выше уровней, наносящих вред клещам и мухам, таким образом, обеспечивая суммарную пользу для здоровья колонии пчел. Необязательно, концентрация экстрактов мелии индийской (или активного ингредиента азадирактина) и сахаров может быть сбалансирована для оптимизации пользы для пчел путем сокращения количеств клещей и их способности к собирательству, и их патогенной нагрузки. Более того, эта комбинация может быть далее усилена добавлением экстрактов базидиомицетных грибов из агариикоидных и полипороидных грибов, которые не только предоставляют уничтожающую клещей щавелевую кислоту и деградирующие токсины ферменты, но также активируют врожденные ферментативные каскады цитохрома р450 для разрушения антропоморфных токсинов и, кроме того, снижают уровень ассоциированных с вирусами, бактериями и грибами патогенов, поражающих пчел. Такие синергические эффекты множества компонентов имеют суммарный эффект способствования пчелам лучше переживать синдром краха колонии. Ожидается, что комбинация с использованием преконидиального мицелия *Metarhizium anisopliae*, экстрактов *Fomitopsis officinalis* и *Fomitopsis pinicola*, экстрактов мелии индийской, экстрактов *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* и *Stropharia rugoso-annulata*, помещенных и смешанных с водой, будет эффективной композицией и способом для получения поддающегося доставке эффективного спрея для пчел или ингредиента в лепешках из пыльцы или питьевой воде. Аналогичные

композиции можно распылять на растения или деревья, которые пчелы опыляют, принося пользу как растению, так и пчелам.

ПРИМЕР 25

[0187] Способы и композиции щавелевой кислоты, обогащенной сахарами (или полисахаридами) воды, и фрагментов преконициальных гиф из *Metarhizium anisopliae* при контакте с пчелами селективно наносят вред клещам, одновременно оказывая суммарную пользу для пчел. Эту композицию необязательно можно комбинировать с экстрактами мицелия медицинского гриба с противовирусными и усиливающими продолжительность жизни свойствами и включать в пищу для пчел.

ПРИМЕР 26

[0188] Комбинация экстрактов *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma resinaceum*, *Schizophyllum commune*, *Stropharia rugoso-annulata* и *Ganoderma resinaceum* в комбинации с экстрактами преконициального мицелия *Metarhizium anisopliae* для привлечения пчел и клещей, где контакт с этой комбинацией наносит повреждение клещам *Varroa*, снижая количество вирусов, патогенных грибов и бактерий, обеспечивает суммарную пользу для преодоления пчелами синдрома краха колонии.

ПРИМЕР 27

[0188] Комбинация преконициального мицелия *Metarhizium anisopliae* с полисахаридами *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma resinaceum*, *Ganoderma lucidum*, *Inonotus obliquus* и *Schizophyllum communes* для привлечения пчел и клещей, где контакт с этой комбинацией наносит вред клещам *Varroa*, снижая количество вирусов, патогенных грибов и бактерий, которые наносят вред пчелам, имеет суммарную пользу для преодоления пчелами синдрома краха колонии.

ПРИМЕР 28

[0190] Применение экстрактов мицелия или плодовых тел, лишенных меланина, таких как из так называемых плодовых тел альбиносов *Agaricus blazei*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Schizophyllum commune*, *Trametes elegans* и *Stropharia rugoso-annulata*, где экстракты являются

концентрированными в форму, которая напоминает текстуру и консистенцию меда, в форме, привлекательной для пчел и достаточной при контакте для наличия эффекта снижения уровня вируса кольцевой пятнистости табака, израильского вируса острого паралича, вируса черных маточников, радужного вируса беспозвоночных, или IIV6, и микроспоридий *Nosema*, и вызывающей активацию каскадов фермента цитохрома p450, повышение общей иммунной функции, способности к собирательству, способности к перезимовке, устойчивости к засухе, способности переживать вымирание предоставляющих нектар растений, приводит к улучшению здоровья пчел, так что существует поддающаяся измерению польза для выживания ульев и преодоления синдрома краха колонии и появления последующих поколений. Этот "микологический мед" можно использовать отдельно или можно смешивать с пчелиным медом для привлечения пчел и для обеспечения пользы для них. Более того, "микологический мед" может быть частично растворен в воде в качестве спрея для листьев растений или его можно наносить непосредственно на пчел. Кроме того, этот "микологический мед" может выпускаться в продажу в качестве питательной добавки для употребления человеком.

ПРИМЕР 29

[0191] Культивирование мицелия медицинского гриба на растительных материалах, которые обладают активностью против вирусов, включая *Ficus bengalensis* (Vad), *Ficus religiosa* (Pimpal), *Jasminum auriculatur* (Jaai), *Acacia catechu* (Khair), *Azadirachta indica* (ним), *Curcuma longa* (куркума), *Withania somnifera* (ашвагандха) и *Silybum marianum* (молочный чертополох). См. Deshpande et al., Antiviral activity of plant extracts against sac brood virus in vitro - a preliminary report, *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences* 3(6): November-December 2013, p. 1-22.

ПРИМЕР 30

ОБРАБОТАННЫЕ ГРИБАМИ СТРУКТУРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ СПОСОБСТВОВАНИЯ ЗАЩИТЕ КОЛОНИЙ ПЧЕЛ

[0192] Улья, как правило, изготавливаются из древесных волокон и укладываемых стопой рамок "магазинов", на которых

пчелы создают соты, богатые медом, над камерами для потомства. Эти магазины и другие рамки на основе древесины, используемые пчеловодами, в конечном итоге разрушаются часто растущей плесенью, которая может быть патогенной для пчел и может способствовать инвазии насекомых и членистоногих. В результате, пчеловоды, как правило, заменяют их магазинами, камерами для потомства и днищами и т.д. каждые несколько лет. Основа пчелиных ульев имеет тенденцию к более длительному существованию, однако в конечном итоге все камеры пчелиного улья разрушаются оппортунистическими, часто патогенными, грибами, и это в результате может отрицательно сказаться на здоровье колоний пчел.

[0193] Настоящее изобретение относится к добавлению, включению, пропитыванию, покрытию, внедрению или прикреплению спор или фрагментов мицелия, или их экстрактов, полезных грибов, более конкретно, образующих плодовое тело грибов класса Basidiomycetes/Basidiomycota или Ascomycetes, в каркасы ульев, которые обеспечивают пользу для здоровья пчел путем обеспечения иммунной защиты с одним или несколькими синергичными полезными факторами. Например, но не ограничиваясь этим, рамки магазинов можно изготавливать из листов древесины, древесного волокна и широкого диапазона сельскохозяйственных продуктов, которые могут быть связаны с мицелием, со спорами или без них. Такие пропитанные грибами панели не только обеспечивают структурную пользу, но также грибы могут иметь противовирусные, митицидные, антибактериальные, противогрибные, антиинсектицидные свойства, которые помогают пчелам жить на и в материалах, используемых для конструирования пчелиных ульев.

[0194] В дополнение к ульям, все структуры, в которых содержатся животные, можно преимущественно обрабатывать экстрактами или мицелием, включая клетки для птиц, стойла и структуры, которые содержат летучих мышей.

[0195] Материалы, которые можно использовать в качестве носителя для этих полезных грибов, могут быть изготовлены из древесины, прессованной древесины, биодegradуемых структурированных панелей, панельных заместителей древесины,

выращенной с использованием грибов, не биodeградируемых материалов, и они также могут быть включены в пчелиный воск, используемый для рамок, или даже в прополис, который пчелы используют для закрытия щелей. Композиции и способы по настоящему изобретению могут быть без труда включены в такое производство пчелиных ульев с открытыми исходниками.

[0196] В сущности, по мере старения пчелиных ульев, они постепенно, спорадически или все в большей степени обеспечивают пользу для здоровья пчел вследствие добавления вышеупомянутых грибов для уменьшения воздействия увеличивающихся стрессовых факторов, которые возникают по мере того, как коробки ульев становятся старше. Все из противовирусных свойств этих грибов, создания ими широкого набора комплексных и простых сахаров, продуцирования п-кумаровой кислоты и других активирующих цитохром р450 молекул, образования спор энтомопатогенных грибов, таких как *Metarhizium anisopliae*, которые наносят вред клещам, но не пчелам, действуют синергично, противодействуя множеству стрессовых факторов, от которых пчелы страдают на протяжении жизни колоний ульев из года в год.

[0197] Одним из многочисленных примеров является выращивание мицелия, например, трутовиков *Antrodia cinnomonea*, *Fomes fomentarius*, *Inonotus obliquus*, *Inonotus pini*, *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomitiporia robusta*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma australe*, *Ganoderma atrum*, *Ganoderma annulare*, *Ganoderma annularis*, *Ganoderma brownii*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Ganoderma tsugae*, *Lenzites betulina*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus pini*, *Phellinus weirii*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes elegans*, *Trametes versicolor* и пластинчатых грибов *Schizophyllum commune*, *Stropharia rugoso-annulata* и *Lentinus ponderosus*, на материалах сельскохозяйственных отходов, так чтобы мицелию можно было придать форму структурных панелей, используемых для конструирования коробов ульев для медоносных пчел. Кроме того, уничтожающий клещей гриб *Metarhizium anisopliae* можно выращивать в преконидиальном (преспорулирующемся) или постконидиальном (постспорулирующим) состоянии - или их смеси- и может быть

заклучен непосредственно в конструкционные панели, независимо от их композиции, в комбинации с грибами, описанными в настоящем описании, а также с другими видами, которые, как полагает автор настоящего изобретения, могут помочь пчелам, среди Basidiomycetes, Ascomycetes или Entomophthorales, Hypocreales или других грибов, атакующих клещей и горбатов.

[0198] Аналогично, курятники, кормушки для птиц, шпалеры из растений и т.д. можно конструировать из целлюлозных продуктов, пропитанных мицелием или спорами.

[0199] Более того, вышеупомянутые виды и многие родственные им виды содержат и секретируют деградирующие токсины ферменты, которые могут способствовать деградации инсектицидов (включая неоницитиноиды, неоцины), фунгицидов, пестицидов, формальдегидов, танинов, красителей, эндемических токсинов и широкого множества антропогенных токсинов.

[0200] Предпочтительный субстрат на основе древесины состоит из березовых панелей, досок или опилок (вид *Betula*) и предпочтительными видами являются трутовые грибы березы, такие как, но не ограничиваясь ими *Fomes fomentarius*, *Inonotus obliquus*, *Ganoderma resinaceum* и *Piptoporus betulinus*. Если он изготовлен из древесины хвойных деревьев, тогда идеальными кандидатами являются трутовые грибы, такие как *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis officinalis*, *Laetiporus sulphureus*, *Phellinus igniarius*, *P. pini*, *P. linteus* и *P. weirii*; или пластинчатые грибы, такие как *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus ponderosus*. *Trametes versicolor* (= *Coriolus versicolor*) представляет собой трутовый гриб, растущий на лиственных и хвойных деревьях, и также является предпочтительным видом для применения в контексте настоящего изобретения. В случае каждого из перечисленных видов их следует воспринимать в наиболее широком понимании вида, т.е. "в широком значении", и также ожидается, что близкородственные им виды будут полезны для помощи пчелам. По существу, при описании *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Trametes versicolor*, или любых других видов грибов, это означает *Fomitopsis officinalis* в широком значении,

Ganoderma applanatum в широком значении, *Ganoderma lucidum* в широком значении, *Ganoderma resinaceum* в широком значении, *Inonotus obliquus* в широком значении, *Trametes versicolor* в широком значении и сходное широкое описание любых других видов, каждое из которых означает, что оно относится к понятию вида, как описано в наиболее широкой таксономической интерпретации, охватывающей все исторические и современные синонимы, разновидности, формы и виды, которые отделились или отделятся в будущем от этих видов после публикации. Как известно в данной области, названия изменяются по мере того, как создаются новые концепции видов. Ожидается, что вид может быть использован в бесконечно широком значении, и многие из них приведены в ранее одобренных 8 патентах США автора настоящего изобретения и в совместно рассматриваемых патентных заявках, поданных на настоящий момент. Тем не менее, эти виды, ранее не описанные, теперь стали очевидными после открытия автора настоящего изобретения.

[0201] То, что трутовые грибы *Fomes fomentarius*, *Inonotus obliquus* и *Ganoderma resinaceum* являются активными против вирусов, которые наносят вред пчелам и человеку, является значительным, и, насколько известно автору настоящего изобретения, беспрецедентным с медицинской точки зрения. Более того, если эти полезные для перекрестных видов животных факторы экстрактов мицелия этих трутовых грибов, и, в действительности, многих грибов, могут быть достигнуты, тогда более одного вида животных могут получить пользу от широких противовирусных свойств мицелия этих видов. Таким образом, в скворечники, курятники, стойла и помещения для животных любого типа могут быть добавлены эти культуры, их экстракты или их споры, для иммунологической пользы и пользы защиты сообщества, препятствуя эскалации векторов заболеваний и даже излечивая заболевания всех их обитателей. Потенциально дома с использованием мицелия и грибов могут защищать обитателей от вирусов, бактерий, насекомых, членистоногих, токсинов, стрессовых факторов внешней среды, векторов заболеваний, и неожиданно могут сообщать приятные ароматы, специфичные для используемых грибов.

[0202] Экстракты, которые могут быть использованы для описанного выше изобретения, могут быть предоставлены в качестве побочного продукта продуктов, в которых используется мицелий для заполнения форм или шаблонов для создания структурированных материалов с растущим мицелием, таких как изолирующее покрытие, материалы для транспортировки для замены пенопласта, строительные материалы, упаковочные материалы, фильтрующие слои, фильтрационные мембраны, ткани, каркас для компьютерных чипов и процессоров на основе выращиваемого мицелия, нанопровода на основе микобактерий и т.д. Кроме того, эти полезные экстракты можно собирать путем экспрессии жидких компонентов субстратов, используемых на всех стадиях получения грибов, а также способами ферментации грибов, используемыми для получения темпе, коджи, ферментов, антибиотиков, усилителей роста растений и фармацевтических средства. В сущности, при разрастании мицелия, изготовленные из мицелия материалы часто высушивают. При этом внеклеточные и внутриклеточные метаболиты и другие жидкости должны быть удалены. При выращивании структурированных материалов на основе мицелия, избыточную жидкость удаляют и она, как правило, не ценится высоко. Настоящее изобретение изменяет назначение этого "остаточного" жидкого продукта в неожиданно высокоценный набор продуктов, которые могут быть обогащены противовирусными средствами, противомикробными средствами, ферментами, кислотами, активными ингредиентами и другими химическими веществами, полезными в рамках настоящего изобретения для того, чтобы помочь пчелам, и для многих других применений в медицине, химической инженерии, практике деградации и биоремедиации (микоремедиации). Более того, теперь высушенный мицелиальный продукт можно конструировать так, чтобы латентная популяция клеток грибов выжила в процессе сушки, для реактивации, только когда пчелиные улья стареют, вызывая выживание мицелия и его термоустойчивого склероция и хламидоспор и повторный рост для обеспечения необычной пользы – по мере старения ульев включенные полезные грибы конкурируют с грибными патогенами, обеспечивают питательные вещества, увеличивают общую продолжительность жизни колонии пчел. Полезные грибы могут быть

выбраны специально для выживания термоустойчивых хламидоспор и склероциев после изготовления выращенных с использованием мицелия структурных материалов. Жидкость измененного назначения от процесса прессования мицелия, а также термоустойчивый мицелий, находящийся на структурных материалах, можно комбинировать для синергической пользы для здоровья пчел.

ПРИМЕР 31

[0203] Мед собирают от пчел, которых кормили экстрактами мицелия, как описано выше. Этот медицинский мед помогает пчелам и людям, активируя пути деградации токсинов через каскады цитохрома P450. Поскольку мед является более чем пищей для пчел и людей, ожидается, что такой медицинский мед будет иметь широкий диапазон применений. Консервантные свойства меда могут поддерживать эти активные с медицинской точки зрения соединения более стабильными.

Пример 32

[0204] Для применения настоящего изобретения могут оказаться полезными α -амилаза, амилаглюкозидаза, бетулиновая кислота, кофеиновая кислота, протокатеховая кислота, транс-коричная кислота, феруловая кислота, галловая кислота, эллаговая кислота, ланостерин, инотодиол, траметоноловая кислота, гисполон, эргостерины, хризин, кордицепин, транс-о-кумаровая кислота, транс-п-кумаровая кислота, дигидрат эллаговой кислоты, эргостерин, линолеиновая кислота, транс-феруловая кислота, гидрат галловой кислоты, гексаналь, гисполон, 4-гидроксibenзойная кислота, гидрат кверцетина, гидрат рутина, сиреневая кислота, ванилиновая кислота, сульфериновая кислота, дегидросульфериновая кислота, эбуриковая кислота, 6-хлор-4-фенил-2Н-хромен-2-он, этил 6-хлор-2-оксо-4-фенил-2Н-хромен-3-карбоксилат, 7-хлор-4-фенил-2Н-хромен-2-он, этил 7-хлор-2-оксо-4-фенил-2Н-хромен-3-карбоксилат, псилоцибин, псилоцин и родственные им соединения, изомеры, структурные аналоги и в значительной степени сходные соединения. Также ожидается, что соединения будут полезными для других животных, в том числе человека.

ПРИМЕР 33

[0205] Поскольку протокатеховая кислота, ванилиновая кислота, коричная кислота, кофеиновая кислота и родственные им соединения, изомеры, структурные аналоги и в значительной степени сходные соединения являются широко распространенными и присутствуют во многих пищевых растениях, и протокатеховая кислота в природе на высоком уровне содержится в головном мозге и зернах коричневого риса, выращивание полезных для пчел видов грибов, упомянутых в настоящем описании, на субстрате, уже содержащем протокатеховую кислоту, ее предшественники и аналоги, вероятно, увеличит суммарное количество этих полезных для пчел соединений, и является другим вариантом осуществления для улучшения настоящего изобретения.

Пример 33

[0206] Экстракты спор, мицелия и фрагментов гифа или ткани плодового тела трутовых грибов *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomitopsis officinalis*, *Piptoporus betulinus*, *Ganoderma resinaceum*, *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune* и *Inonotus obliquus*, можно аэрозолировать или доставлять через капельные облака, распылять в ульях в комбинации со смесью спор-мицелия *Metarhizium anisopliae*. Такая смесь может снижать уровень вирусных патогенов, активировать каскады детоксикации у пчел, обеспечивать широкий набор комплексных и простых сахаров, витаминов для усиления иммунитета и продолжительности жизни улья. Более того добавление спор и мицелия *Metarhizium anisopliae* может инфицировать, контролировать и предупреждать клещи *Varroa* и горбатки. Эндогенная щавелевая кислота во всех этих грибах может способствовать контролю этих патогенов. Индивидуальное применение или комбинации трутовых грибов березы может ограничить рост грибов микроспоридия *Nosema* и вызывающих гнилец бактерий (таких как бактерии *Melissococcus plutonius*), наносящих вред колонии пчел. Такие аэрозолированные спреи можно доставлять с использованием ручных или ранцевых спреев. Альтернативно можно использовать поглощающие ленты, пропитанные описанными выше полезными средствами. Конструкционные материалы, используемые для конструирования корпусов пчелиных ульев, также

могут быть пропитаны и импрегнированы этими полезными средствами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для применения для улучшения состояния здоровья пчел посредством увеличения длительности жизни и снижения вирусной нагрузки, где указанная композиция содержит экстракт мицелия медицинского гриба в пищевую добавку для пчел, где композиция содержит 1% или менее по объему экстракта, и мицелий медицинского гриба выбран из группы, состоящей из *Inonotus obliquus*, *Ganoderma resinaceum*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum* и их комбинаций.

2. Композиция по п.1, в которой пищевая добавка для пчел содержит продукт, выбранный из группы, состоящей из воды, сахаров, сахарного сиропа, воды с кукурузным сиропом с высоким содержанием фруктозы, пчелиного леденца, нектара, пыльцы, лепешек из пыльцы, лепешек из жира, прополиса, пчелиного воска, пчелиных спреев, пчелиного корма, белковых добавок и их комбинаций.

3. Композиция по п.1, в которой мицелий медицинского гриба культивируют на субстрате, выбранном из группы, состоящей из твердых субстратов и жидких субстратов.

4. Композиция по п.1, в которой экстракт мицелия медицинского гриба выбран из группы, состоящей из водного экстракта мицелия медицинского гриба, водно-этанольного экстракта мицелия медицинского гриба, преципитата из водного экстракта мицелия медицинского гриба, осажденного добавлением этанола, супернатанта, оставшегося после удаления преципитата из водного экстракта мицелия медицинского гриба, осажденного добавлением этанола, преципитата из водно-этанольного экстракта мицелия медицинского гриба которому позволено осаждаться, концентрата водно-этанольного экстракта мицелия медицинского гриба, из которого удалена часть растворителя, супернатанта водно-этанольного экстракта, из которого удалена часть растворителя, экстракта мицелия медицинского гриба, из которого удален растворитель, экстракта мицелия медицинского гриба с неводным и неэтанольным растворителем, субкритического экстракта

или суперкритического экстракта мицелия медицинского гриба.

5. Композиция по п.1, где композиция, улучшающая состояние здоровья пчел, дополнительно содержит митицид, выбранный из группы, состоящей из синтетических митицид, природных митицид или их комбинаций, и где природные митициды выбраны из группы состоящей из экстрактов нима, щавелевой кислоты, муравьиной кислоты, молочной кислоты и их комбинации.

6. Композиция по п.1, где композиция, улучшающая состояние здоровья пчел, увеличивает продолжительность жизни пчел более чем на 3%.

7. Композиция по п.1, где композиция, улучшающая состояние здоровья пчел, снижает вирусную нагрузку более чем на 15%.

8. Композиция по п.1, где композиция для улучшения состояния здоровья пчел улучшает состояние здоровья пчел путем увеличения продолжительности жизни и снижения вирусной с индексом LV более 45.

9. Композиция для применения для улучшения состояния здоровья пчел, где указанная композиция содержит 1% по объему или менее по меньшей мере одного экстракта мицелия медицинского гриба, выбранного из группы, состоящей из *Inonotus obliquus*, *Ganoderma resinaceum*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum* var. *resinaceum* и их комбинаций и где при применении композицию наносят на пчел.

10. Композиция по п.9, которая дополнительно содержит митицид, выбранный из группы, состоящей из синтетических митицид, природных митицид или их комбинаций, где природные митициды выбраны из группы состоящей из экстрактов нима, щавелевой кислоты, муравьиной кислоты, молочной кислоты или их комбинаций.

11. Композиция по п.9, где мицелий медицинского гриба культивируют на субстрате, выбранном из группы, состоящей из твердых субстратов и жидких субстратов.

12. Композиция по п.9, где экстракт мицелия медицинского гриба выбран из группы, состоящей из водного экстракта мицелия

медицинского гриба, водно-этанольного экстракта мицелия медицинского гриба, преципитата из водного экстракта мицелия медицинского гриба, преципитированного добавлением этанола, супернатанта, оставшегося после удаления преципитата из водного экстракта мицелия медицинского гриба, преципитированного добавлением этанола, преципитата из водно-этанольного экстракта мицелия медицинского гриба, которому позволили осесть, концентрата водно-этанольного экстракта мицелия медицинского гриба, из которого удалена часть растворителя, супернатанта водно-этанольного экстракта, из которого удалена часть растворителя, экстракта мицелия медицинского гриба, из которого удален растворитель, экстракта мицелия медицинского гриба с неводным и неэтанольным растворителем, субкритического экстракта и суперкритического экстракта мицелия медицинского гриба и полученного с помощью обработки микроволновым излучением экстракта мицелия медицинского гриба.

13. Композиция для применения для улучшения состояния здоровья пчел, где указанная композиция содержит 1% по объему или менее по меньшей мере одного экстракта мицелия медицинского гриба, и где медицинский гриб выбран из группы, состоящей из *Inonotus obliquus*, *Ganoderma resinaceum*, *Fomitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum* var. *resinaceum* и их комбинаций для нанесения на объект, выбранный из группы, состоящей из ульев, компонентов ульев, пчелиного воска и их комбинаций.

14. Композиция по п.13, которая дополнительно содержит митицид, выбранный из группы, состоящей из синтетических митицид, природных митицид или их комбинаций, где природные митициды выбраны из группы состоящей из экстрактов нима, щавелевой кислоты, муравьиной кислоты, молочной кислоты или их комбинаций.

15. Композиция по п.13, где мицелий медицинского гриба культивируют на субстрате, выбранном из группы, состоящей из твердых субстратов и жидких субстратов.

16. Композиция по п.13, где экстракт мицелия медицинского

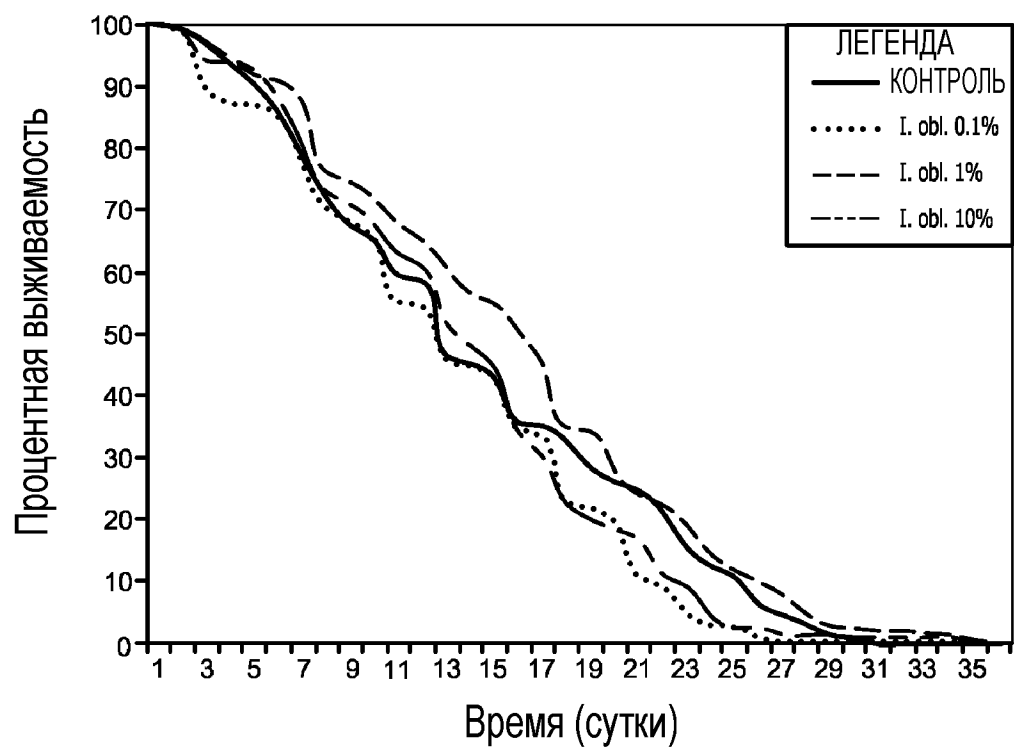
гриба выбран из группы, состоящей из водного экстракта мицелия медицинского гриба, водно-этанольного экстракта мицелия медицинского гриба, преципитата из водного экстракта мицелия медицинского гриба, преципитированного добавлением этанола, супернатанта, оставшегося после удаления преципитата из водного экстракта мицелия медицинского гриба, преципитированного добавлением этанола, преципитата из водно-этанольного экстракта мицелия медицинского гриба, которому позволили осесть, концентрата водно-этанольного экстракта мицелия медицинского гриба, из которого удалена часть растворителя, супернатанта водно-этанольного экстракта, из которого удалена часть растворителя, экстракта мицелия медицинского гриба, из которого удален растворитель, экстракта мицелия медицинского гриба с неводным и неэтанольным растворителем, субкритического экстракта и суперкритического экстракта мицелия медицинского гриба и полученного с помощью обработки микроволновым излучением экстракта мицелия медицинского гриба.

17. Композиция по п.1, где указанная композиция дополнительно включает по меньшей мере один экстракт мицелия медицинского гриба, выбранного из группы, состоящей из *Antrodia cinnomonea*, *Ganoderma atrum*, *Ganoderma brownii*, *Ganoderma curtisii*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma lingzhi*, *Ganoderma oregonense*, *Ganoderma tsugae*, *Fomitopsis officinalis* (*Laricifomes officinalis*), *Fomitiporia robusta*, *Heterobasidion annosum*, *Inonotus hispidus*, *Inonotus andersonii*, *Inonotus dryadeus*, *Laetiporus cincinnatus*, *Laetiporus sulphureus*, *Laetiporus conifericola*, *Lenzites betulina*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus linteus*, *Phellinus pini*, *Piptoporus betulinus*, *Polyporus elegans*, *Stereum complicatum*, *Stereum hirsutum*, *Stereum ostrea*, *Trametes elegans*, *Trametes gibbosa*, *Trametes hirsuta*, *Trametes villosa*, *Trametes cingulata*, *Trametes ochracea*, *Trametes pubescens*, *Trametes ectypa*, *Trametes aesculi*, *Wolfiporia cocos*, *Agaricus augustus*, *Agaricus blazei*, *Agaricus bonardii*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus campestris*, *Agaricus lilaceps*, *Agaricus subrufescens*, *Agaricus sylvicola*, *Agrocybe pediades*, *Agrocybe aegerita*, *Agrocybe arvalis*, *Agrocybe praecox*,

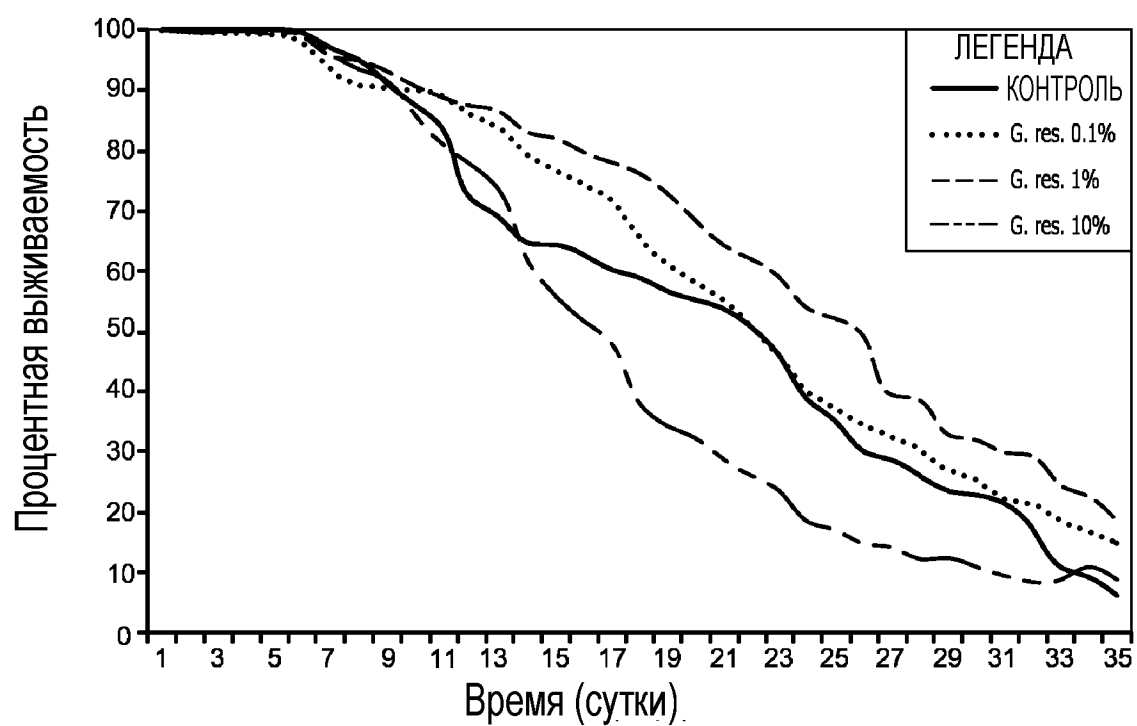
Clitocybe odora, *Conocybe cyanopus*, *Conocybe lacteus*, *Conocybe rickenii*, *Conocybe smithii*, *Conocybe tenera*, *Coprinopsis nivea*, *Coprinopsis lagopus*, *Coprinus comatus*, *Coprinus micaceus*, *Gymnopus hydrophilus*, *Gymnopus peronatus*, *Hypholoma aurantiaca* (*Leratiomyces ceres*), *Hypholoma capnoides*, *Hypholoma sublateralitium*, *Hypsizygus marmoreus*, *Hypsizygus tessulatus*, *Hypsizygus ulmarius*, *Lentinus ponderosus*, *Lepiota procera* (*Macrolepiota procera*), *Lepiota rachodes* (*Chlorophyllum rachodes*), *Lepista nuda*, *Mycena alcalina*, *Mycena pura*, *Mycena aurantiadisca*, *Panellus serotinus*, *Panaeolus foenisecii*, *Panaeolus subbalteatus*, *Pleurotus columbinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus cystidiosus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus tuberregium*, *Panellus stipticus*, *Panellus serotinus*, *Pluteus cervinus*, *Psathyrella aquatica*, *Psathyrella condolleana*, *Psathyrella hydrophila*, *Psilocybe allenii*, *Psilocybe azurescens*, *Psilocybe caerulescens*, *Psilocybe coprophila*, *Psilocybe cubensis*, *Psilocybe cyanescens*, *Psilocybe ovoideocystidiata*, *Psilocybe stuntzii*, *Psilocybe subaeruginosa*, *Stropharia aeruginosa*, *Stropharia cyanea*, *Stropharia rugoso-annulata*, *Stropharia semiglobata*, *Stropharia semigloboides*, *Stropharia squamosa*, *Stropharia thrausta*, *Stropharia umbonotescens*, *Termitomyces robusta*, *Volvaria bombycina*, *Volvariella volvacea* и их комбинаций, где композиция содержит общее количество 1% или менее по объему экстракта мицелия медицинского гриба.

18. Композиция для применения улучшения состояния здоровья посредством увеличения продолжительности жизни пчел и снижения вирусной нагрузки, где композиция включает экстракт мицелия медицинского гриба в пищевую добавку для пчел, где указанная композиция содержит 10% по объему или менее экстракта мицелия медицинского гриба, и где мицелий медицинского гриба выбран из группы, состоящей из *Fomes fomentarius*, *Trametes versicolor* и их комбинации.

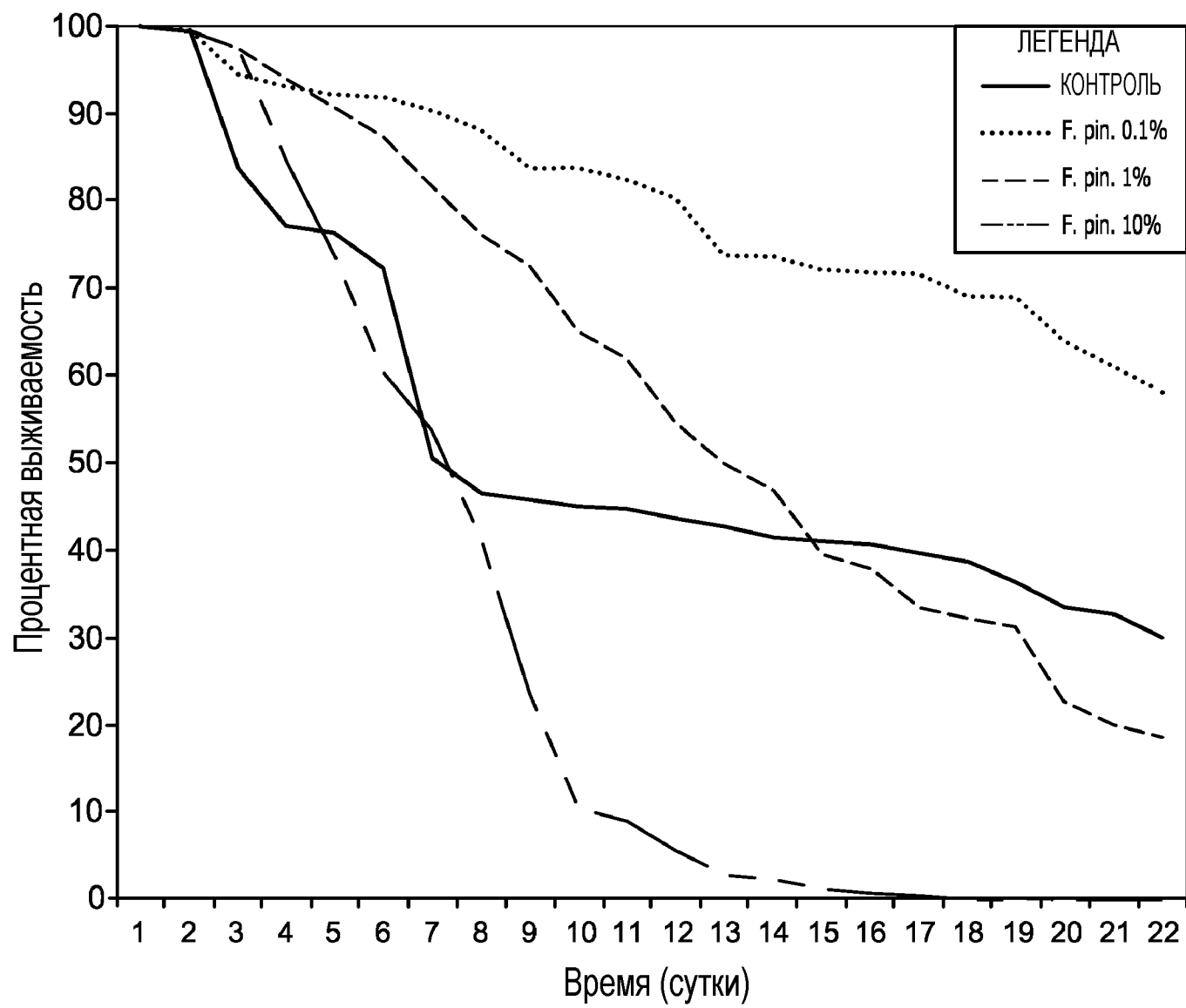
По доверенности



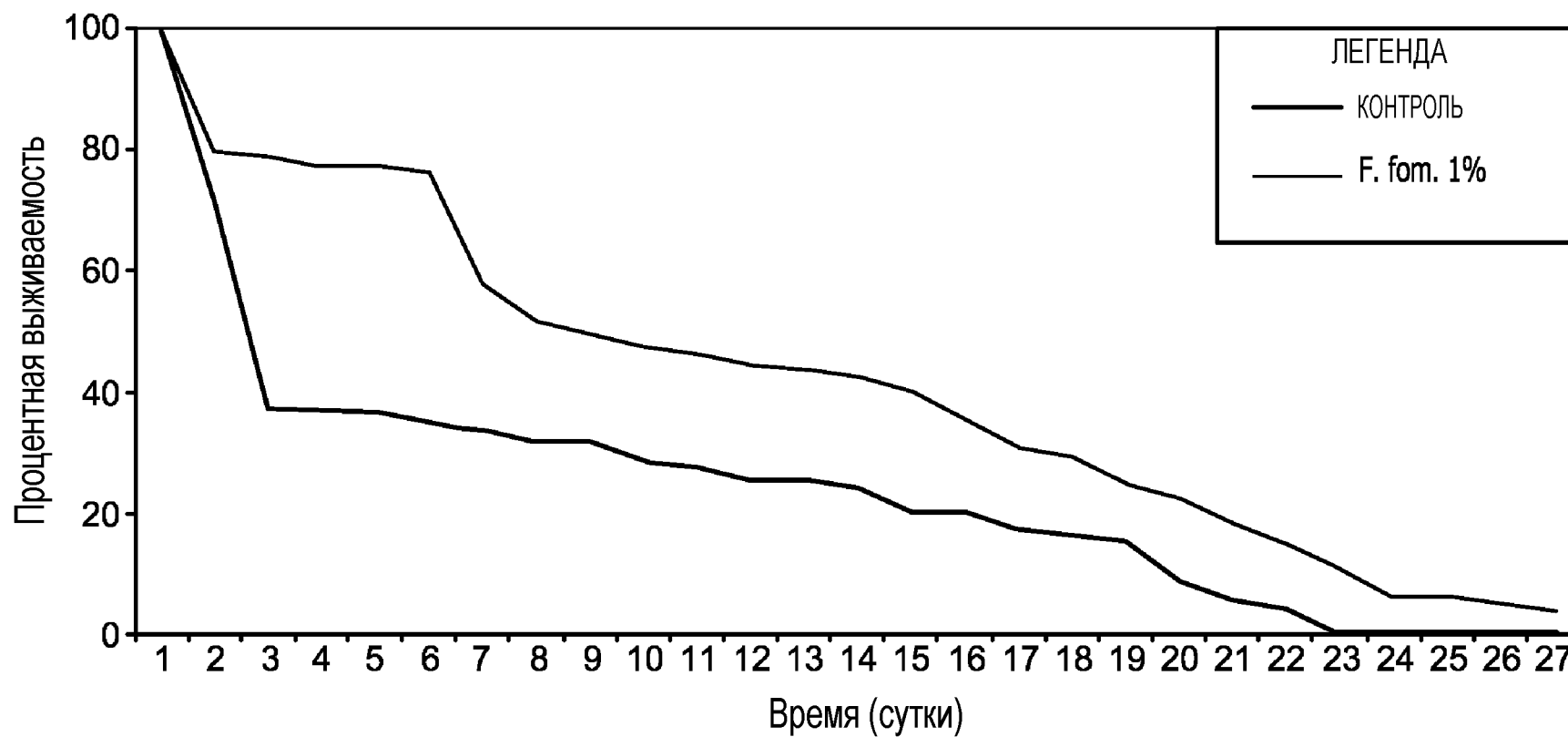
ФИГ.1



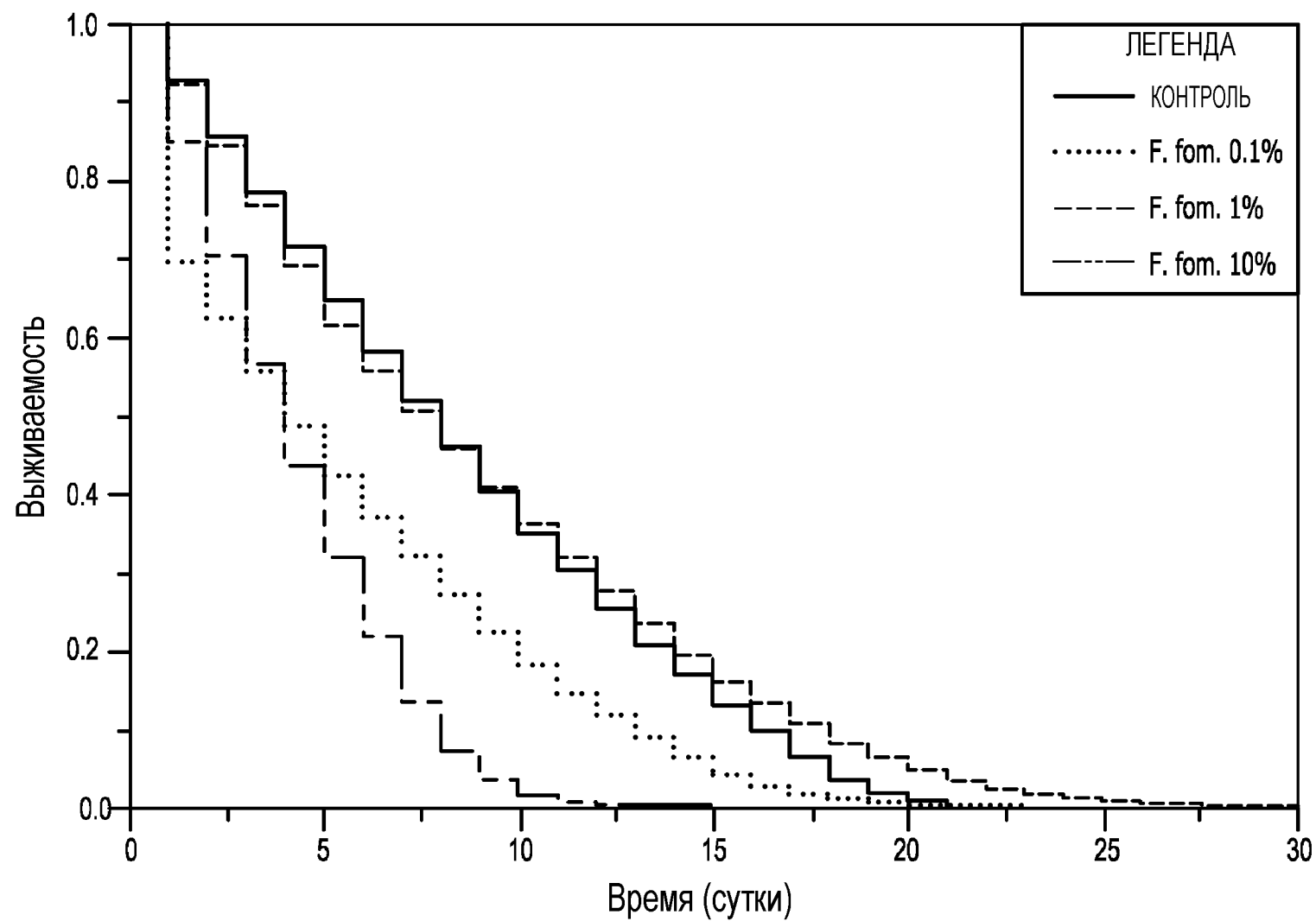
ФИГ.2



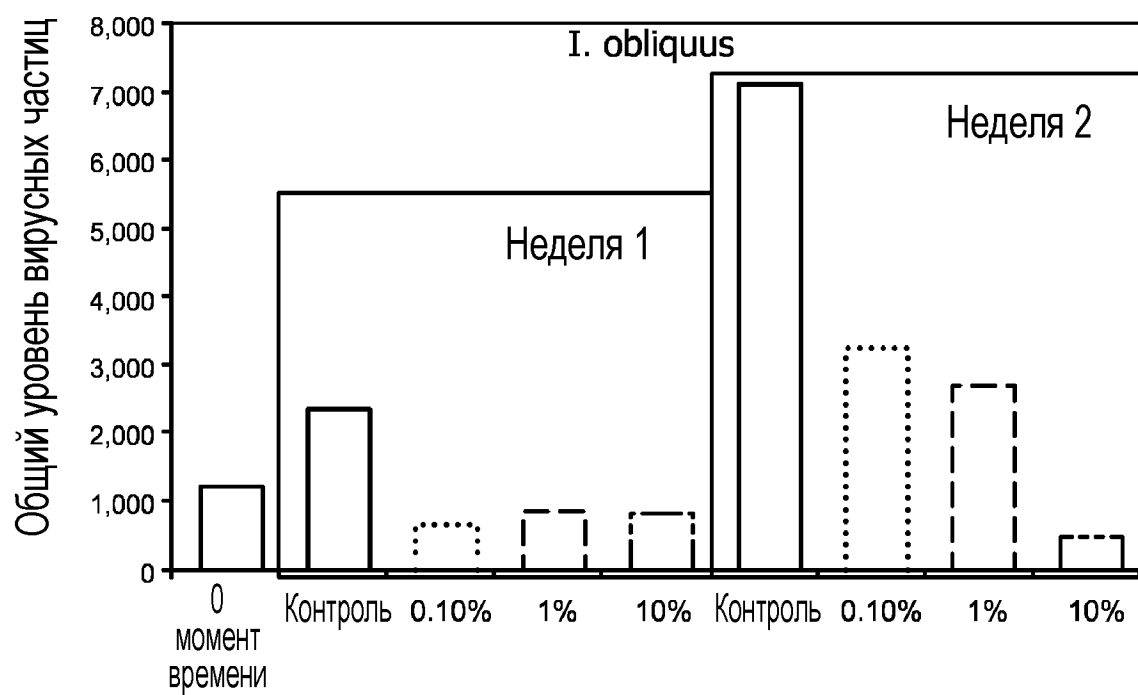
ФИГ.3



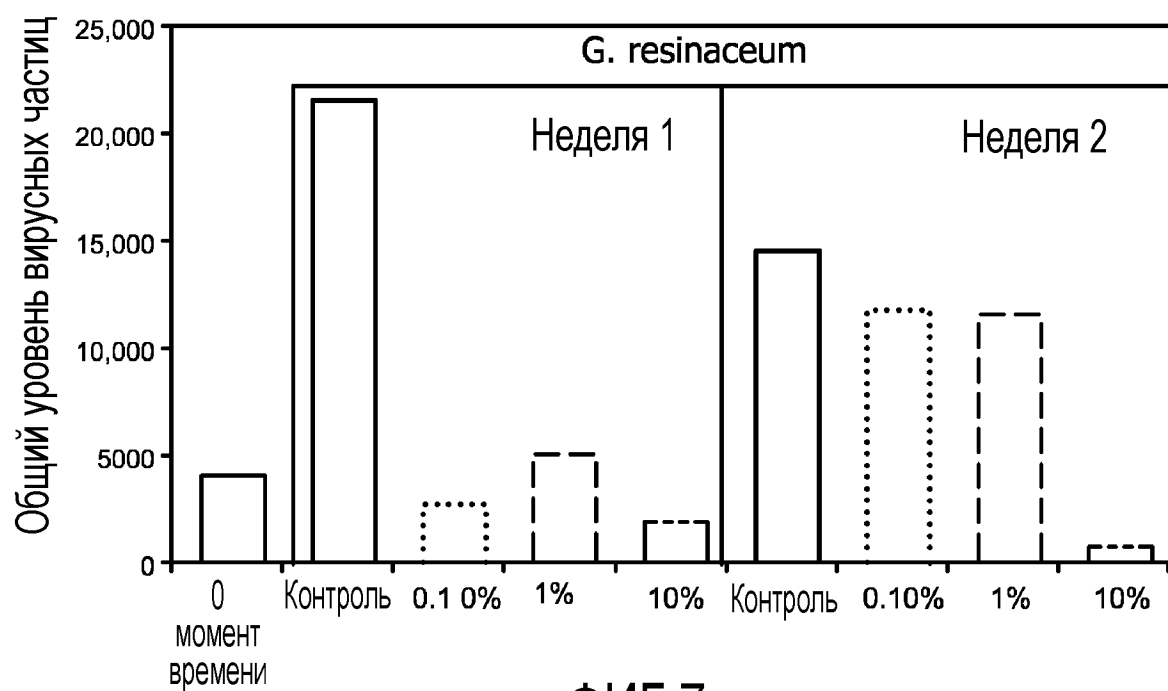
ФИГ.4



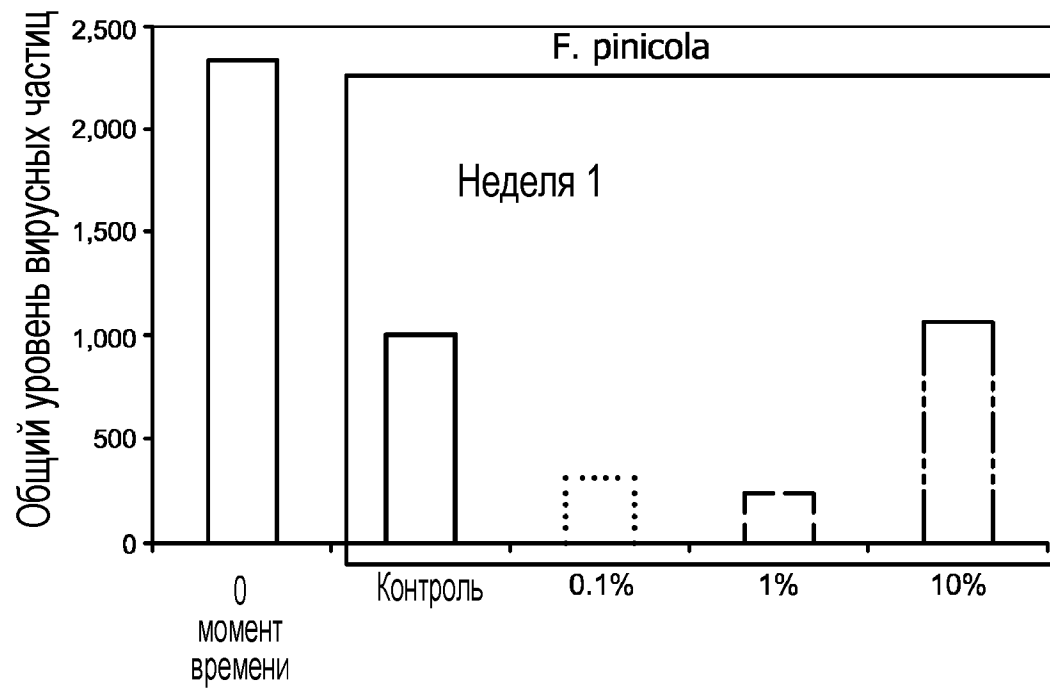
ФИГ.5



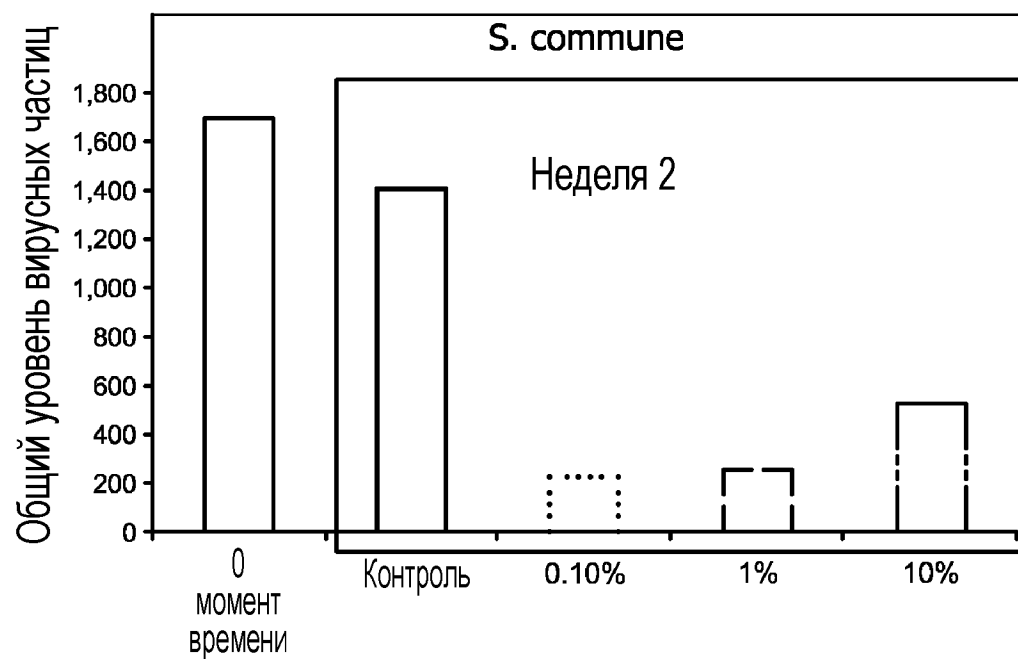
ФИГ.6



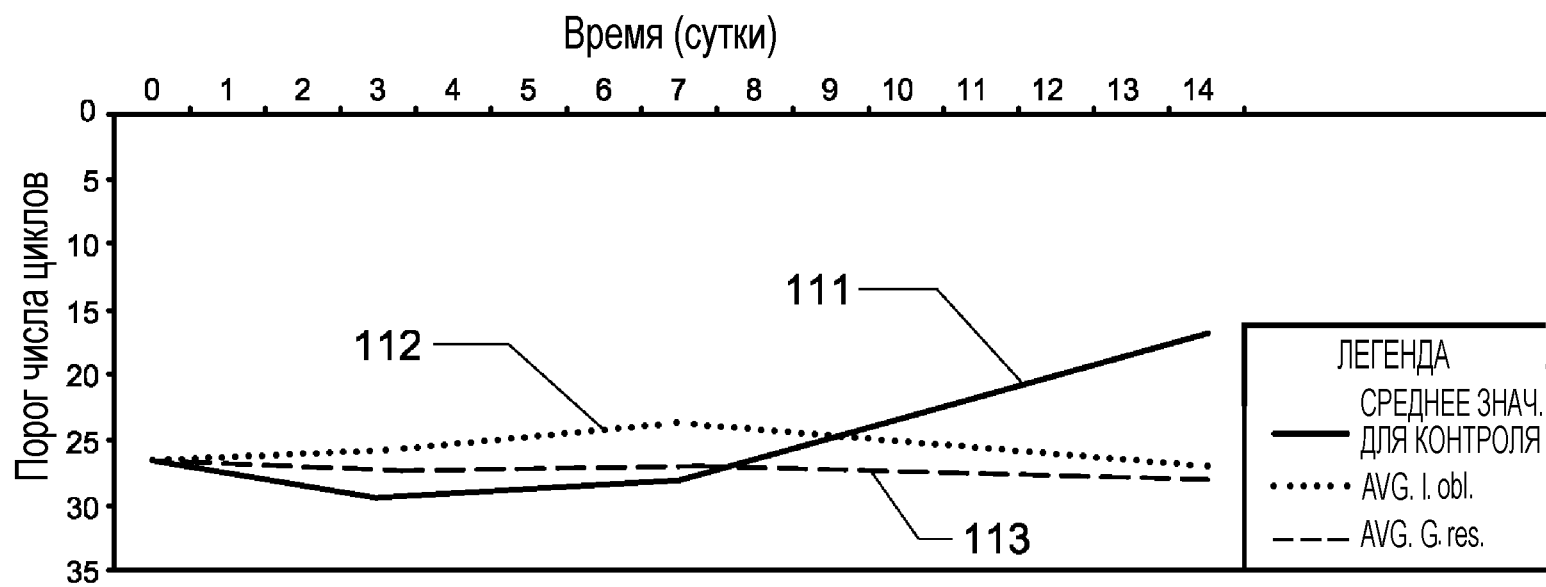
ФИГ.7



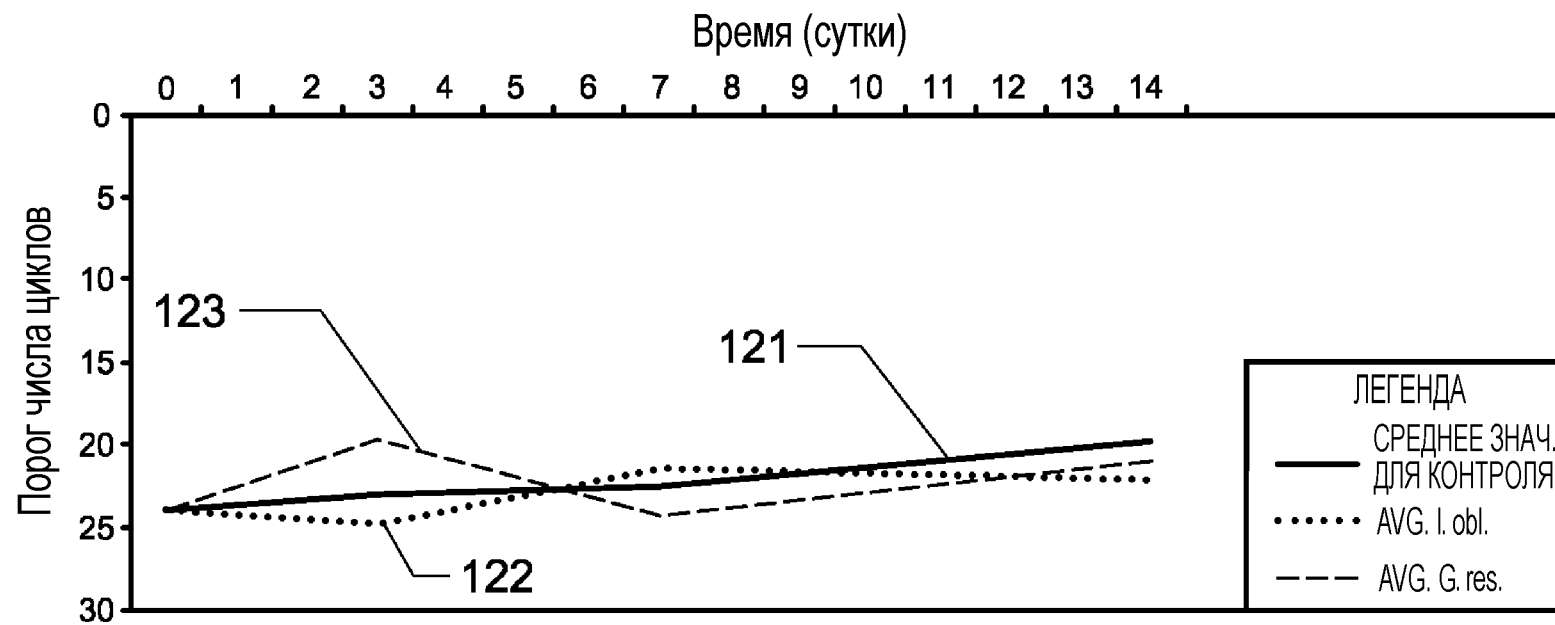
ФИГ.8



ФИГ.9



ФИГ.10



ФИГ.11

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PS-Bees-PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2015/019543	International filing date (<i>day/month/year</i>) 9 March 2015 (09-03-2015)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 10 March 2014 (10-03-2014)
Applicant STAMETS, PAUL EDWARD		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 3
☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/019543

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A23K1/18 A01K51/00
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 A23K A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/018266 A1 (NZ INST PLANT & FOOD RES LTD [NZ]; PINFOLD ERIN JAMES [NZ]; GOODWIN RO) 9 February 2012 (2012-02-09) page 2, paragraph 3 - page 6, paragraph 2; claims 1-34; examples page 27, paragraphs 5.4,5.5 -----	1-30
A	US 6 660 290 B1 (STAMETS PAUL EDWARD [US]) 9 December 2003 (2003-12-09) the whole document -----	1-30
A	WO 2006/121350 A1 (MILLENNIUM MICROBES LTD [NZ]; FORD STEPHEN REYNOLD [NZ]; MUSTAFA QAISE) 16 November 2006 (2006-11-16) the whole document -----	1-30
A	US 6 183 742 B1 (KICZKA WITOLD [US]) 6 February 2001 (2001-02-06) the whole document -----	1-30

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 May 2015

Date of mailing of the international search report

02/06/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Adechy, Miriam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/019543

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012018266	A1	09-02-2012	NONE
US 6660290	B1	09-12-2003	AU 9667901 A 15-04-2002
			US 6660290 B1 09-12-2003
			US 2002146394 A1 10-10-2002
			US 2004161440 A1 19-08-2004
			US 2009047236 A1 19-02-2009
			US 2009047237 A1 19-02-2009
			US 2011200551 A1 18-08-2011
WO 2006121350	A1	16-11-2006	NZ 539935 A 30-04-2008
			WO 2006121350 A1 16-11-2006
US 6183742	B1	06-02-2001	NONE