



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.01

(21) Номер заявки
202090605

(22) Дата подачи заявки
2018.09.24

(51) Int. Cl. *A01N 25/28* (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
A01N 35/06 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)
C12N 1/06 (2006.01)
C12N 11/08 (2006.01)

(54) ПОЛИМЕРНЫЕ ЧАСТИЦЫ, СОДЕРЖАЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

(31) PCT/EP2017/073994

(32) 2017.09.22

(33) EP

(43) 2020.06.26

(86) PCT/EP2018/075760

(87) WO 2019/057958 2019.03.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТЕХНИШЕ УНИВЕРЗИТЕТ ГРАЦ;
БИОТЕНЦ ГЕЗЕЛШАФТ ФЮР
БИОТЕХНОЛОГИ МБХ (АТ)**

(72) Изобретатель:
Берг Габриеле, Мюллер Хенри (АТ)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) MANOHARAN MELVIN JOE ET AL.: "Survival offlocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions", EUROPEAN JOURNAL OF SOIL BIOLOGY, GAUTHIER-VILLARS, MONTROUGE, FR, vol. 50, 7 March 2012 (2012-03-07), pages 198-206, XP028421147, ISSN: 1164-5563, DOI: 10.1016/J.EJSOBI.2012.03.002 [retrieved on 2012-03-15], page 199, right-hand column, section 2.3.1; page 199, section 2.4; page 200, table 4

M.M. JOE ET AL.: "Development of alginate-based aggregate inoculants of Methylobacterium sp. and Azospirillum brasilense tested under in vitro conditions to promote plant growth", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 116, № 2, 22 November 2013 (2013-11-22), pages 408-423, XP055225426, GB, ISSN: 1364-5072,

DOI: 10.1111/jam.12384, Preparation of alginate bead-based inoculant; page 411, left-hand column, survivability and cell release from alginate beads; page 414, left-hand column, page 415; figure 2a, Biofilm formation, co-aggregation and enumeration of bacterial population; page 412, right-hand column, figure 4

WEAN SIN CHEOW ET AL.: "Biofilm-Like Lactobacillus rhamnosus Probiotics Encapsulated in Alginate and Carrageenan Microcapsules Exhibiting Enhanced Thermotolerance and Freeze-Drying Resistance", BIOMACROMOLECULES, vol. 14, № 9, 9 September 2013 (2013-09-09), pages 3214-3222, XP055422567, ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/bm400853d, section 3.1; page 3217, section 2.3; page 3216, right-hand column, paragraph 1st

MICHEAL WHELEHAN ET AL.: "Microencapsulation using vibrating technology", JOURNAL OF MICROENCAPSULATION, vol. 28, № 8, 1 December 2011 (2011-12-01), pages 669-688, XP055057911, ISSN: 0265-2048, DOI: 10.3109/02652048.2011.586068, the whole document

YOAV BASHAN ED, KELLY R.M.: "Alginate Beads as Synthetic Inoculant Carriers for Slow Release of Bacteria That Affect Plant Growth", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 61, № 8, 1 May 1988 (1988-05-01), pages 1089-1098, XP001469463, ISSN: 0099-2240, the whole document

BASHAN Y. ED, ZHAO XINQING ET AL.: "Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 16, № 4, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 729-770, XP004123985, ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/S0734-9750(98)00003-2, the whole document

(57) Изобретение относится к полимерным частицам, содержащим биоразлагаемый полимер и по меньшей мере один микроорганизм в общей концентрации по меньшей мере 10^8 КОЕ/г сухой массы, который является стабильным в течение по меньшей мере 35 недель при 30°C, и необязательно дополнительные носители и добавки, а также к способам получения полимерных частиц и их применению.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам иммобилизации и культивирования, вызывающим метаболические признаки долгосрочной выживаемости, для улучшения жизнеспособности микроорганизмов во время хранения и применения, а также к жизнеспособным и стабильным микробным композициям.

Предпосылки создания изобретения

Применение микроорганизмов для защиты растений, стимулирования роста и удобрения в промышленном масштабе сильно зависит от надежности микробных препаратов. В частности, когда микробные агенты предназначены для применения в качестве добавки в покрытиях для процессов обработки семян, требования к составлению являются высокими. Помимо вызванного десикацией общего стресса в сухих составах, микроорганизмы дополнительно подвергаются физическому (например, сдвиговые силы), термическому воздействию, а также воздействию вредных химических веществ (например, пестицидные агенты). За исключением некоторых спорообразующих бактерий большинство микроорганизмов не способны справиться с этими стрессовыми моментами и теряют жизнеспособность. Для решения проблем, связанных со стабильностью микробных штаммов, в настоящее время коммерциализируются в основном грамположительные бактерии со спорообразующей способностью. Несмотря на это чувствительные грамотрицательные бактерии обладают более высоким потенциалом в отношении биологической защиты и фертилизации растений.

В работе Bashan et al. (Appl Environ Microbiol., 51(5), 1986) описан способ инокуляции несимбиотических ризосферных бактерий в биоразлагаемых полимерных веществах. *Azospirillum brasilense* Cd выращивали в питательном бульоне до конечной концентрации 10^9 КОЕ/мл. Затем бактериальные клетки заключали в альгинатные шарики. После промывки шарики снова инкубировали для размножения бактерий внутри шариков. После промывки шарики либо хранили при 4°C в герметически закрытых колбах во влажных условиях, либо в виде лиофилизированных шариков.

Альгинат считается наиболее распространенным биоматериалом для инкапсуляции бактериальных и/или других типов клеток. В присутствии многовалентных ионов альгинат образует трехмерные структурированные гидрогели, в которые встроены бактериальные клетки (John R.P. et al., Crit. Rev. Biotechnol., 2011 Sep, 31(3):211-26). Несмотря на содействие в некоторой степени выживаемости микробных клеток за счет высокого показателя влажности насыщенные альгинатные гидрогели являются неподходящими и нецелесообразными для применения в качестве коммерческих продуктов. Однако в высушенных альгинатных агрегатах с низким содержанием влаги жизнеспособность большинства микроорганизмов серьезно нарушается.

Обычно микробные клетки получают с помощью процессов погруженной ферментации с использованием жидких сред. В дисперсной форме клетки растут планктонно и обладают метаболизмом, который способствует скорости размножения и наращивания биомассы, но снижает выносливость и нарушает устойчивость к стрессу. Несмотря на применение защитных добавок для компенсации недостающей устойчивости к внешним воздействиям показатели выживаемости являются неудовлетворительными.

Несмотря на большое внимание, уделяемое стабилизации микроорганизмов в составах, подходящих для крупномасштабных применений, включая процессы обработки семян, подходящего решения в настоящее время не существует (Vemmer & Patel, 2013).

Краткое описание изобретения

Целью настоящего изобретения является обеспечение улучшенного способа культивирования на основе иммобилизации и составления для индукции метаболических признаков долгосрочной выживаемости для улучшения жизнеспособности микроорганизмов во время хранения и применения.

Задача решается с помощью объекта по настоящему изобретению.

В соответствии с изобретением предлагаются полимерные частицы, содержащие полимер, по меньшей мере один микроорганизм в общей концентрации по меньшей мере 10^9 КОЕ/г сухой массы, необязательно дополнительные носители и добавки, причем указанные полимерные частицы представляют собой сухие частицы.

В соответствии со следующим вариантом осуществления изобретения предлагаются полимерные частицы, содержащие полимер, по меньшей мере один микроорганизм в общей концентрации по меньшей мере 10^9 КОЕ/г сухой массы, необязательно дополнительные носители и добавки, причем указанный по меньшей мере один микроорганизм содержится в виде самоорганизующегося многоклеточного агрегата.

В соответствии со следующим вариантом осуществления изобретения предлагаются полимерные частицы, содержащие полимер, по меньшей мере один микроорганизм в общей концентрации по меньшей мере 10^8 КОЕ/г сухой массы, необязательно дополнительные носители и добавки, причем указанные частицы имеют средний диаметр около 500 мкм или менее. В некоторых вариантах осуществления частицы имеют средний диаметр около 200 мкм или менее. В некоторых вариантах осуществления частицы имеют средний диаметр около 100 мкм или менее. В некоторых вариантах частицы имеют средний диаметр около 75 мкм или менее. В некоторых вариантах частицы имеют средний диаметр около 50 мкм или менее. В некоторых вариантах частицы имеют средний диаметр около 25 мкм или менее. В некоторых

вариантах частицы имеют средний диаметр около 10 мкм или менее. В некоторых вариантах частицы имеют средний диаметр около 5 мкм или менее. В некоторых вариантах частицы имеют средний диаметр около 1 мкм.

В частности, микроорганизмы, описанные в настоящем документе, представляют собой клетки бактерий и/или грибов.

В частности, клетки микроорганизмов являются инкапсулированными в полимере. В некоторых вариантах осуществления клетки инкапсулированных микроорганизмов содержат клетки бактерий, относящихся к одному или нескольким типам, выбранным из группы, состоящей из *Firmicutes* и *Proteobacteria*. В некоторых вариантах осуществления клетки инкапсулированных микроорганизмов содержат клетки бактерий, относящихся к одному или нескольким классам, выбранным из группы, состоящей из *Betaproteobacteria*, *Bacilli*, *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*. В некоторых вариантах осуществления клетки инкапсулированных микроорганизмов содержат клетки бактерий, относящихся к одному или нескольким отрядам, выбранным из группы, состоящей из

Aeromonadales, *Bacillales*, *Bifidobacteriales*,

Burkholderiales, *Enterobacterales*, *Lactobacillales*, *Neisseriales*,

Oceanospirillales, *Pseudomonadales*, *Rhizseslesomilla*, *Rhizeslesomilla*, *Rhizeslesomilla*,

Rhizeslesomilla, *Rhizeslesomles*, *Rhizeslesomles*, *Rhizeslesomilla*, *Rhizeslesomilla*,

Rhizeslesomilla, *Rhizeslesomles*, *Rhizeslesomles*, *Rhizeslesomles*, *Rhizeslesomles*) и

Xanthomonadales.

В некоторых вариантах осуществления клетки инкапсулированных микроорганизмов содержат клетки бактерий, относящихся к одному или нескольким семействам, выбранным из группы, состоящей из

Aspergillaceae, *Bacillaceae*,

Bifidobacteriaceae, *Bradyrhizobiaceae*, *Burkholderiaceae*, *Chromobacteriaceae*, *Clavicipitaceae*,

Cordycipitaceae, *Coniothyriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Hypocreaceae*,

Lactobacillaceae, *Leuconostocaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Oceanospirillaceae*,

Oxalobacteraceae, *Paenibacillaceae*, *Pasteuriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhizobiaceae*,

Rhodospirillaceae, *Sphingomonadaceae*, *Sclerotiniaceae*, *Streptococcaceae*, *Streptomycetaceae*,

Xanthomona daceae и *Yersiniaceae*.

В некоторых вариантах осуществления клетки инкапсулированных микроорганизмов содержат клетки бактерий, относящихся к одному или нескольким родам, выбранным из группы, состоящей из *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Ensifer*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Lyso bacter*, *Methylobacterium*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Sphingomonas* и *Stenotrophomonas*.

В некоторых вариантах осуществления клетки инкапсулированных микроорганизмов содержат клетки грибов типа *Ascomycota*. В некоторых вариантах осуществления клетки инкапсулированных микроорганизмов содержат клетки грибов, относящихся к одному или нескольким классам, выбранным из группы, состоящей из *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes* и *Sordariomycetes*. В некоторых вариантах осуществления клетки инкапсулированных микроорганизмов содержат клетки грибов, относящихся к одному или нескольким отрядам, выбранным из группы, состоящей из *Eurotiales*, *Helotiales*, *Hypocreales* и *Pleosporales*. В некоторых вариантах осуществления клетки инкапсулированных микроорганизмов содержат клетки грибов, относящихся к одному или нескольким семействам, выбранным из группы, состоящей из *Aspergillaceae*, *Clavicipitaceae*, *Clavicipitaceae*, *Coniothyriaceae*, *Cordycipitaceae*, *Hypocreaceae* и *Sclerotiniaceae*. В некоторых вариантах осуществления клетки инкапсулированных микроорганизмов содержат клетки грибов, относящихся к родам, выбранным из группы, состоящей из *Beauveria*, *Coniothyrium*, *Gliocladium*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pochonia*, *Sclerotinia*, *Trichoderma* и *Verticillium*.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к полимерным частицам, в которых по меньшей мере две клетки микроорганизмов имеют различное происхождение, в частности, относятся к различным штаммам или видам, или родам, или царству.

В частности, микроорганизмы различного происхождения представляют собой либо различные виды бактерий, либо различные виды грибов, либо их комбинацию. Следующий вариант осуществления изобретения относится к полимерным частицам, как описано в настоящем документе, в которых микроорганизмы, в частности клетки бактерий и/или грибов, содержатся в виде многоклеточных агрегатов. В частности, микроорганизмы, клетки бактерий и/или грибов содержатся в виде многоклеточных агрегатов, тем самым внедренных в самопродуцируемый внеклеточный биогенный матрикс внутри полимерной частицы. Эта многоклеточная модель поддерживает стратегии выживания, которые сочетают в себе продуцирование защитных молекул и механизмов, а также индукцию системы генетического контроля,

которая переводит микроорганизмы в состояние, подобное покою.

В соответствии со следующим вариантом осуществления изобретения полимер представляет собой биоразлагаемый полимер. Следующий вариант осуществления изобретения относится к полимерным частицам, как описано в настоящем документе, где биоразлагаемый полимер выбран из группы, состоящей из альгината, агарозы, агара, желатина, полиакриламида, хитозана и поливинилового спирта.

В некоторых вариантах осуществления биоразлагаемый полимер представляет собой альгинат. В некоторых вариантах осуществления биоразлагаемый полимер представляет собой альгинат натрия.

Следующий вариант осуществления изобретения относится к полимерным частицам, как описано в настоящем документе, при этом частицы имеют средний диаметр около 1-2000 мкм, или около 25-1000 мкм, или около 50-500 мкм, или около 100-250 мкм. В некоторых вариантах осуществления частицы имеют средний диаметр около 1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 мкм или около 500 мкм.

Следующий вариант осуществления изобретения относится к полимерным частицам, как описано в настоящем документе, при этом жизнеспособность микроорганизмов в основном поддерживается на протяжении периода хранения, который составляет по меньшей мере 35 недель при 30°C и по меньшей мере 52 недели при 4°C.

Следующий вариант осуществления изобретения относится к полимерным частицам, как описано в настоящем документе, при этом по меньшей мере 5, 10, 25, 50, 60, 70, 80, 90 или 95% клеток микроорганизмов являются жизнеспособными после периода хранения, составляющего 35 недель при 30°C.

Один из вариантов осуществления изобретения относится к способу улучшения жизнеспособности микроорганизмов во время хранения и применения, включающему следующие стадии:

- a) суспендирование одной или нескольких прекультур клеток микроорганизмов в полимерном растворе;
- b) иммобилизация указанных клеток микроорганизмов путем капельного добавления раствора, полученного на стадии a), в раствор многовалентных ионов с получением полимерных частиц;
- c) культивирование инкапсулированных микроорганизмов в указанных частицах в течение по меньшей мере 12 ч в жидкой среде до тех пор, пока не будет достигнуто увеличение плотности клеток по меньшей мере на 2-10 log.

Один вариант осуществления изобретения относится к способу улучшения жизнеспособности микроорганизмов во время хранения и применения, включающему следующие стадии:

- a) суспендирование одной или нескольких прекультур клеток микроорганизмов до клеточной плотности, составляющей около 10^0 - 10^8 КОЕ/мл в растворе полимерного вещества;
- b) иммобилизация указанных клеток микроорганизмов путем капельного добавления раствора, полученного на стадии a), в раствор многовалентных ионов с получением таким образом полимерных частиц;
- c) культивирование инкапсулированных микроорганизмов в указанных частицах в течение по меньшей мере 12 ч в жидкой среде для культивирования до тех пор, пока не будет достигнута плотность клеток по меньшей мере около 10^9 КОЕ/г сухой массы.

В одном варианте осуществления изобретения каждый микроорганизм предварительно культивировали индивидуально до плотности клеток около 10^9 - 10^{10} КОЕ/мл. В зависимости от микроорганизма прекультуру суспендировали в растворе полимерного вещества способом, описанным в настоящем документе, до плотности клеток около 10^0 - 10^8 КОЕ/мл. В частности, плотность клеток в суспензии прекультуры и раствора полимерного вещества составляет около 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 или 10^8 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность клеток в суспензии прекультуры и раствора полимерного вещества составляет около 10^0 - 10^1 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность клеток в суспензии прекультуры и раствора полимерного вещества составляет около 10^1 - 10^2 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность клеток в суспензии прекультуры и раствора полимерного вещества составляет около 10^2 - 10^3 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность клеток в суспензии прекультуры и раствора полимерного вещества составляет около 10^3 - 10^4 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность клеток в суспензии прекультуры и раствора полимерного вещества составляет около 10^4 - 10^5 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность клеток в суспензии прекультуры и раствора полимерного вещества составляет около 10^5 - 10^6 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность клеток в суспензии прекультуры и раствора полимерного вещества составляет около 10^6 - 10^7 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность клеток в суспензии прекультуры и раствора полимерного вещества составляет около 10^7 - 10^8 КОЕ/мл.

В частности, предварительно культивированный микроорганизм используют без дальнейшей очистки. В частности, для использования на стадии a) культуральную среду, содержащую предварительно культивированный микроорганизм, разбавляют путем суспендирования в растворе полимерного вещества до плотности клеток около 10^0 - 10^8 КОЕ/мл.

Следующий вариант осуществления изобретения относится к способу, как описано в настоящем документе, где биоразлагаемое полимерное вещество выбрано из группы, состоящей из альгината, агарозы, агара, желатина, полиакриламида, хитозана и поливинилового спирта. В некоторых вариантах осуще-

ствления полимерное вещество представляет собой альгинат. В некоторых вариантах полимерное вещество представляет собой альгинат натрия.

Следующий вариант осуществления изобретения относится к способу, как описано в настоящем документе, где раствор полимерного вещества отверждается путем ионотропного гелеобразования.

В частности, раствор полимерного вещества превращается в гель после добавления раствора многовалентных ионов.

В одном варианте осуществления изобретения раствор многовалентных ионов представляет собой раствор CaCl_2 .

В одном варианте осуществления изобретения по меньшей мере один из микроорганизмов представляет собой клетки бактерий и/или грибов.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из микроорганизмов представляет собой клетки бактерий, выбранных из группы, состоящей из *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Methylobacterium*, *Serratia*, *Lysobacter*, *Firmicutes*, *Azotobacter*, *Sphingomonas* и *Pseudomonas*, и клетки грибов представляют собой клетки *Trichoderma*.

Следующий вариант осуществления изобретения относится к способу, как описано в настоящем документе, где применяют по меньшей мере два микроорганизма различного происхождения. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения могут быть использованы бактериальные клетки двух, трех, четырех, пяти, шести или более различных видов.

В альтернативном варианте осуществления изобретения могут быть использованы клетки грибов двух, трех, четырех, пяти, шести или более различных видов.

Альтернативно клетки бактерий одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или более различных видов могут быть использованы вместе с клетками грибов одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или более различных видов. Таким образом, один, два, три, четыре, пять или более различных индивидуальных организмов или различных представителей различного генетического происхождения или таксонов являются инкапсулированными в полимерную частицу.

Следующий вариант осуществления изобретения относится к способу, как описано в настоящем документе, где инкапсулированные микроорганизмы культивируют в системе, подобной биореактору с взвешенной твердой фазой. В частности, инкапсулированные микроорганизмы культивируют в шариках до тех пор, пока не будет достигнута плотность клеток около 10^9 - 10^{12} КОЕ/г сухой массы. В соответствии со следующим вариантом осуществления изобретения инкапсулированные микроорганизмы культивируют в шариках до тех пор, пока не будет достигнута плотность клеток около 10^{10} , 10^{11} или 10^{12} КОЕ/г сухой массы.

Следующий вариант осуществления изобретения относится к способу, как описано в настоящем документе, где инкапсулированные микроорганизмы культивируют при температурах 20-30°C в течение по меньшей мере 24-72 ч. В некоторых вариантах осуществления инкапсулированные микроорганизмы культивируют при температурах 21-24°C. В некоторых вариантах осуществления инкапсулированные микроорганизмы культивируют в течение по меньшей мере 36 ч. В некоторых вариантах осуществления инкапсулированные микроорганизмы культивируют в течение по меньшей мере 48 ч. В некоторых вариантах осуществления инкапсулированные микроорганизмы культивируют в течение примерно 36-48 ч. В некоторых вариантах осуществления инкапсулированные микроорганизмы культивируют в течение примерно 48-72 ч.

В одном варианте осуществления изобретения культивирование в шариках осуществляют с полимерными частицами, при этом в указанные частицы инкапсулированы клетки микробов, имеющих одно, два, три, четыре, пять, шесть или более различных генетических корней. Культивирование в шариках может быть осуществлено с помощью полимерных частиц, содержащих инкапсулированные клетки микробов, которые имеют общее генетическое происхождение, например один или несколько клонов единичного микроба, или с помощью полимерных частиц, содержащих инкапсулированные клетки микробов, которые имеют дивергентный генетический источник или таксономические взаимоотношения. В качестве неограничивающего примера полимерная частица может содержать одну или несколько колоний бактериальных клеток, имеющих общее генетическое происхождение, полимерная частица может содержать одну или несколько колоний клеток бактерий или грибов, имеющих дивергентное генетическое происхождение (например, один или несколько различных видов, родов, классов, семейств, отрядов или типов).

Следующий вариант осуществления изобретения относится к способу, как описано в настоящем документе, в котором инкапсулированные микроорганизмы в полимерных частицах находятся в сильном состоянии и образуют плотные многоклеточные агрегаты за счет стадии культивирования. В частности, микроорганизмы в полимерных частицах встроены в самопродуцируемый внеклеточный матрикс.

Полимерные частицы могут быть высушены при температуре окружающей среды, предпочтительно высушены на воздухе. Например, полимерные частицы сушат в статическом слое или барабанной сушилке при температуре около 20-35°C, предпочтительно при температуре около 25-30°C. Среднее время сушки составляет около 18-36 ч, предпочтительно около 24-30 ч. Таким образом, следующий вариант

осуществления изобретения относится к способу, как описано в настоящем документе, в котором полимерные частицы сушат, предпочтительно сушат на воздухе.

Сухие полимерные частицы имеют содержание влаги, которое составляет 15,0% по массе или менее в расчете на общую массу указанных полимерных частиц. В соответствии со следующим вариантом осуществления изобретения сухие полимерные частицы имеют содержание влаги, которое составляет 20,0% по массе или менее или 10,0% по массе или менее в расчете на общую массу указанных полимерных частиц.

Полимерные частицы являются полезными для применений в области сельского хозяйства, пищевой и/или кормовой промышленности, косметической промышленности и/или фармацевтической промышленности.

Следующий вариант осуществления изобретения относится к применению полимерных частиц, как описано в настоящем документе, для целевой доставки в сельском хозяйстве, защиты растений, стимулирования роста и/или фертилизации, биологической очистки почвы и/или воды, в качестве пищевых добавок, кормовых добавок или в медицинских целях.

В частности, полимерные частицы можно применять в сельскохозяйственной промышленности, например, для производства биологических агентов для защиты здоровья растений, стимуляции роста растений, биофертилизации и защиты от абиотического стресса.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения предлагается применение полимерной частицы в качестве лекарственного средства для лечения состояния, которое можно лечить с помощью инкапсулированных микробных клеток.

Краткое описание фигур

На фиг. 1A показана жизнеспособность клеток *Stenotrophomonas rhizophila*, составленных с помощью способа инкапсуляции в соответствии с Bashan et al., 1986 (круг) и по технологии консервации бактерий и грибов (BFC) (квадрат) при 30°C в течение периода, составляющего 36 недель.

На фиг. 1B - жизнеспособность клеток *Rab 1 Methylobacterium extorquens* (бактерия, улучшающая вкус для клубники), составленных с помощью способа инкапсуляции в соответствии с Bashan et al., 1986 (круг) и по технологии консервации бактерий и грибов (BFC) (квадрат) по изобретению; условия хранения: 16 недель при 30°C.

На фиг. 1C - жизнеспособность *Trichoderma* sp. (гриб, способствующий росту растений) инкапсулированных общепринятым способом конидий (круг) и по технологии консервации бактерий и грибов (BFC) (квадрат) по изобретению; условия хранения: 4 недели при 30°C.

На фиг. 2 показано развитие количества жизнеспособных клеток на разных стадиях истории продукта начиная от высушенного продукта и до одного года после обработки семян. Число клеток указано в виде КОЕ на семя.

На фиг. 3 показана жизнеспособность клеток *Stenotrophomonas rhizophila*, составленных путем инкапсуляции планктонно растущих клеток ("инкапсуляция общепринятым способом") (круг) и по технологии BFC по изобретению (квадрат) при 30°C в течение 36 недель. Для каждой методики инкапсуляции шарики имели диаметр приблизительно 200 мкм после сушки и 480-600 мкм во влажном состоянии (до сушки).

На фиг. 4 - жизнеспособность клеток *Rab1 Methylobacterium extorquens*, составленных путем инкапсуляции планктонно растущих клеток ("инкапсуляция общепринятым способом") (круг) и по технологии BFC по настоящему изобретению (квадрат) при 30°C в течение периода, составляющего 16 недель. Для каждого метода инкапсуляции шарики имели диаметр приблизительно 200 мкм после сушки и между 480-600 мкм во влажном состоянии (до сушки).

На фиг. 5 - жизнеспособность клеток *DSM 5851 Rhizobium fredii*, составленных путем инкапсуляции планктонно растущих клеток ("инкапсуляция общепринятым способом") (круг) и по технологии BFC по изобретению (квадрат) при 30°C в течение 30 недель. Для каждой методики инкапсуляции шарики имели диаметр приблизительно 200 мкм после сушки и между 480-600 мкм во влажном состоянии (до сушки).

На фиг. 6 - жизнеспособность клеток *Enterobacter cowanii*, составленных путем инкапсуляции планктонно растущих клеток ("инкапсуляция общепринятым способом") (круг) и по технологии BFC по изобретению при 30°C в течение 40 дней. Для каждой методики инкапсуляции шарики имели диаметр приблизительно 200 мкм после сушки и между 480-600 мкм во влажном состоянии (до сушки).

На фиг. 7 - жизнеспособность клеток *Sphingomonas sanguinis*, составленных путем инкапсуляции планктонно растущих клеток ("инкапсуляция общепринятым способом") (круг) и по технологии BFC по изобретению при 30°C в течение периода времени, составляющего 68 дней. Для каждой методики инкапсуляции шарики имели диаметр приблизительно 200 мкм после сушки и между 480-600 мкм во влажном состоянии (до сушки).

На фиг. 8A - жизнеспособность первых видов *Pseudomonas* ("штамм А") при составлении по технологии BFC с использованием различных плотностей инокуляции прекультур (10^5 , 10^6 , 10^7 КОЕ/мл) после сушки, после краткосрочного хранения при 30°C и после длительного хранения при 30°C.

На фиг. 8B - жизнеспособность вторых видов *Pseudomonas* ("штамм В") при составлении по техно-

логии BFC с использованием различных плотностей инокуляции прекультур (10^5 , 10^6 , 10^7 КОЕ/мл) после сушки, после краткосрочного хранения при 30°C и после длительного хранения при 30°C .

На фиг. 9 - жизнеспособность видов *Serratia* при составлении по технологии BFC с использованием различных плотностей инокуляции прекультур (10^5 , 10^6 , 10^7 КОЕ/мл) после сушки, после краткосрочного хранения при 30°C и после длительного хранения при 30°C .

На фиг. 10 - жизнеспособность SPA-P69 *Stenotrophomonas rhizophila* после сушки, после краткосрочного хранения при 30°C и после длительного хранения при 30°C при составлении по технологии BFC с использованием разных температур культивирования (30 и 23°C).

На фиг. 11 - жизнеспособность DSM 5851 *Rhizobium fredii* после сушки, после краткосрочного хранения при 30°C и после длительного хранения при 30°C при составлении по технологии BFC с использованием различных температур культивирования (30 и 23°C).

На фиг. 12А - жизнеспособность первых видов *Pseudomonas* ("штамм А") после сушки, после краткосрочного хранения при 30°C и после длительного хранения при 30°C при составлении по технологии BFC с использованием различных сред для культивирования (LB=бульон Лурии-Бертани, TSB=триптический соевый бульон, CD=бульон Чапека-Докса).

На фиг. 12В - жизнеспособность вторых видов *Pseudomonas* ("штамм В") после сушки, после краткосрочного хранения при 30°C и после длительного хранения при 30°C при составлении по технологии BFC с использованием различных сред для культивирования (LB=бульон Лурии-Бертани, TSB=триптический соевый бульон).

На фиг. 13 - жизнеспособность видов *Serratia* после сушки, после краткосрочного хранения при 30°C и после длительного хранения при 30°C при составлении по технологии BFC с использованием различных питательных сред (LB=бульон Лурия-Бертани, TSB=триптический соевый бульон).

На фиг. 14 жизнеспособность SPA-P69 *Stenotrophomonas rhizophila* при составлении по технологии BFC с использованием различного времени культивирования, равного 0, 12, 24, 36 и 48 ч, анализировали сразу после стадии культивирования (t_c), после стадии сушки (t_0), после хранения в течение 14 дней при 30°C и после хранения в течение 42 дней при 30°C . Инкапсулированные SPA-P69 *S. rhizophila*, которые получали без использования стадии вторичного культивирования, не обнаруживались (n.d.) после стадии сушки и через 14 или 42 дня. Аналогично инкапсулированные SPA-P69 *S. rhizophila*, которые получали с использованием стадии вторичного культивирования в течение 12 ч, не обнаруживались (n.d.) после стадии сушки или через 14 или 42 дня. Инкапсулированные SPA-P69 *S. rhizophila*, которые получали с использованием стадии вторичного культивирования в течение 24 ч, показали снижение на $3,57 \log$ КОЕ/г сухой биомассы через 42 дня хранения при 30°C по сравнению со значением КОЕ/г сухой биомассы, зарегистрированным сразу же после культивирования. Инкапсулированные SPA-P69 *S. rhizophila*, которые получали с использованием стадии вторичного культивирования в течение 36 ч, показали снижение на $1,61 \log$ КОЕ/г сухой биомассы через 42 дня хранения при 30°C по сравнению со значением КОЕ/г сухой биомассы, зарегистрированным сразу же после культивирования. Инкапсулированные SPA-P69 *S. rhizophila*, которые получали с использованием стадии вторичного культивирования в течение 48 ч, вызвали снижение на $0,65 \log$ КОЕ/г сухой биомассы после 42 дней хранения при 30°C по сравнению со значением КОЕ/г сухой биомассы, зарегистрированным сразу же после культивирования.

На фиг. 15 показана морфология инкапсулированных по BFC SPA-P69 *Stenotrophomonas rhizophila* перед любой стадией вторичного культивирования (время 0 ч) и после 12 ч вторичного культивирования, 24 ч вторичного культивирования, 36 ч вторичного культивирования и 48 ч вторичного культивирования. Морфология колонии становится более отличающейся (хорошо отделенной от других колоний) и темной с увеличением времени вторичного культивирования. Все изображенные шарики были получены с использованием концентрации альгината 1,5%, концентрации CaCl_2 150 мМ, диаметра насадки 100 мкм, плотности инокуляции прекультуры 10^6 КОЕ/мл, штамм выращивали в $0,5\times$ питательном бульоне II (SIFIN, Germany) и культивировали при 22°C .

На фиг. 16 - жизнеспособность SPA-P69 *Stenotrophomonas rhizophila* при составлении по технологии BFC с использованием различных плотностей инокуляции прекультуры в шариках (10^5 , 10^6 , 10^7 КОЕ/мл) после инкапсуляции, но перед вторичным культивированием (t_c), сразу же после стадии вторичного культивирования (t_c) в течение 48 ч, после стадии сушки (t_0), после 14 дней хранения при 30°C (t_{14}) и после 42 дней хранения при 30°C (t_{42}). Более низкие плотности инокуляции привели к меньшим $\log$ -потерям КОЕ/г сухой массы после хранения по сравнению со значением КОЕ/г сухой массы, обнаруженным сразу же после стадии культивирования. Все отобранные шарики получали с использованием концентрации альгината 1,5%, концентрации CaCl_2 150 мМ, диаметра насадки 100 мкм, плотности инокуляции прекультуры 10^6 КОЕ/мл, штамм выращивали в $0,5\times$ питательном бульоне II (SIFIN, Germany) и культивировали при 22°C . Все отобранные шарики, кроме тех, которые были помечены как " t_c ", прошли 48-часовую стадию культивирования в шариках.

На фиг. 17 морфологию инкапсулированных по технологии BFC SPA-P69 *Stenotrophomonas rhizophila*, полученных с использованием различных плотностей инокуляции прекультур (10^5 , 10^6 , 10^7 КОЕ/мл), оценивали после 48 ч культивирования в шариках. Более низкие плотности инокуляции прекультур показали

четкие (хорошо отделенные от других колоний) и плотные колонии. Все изображенные шарики были получены с использованием концентрации альгината 1,5%, концентрации CaCl_2 150 мМ, диаметра насадки 100 мкм, штамм выращивали в 0,5× питательном бульоне II (SIFIN, Germany) и культивировали при 22°C в шариках в течение 48 ч.

Описание вариантов осуществления

Применение микроорганизмов для любой цели в промышленном масштабе сильно зависит от надежности микробного препарата. В частности, когда микробные агенты предназначены для применения в качестве добавки, например, в покрытиях для процессов обработки семян, требования к составу являются высокими. Помимо вызванного десикацией общего стресса в сухих составах, микроорганизмы дополнительно подвергаются воздействию физических, термических, а также вредных химических веществ, например, пестицидных агентов. Для решения указанных проблем, связанных со стабильностью микробных штаммов, в настоящее время используются в основном грамположительные бактерии со спорообразующей способностью.

Обычно микробные агенты получают путем культивирования микробных клеток в жидкой среде до определенного количества клеток, сбора, смешивания с подходящими носителями и сушки. Также широко применяется инкапсуляция клеток в биополимерах (например, альгинат натрия) перед сушкой (Bashan et al., 1986). Для обеспечения долговечности составленных микробов применяют несколько штамм-специфических защитных соединений. В случае препаратов, содержащих несколько штаммов, отдельные штаммы обычно культивируют индивидуально перед тем как их смешивают вместе. Чувствительные грамотрицательные бактерии обладают огромным потенциалом в отношении биологической защиты растений. Несмотря на то что большое внимание уделяется стабилизации микроорганизмов в составах, подходящих для крупномасштабных применений, подходящих решений не существует.

Изобретение раскрывает способы составления и ферментации для улучшения жизнеспособности микробных клеток во время хранения и применения. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают снижение плотностей инокуляции прекультур. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают стадию культивирования в шариках инкапсулированных микробных клеток. Раскрытые в настоящем документе способы являются подходящими для всех микроорганизмов, включая микроорганизмы, предназначенные для сельскохозяйственных целей, для пищевого потребления и производства кормов, а также для медицинских целей.

Используемые в настоящем документе термины "микроорганизм" или "микробный" охватывают прокариотические и эукариотические, одноклеточные или многоклеточные организмы и их комбинации, которые могут быть размножены и подвергнуты манипуляции в лаборатории. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм включает, но без ограничения эубактерии и археи, простейшие, грибы и водоросли. В настоящем раскрытии термин микроорганизм обычно обозначает живой микроорганизм, например, способный к размножению, например способный обладать метаболической активностью.

Используемые в настоящем документе термины "бактерии" и "эубактерии" используются в отношении одноклеточных организмов, включая рекомбинантные организмы, в которых отсутствуют ядра и другие мембраносвязанные органеллы. Бактерии могут функционировать и размножаться как отдельные клетки или многоклеточные агрегаты.

Используемые в настоящем документе "археи" представляют собой одноклеточные организмы, которые не имеют ядер и имеют архейные мембраны, в частности, состоящие из эфирных липидов.

Используемый в настоящем документе термин "грибы" используется в отношении эукариотических организмов, таких как плесень и дрожжи, включая диморфные грибы, грибы, обнаруженные в почве, рекомбинантные грибы и любые грибы, способные расти на растениях.

Используемый в настоящем документе термин "штамм" в целом относится к определенному генотипу организмов одинаковых видов. Более конкретно, термин "штамм" относится к представителям микробных видов, при этом такие представители, т.е. штаммы, имеют различные генотипы и/или фенотипы. В настоящем документе термин "генотип" охватывает содержание как геномной, так и рекомбинантной ДНК микроорганизма, а также протеомный и/или метаболический профиль микроорганизма и его посттрансляционные модификации. В настоящем документе термин "фенотип" относится к наблюдаемым физическим свойствам, зависящим от генетической конституции микроорганизма. Специалист в данной области поймет, что микробные штаммы состоят, таким образом, из отдельных микробных клеток, имеющих общий генотип и/или фенотип. Кроме того, отдельные микробные клетки могут иметь специфические характеристики (например, специфическую картину гер-PCR), которые могут идентифицировать их как принадлежащих к их конкретному штамму. Микробный штамм может содержать один или несколько изолятов микроорганизма.

Используемый в настоящем документе термин "эталонный метод" относится к альтернативному способу стабилизации микробов, отличному от технологии BFC по настоящему изобретению, описанной в настоящем документе, например альтернативному способу, который не включает стабилизацию микроорганизмов путем перевода их в состояние, подобное состоянию покоя, посредством целевого культивирования в шариках). "Эталонная композиция" относится к композиции, полученной из идентичного

материала прекультуры путем применения другой методики стабилизации. В качестве неограничивающего примера стабильность микробных клеток, инкапсулированных в полимерные частицы с использованием способа по настоящему изобретению (например, стабилизация микроорганизмов путем перевода их в состояние, подобное состоянию покоя, посредством целевого культивирования в шариках) сравнивается с эталонной композицией, причем эталонная композиция была генерирована с использованием другого способа таким образом, что различия в стабильности микробных клеток конечного продукта связаны с различиями в способе получения.

Используемый в настоящем документе термин "царство" относится к общей таксономической категории, например грибам и бактериям.

Используемый в настоящем документе термин "КОЕ" относится к колониеобразующей единице.

Используемый в настоящем документе термин "инокулят" обозначает любую форму микробных клеток или спор, которая способна размножаться в культуральной среде.

Используемая в настоящем документе культуральная среда определяется как смесь, которая поддерживает рост микробных клеток, таких как раскрытый микроорганизм, причем указанная смесь может содержать, например, такие ингредиенты, как пептон, соевый пептон, патоку, картофельный крахмал, порошок дрожжевого экстракта, глюкозу, маннит, обезжиренное молоко или их комбинации. Культуральная среда может представлять собой твердую культуральную среду или жидкую среду.

В соответствии с изобретением обеспечены микроорганизмы, такие как, например, но без ограничения, микроорганизмы, полезные в биотехнологическом, сельскохозяйственном или медицинском отношении, микроорганизмы, полезные для пищевых продуктов и производства кормов, которые инкапсулированы в биоразлагаемые полимеры.

Микроорганизмы по изобретению могут быть природного происхождения или получены рекомбинантными способами.

Используемый в настоящем документе термин "биоразлагаемый полимер" относится к матрицам на основе полимеров, которые демонстрируют по меньшей мере некоторую биоразлагаемость. Неограничивающие примеры подходящих биоразлагаемых полимеров включают коллаген, желатин, альгинат, поликапролактон и сополимер полимолочной и гликолевой кислот (PLGA).

В некоторых вариантах осуществления биоразлагаемый полимер может представлять собой ненасыщенный биоразлагаемый полимер (т.е. биоразлагаемый полимер, содержащий по меньшей мере одну ненасыщенную углерод-углеродную связь, такую как двойная или тройная связь). Такие ненасыщенные полимеры могут быть поперечно-сшиваемыми *in situ*. Неограничивающие примеры ненасыщенных биоразлагаемых полимеров включают полипропиленфумарат (PPF), поли(ϵ -капролактонфумарат), а также их смеси и сополимеры.

В различных вариантах осуществления полимерные частицы по настоящему изобретению могут представлять собой частицы гидрогеля (например, альгинаты, фибрины и желатины), природные или синтетические биоразлагаемые частицы (например, частицы, полученные из сополимера полимолочной и гликолевой кислот (PLGA) или покрытые им), биоразлагаемые пористые частицы (например, кремниевые пористые частицы) и биосовместимые везикулы (например, липосомы и/или мицеллы).

Особенно подходящими биоразлагаемыми полимерами для микроорганизмов, приемлемых с точки зрения сельского хозяйства, являются, помимо прочего, агароза, альгинаты, агар, желатин, полиакриламид, каппа-каррагинан, фуцелларан, 2-метил-5-винил-пиридин-метилакрилат, этилсукцинированная целлюлоза, хитозан, поливиниловый спирт, полигаммаглутаминовая кислота, этилцеллюлоза и другие биоразлагаемые полимеры, известные специалисту в данной области.

Альгинат представляет собой природный анионный полимер, обычно получаемый из бурых морских водорослей. Из-за его биосовместимости, низкой токсичности, относительно низкой стоимости и умеренного гелеобразования путем добавления двухвалентных катионов, таких как Ca^{2+} , его широко используют для многих биомедицинских применений. Коммерчески доступный альгинат обычно экстрагируют из бурых водорослей (*Phaeophyceae*). Альгинат с более определенными химическими структурами и физическими свойствами может быть получен из альгината, полученного из морских водорослей. Бактериальный альгинат может быть получен из *Azotobacter* и *Pseudomonas*.

Альгинат представляет собой смесь полисахаридов, состоящую из D-маннуроновой кислоты (M), L-гулууроновой кислоты (G). Основные серии альгинатов включают альгинат натрия, альгинат калия, альгинат кальция, альгинат аммония и т.д. В некоторых вариантах осуществления используют альгинат натрия.

Для медицинских целей биоразлагаемый полимер выбран из материалов, которые считаются безопасными для организма человека и разлагаются в организме в течение определенного периода времени. Примеры биоразлагаемых полимеров, считающихся безопасными, включают альбумин, коллаген, желатин, фибриноген, казеин, фибрин, гемоглобин, трансферрин, хитин, хитозан, гиалуроновую кислоту, гепарин, хондроитин, кератинсульфат, альгинат, крахмал, декстрин, декстран, полимолочную кислоту, полигликолевую кислоту, сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты, полигидроксимасляную кислоту, поликапролактон, полиангидрид и полиалкилцианоакрилат.

Индивидуальные полимерные частицы могут быть получены, когда указанные гидрогелевые поли-

меры образуют комплекс в растворах биологически активных субстратов. Например, раствор альгината образует гель при добавлении комплексообразующего агента. Обычно используют хлорид кальция (CaCl_2); однако также приемлемыми являются хлорид лантана, хлорид железа, хлорид кобальта и гидроксид кальция.

Для получения альгинатных шариков, которые включают микробные клетки, микробные клетки диспергируют в растворе альгината натрия. Полученный раствор по каплям добавляют в сшивающий раствор, содержащий двухвалентные катионы, например Ca^{2+} . Отверждение капель начинается сразу же на поверхности капель путем ионотропного гелеобразования. Ca^{2+} реагирует с отрицательно заряженными полимерными цепями с образованием трехмерной жесткой структуры.

В одном варианте осуществления изобретения микробные клетки индивидуально предварительно культивируют в соответствии с общепринятыми способами до плотности клеток около 10^9 - 10^{10} КОЕ/мл. Индивидуальные прекультуры суспендируют в растворе биоразлагаемого полимера до плотности клеток около 10^0 - 10^8 КОЕ/мл. Таким образом, в одном варианте осуществления две прекультуры микроорганизма различного происхождения суспендируют в растворе биоразлагаемого полимера, например в растворе альгината. В некоторых вариантах осуществления 3, 4, 5, 6 или более микроорганизмов различного происхождения суспендируют в растворе альгината. Необязательно раствор полимера содержит дополнительно носители и/или добавки.

Если обеспечено 2 микроорганизма различного происхождения, они могут присутствовать в соотношении от 1:5 до 5:1, или от 1:2 до 2:1, или 1:1. Если обеспечено 3 микроорганизма различного происхождения, они могут присутствовать в соотношении от 1:1:5 до 5:5:1, или от 1:2:2 до 2:1:1, или 1:1:1 и т.д.

Также могут быть включены различные добавки, такие как адгезивные вещества, диспергирующие вещества, поверхностно-активные вещества, а также питательные и буферные ингредиенты. Могут быть добавлены микроэлементы, такие как соли железа, марганца, бора, меди, кобальта, молибдена или цинка. Могут быть добавлены другие общепринятые добавки, включая, но без ограничения покрывающие агенты, смачивающие агенты, буферные агенты и полисахариды. В состав может быть добавлен по меньшей мере один приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель, такой как вода, твердые вещества или сухие порошки. Сухие порошки могут быть получены из различных материалов, таких как карбонат кальция, гипс, смачивающий агент (fluency agent), вермикулит, тальк, глина, гумус, активированный уголь и различные соединения фосфора. Эти добавки обычно вносят в суспензию в количестве 0,001-10% раствора полимерного вещества.

Подходящие носители включают, но без ограничения минеральные земли, такие как кремнезем, силикагели, силикаты, тальк, каолин, аттаглину, известняк, мел, лёсс, глину, доломит, диатомовую землю, сульфат кальция, сульфат магния, оксид магния, измельченные синтетические материалы, удобрения, такие как сульфат аммония, фосфат аммония, нитрат аммония, тиомочевина и мочевина, продукты растительного происхождения, такие как зерновая мука, древесная мука, мука из ореховой скорлупы, порошки целлюлозы, аттапульгиты, монтмориллониты, слюда, вермикулиты, синтетический диоксид кремния и синтетические силикаты кальция или их композиции.

Формирование шариков выполняют, например, путем внесения по каплям суспензии, которая содержит предварительно культивированные микробные клетки и полимерное вещество, в ванну с раствором многовалентных ионов с использованием вибрационной насадки. В некоторых вариантах осуществления диаметр насадки может составлять примерно 1-500 мкм. В некоторых вариантах осуществления диаметр насадки находится в диапазоне 70-100 мкм. В некоторых вариантах осуществления диаметр насадки составляет около 75 мкм. В некоторых вариантах осуществления диаметр насадки составляет около 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления диаметр насадки составляет около 200 мкм и полученные влажные шарики имеют средний диаметр около 100-500 мкм.

Диаметры шариков, составляющие менее 500 мкм и предпочтительно менее 100 мкм, могут быть предпочтительными, поскольку они обеспечивают оптимальный рост бактерий по всему шарiku и, таким образом, используют полный объем шарика для достижения максимальной бактериальной нагрузки. Необходимым условием равномерного роста является равномерное распределение питательных веществ и кислорода. Полимерная матрица действует в качестве диффузионного барьера, ограничивающего перенос соединений в пределах шариков. Можно предположить, что концентрация питательных веществ и кислорода, в частности, уменьшается в направлении от внешнего слоя к сердцевине шарика. Чем больше диаметр шариков, тем ниже концентрация соединений роста во внутренних частях, например в ядре шариков. Недостаточная доступность питательных веществ будет нарушать рост бактерий и вызвать непродуктивные зоны. В результате чем больше диаметр шариков, тем меньше объемы, в которых бактерии способны размножаться, по отношению к общему объему шарика. Достижимое количество клеток на грамм полимерных частиц ниже в шариках со средним диаметром более 500 мкм по сравнению с шариками со средним диаметром менее 500 мкм.

После стадии промывки полученные шарики переносили в систему для культивирования инкапсулированных микроорганизмов. Время инкубации составляет около 12-120 ч, предпочтительно около 48 ч. Подходящими системами для культивирования в шариках инкапсулированных микроорганизмов являются, например, реакторы с псевдоожиженным слоем. Благодаря процесс-специфическому культивиро-

ванию стабильность инкапсулированных микроорганизмов повышается за счет адаптации к стрессу. Скорости роста и максимальное количество клеток напоминают таковые неинкапсулированных культур, но могут быть немного выше. Кроме того, микробные клетки, которые размножались в формате твердой матрицы, могут индуцировать вещества, подобные биопленке, и демонстрировать улучшенный срок хранения частицы, как описано в настоящем документе.

Процессы периодической ферментации представляют замкнутые системы, в которых бактериальные культуры проходят через различные фазы роста. В момент, когда условия становятся неблагоприятными, например питательные вещества истощаются, а отходы обогащаются, популяции бактерий входят в стационарную фазу, характеризующуюся стабильным числом клеток в течение определенного периода времени. Такие условия вызывают общий стресс-ответ в бактериальных клетках и адаптацию их метаболической активности при подготовке к периоду голодания. Ответ, опосредованный стрессом, включает изменения в структуре клеточной мембраны, образование биопленок и синтез соединений, защищающих важные молекулы, такие как белки и ДНК. Адаптированные к стрессу клетки обладают более высокой переносимостью в отношении неблагоприятных условий и более высокой выживаемостью.

Таким образом, продолжительность процесса культивирования бактерий внутри шариков не определяется окончанием размножения (началом стационарной фазы) с целью получения максимального числа клеток. Как описано в настоящем документе, авторы изобретения сделали новое и неожиданное открытие того, что путем продления культивирования в шариках стационарная фаза впоследствии сохраняется, позволяя бактериям активировать механизмы и адаптироваться к стрессовым условиям, а также проявлять так называемый фенотип стационарной фазы.

Время, которое требуется культуре для осуществления адаптации к стрессу, и лежащие в основе механизмы являются штамм-специфическими, они должны быть адаптированы к соответствующим штаммам микроорганизмов. Для большинства микроорганизмов период времени, составляющий от 48 до 72 ч, является достаточным для культивирования в шариках.

Биопленка представляет собой хорошо организованное сообщество микроорганизмов, которое прилипает к поверхностям и встраивается в матрикс внеклеточных полимерных веществ (EPS). Внеклеточные полимерные вещества (EPS) представляют собой сложную смесь высокомолекулярных полимеров (>10000 Да), генерированных бактериальными клетками, продуктов лизиса и гидролиза клеток, и органического вещества, адсорбированного из субстрата. Внеклеточные полимерные вещества участвуют в установлении устойчивых систем микроорганизмов в биопленках. Образование биопленки является одним из механизмов, которые используют бактерии для выживания в неблагоприятных условиях. Бактерии, живущие в биопленке, обычно имеют существенно отличающиеся свойства от свободно плавающих (планктонных) бактерий таких же видов, поскольку плотная и защищенная среда внутри биопленки позволяет им объединяться и взаимодействовать различными способами. Одним из преимуществ этой среды является повышенная устойчивость к детергентам и антибиотикам, так как плотный внеклеточный матрикс и внешний слой клеток защищают внутреннюю часть сообщества.

Bashan (1986) раскрывает иммобилизацию и размножение *Azospirillum brasilense* Cd в альгинатных шариках. В Bashan (1986) A. *brasilense* предварительно культивировали в питательном бульоне до конечной концентрации 10^9 КОЕ/мл, затем инкапсулировали в альгинатных шариках. Шарiki промывали и инкубировали в течение 24-48 ч в свежей питательной бульонной среде для размножения внутри шариков. Шарiki хранили в герметически закрытых колбах или были лиофилизированы и оставались стабильными в течение около 12 недель (Bashan (1986), с. 1095, фиг. 5B). Однако, если частицы сушили на воздухе, выживало лишь незначительное количество бактерий (Bashan (1986), с. 1095, фиг. 5A).

Напротив, шарiki, полученные в соответствии с настоящим изобретением, проявляют значительную стабильность после сушки и могут быть высушены при температуре окружающей среды, а также все еще являются стабильными в течение по меньшей мере 35 недель при 30°C, как показано на фиг. 1A. Например, шарiki сушат при температуре 20-35°C в статическом слое или барабанной сушилке, или при 25-30°C. Подходящее время сушки составляет около 15-48, или 22-36, или 24-30 ч.

В отличие от Bashan (1986) полимерные частицы в соответствии с изобретением можно хранить при комнатной температуре в течение нескольких недель без существенного уменьшения количества жизнеспособных клеток микроорганизмов.

Следующий вариант осуществления изобретения относится к полимерным частицам, содержащим по меньшей мере один микроорганизм, при этом по меньшей мере 70% микробных клеток в шариках являются жизнеспособными при хранении в течение по меньшей мере 35 недель при 30°C. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 75, 80, 85, 90 или 95% микробных клеток в шариках являются жизнеспособными при хранении в течение по меньшей мере 35 недель. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 75, 80, 85, 90 или 95% микробных клеток в шариках являются жизнеспособными при хранении в течение по меньшей мере 35, 40, 45, 50 или 52 недель при 30°C.

Следующий вариант осуществления изобретения относится к полимерным частицам, содержащим по меньшей мере два микроорганизма различного происхождения, при этом по меньшей мере 70% микробных клеток в шариках являются жизнеспособными при хранении в течение по меньшей мере 35 недель при 30°C. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 75, 80, 85, 90 или 95% мик-

робных клеток в шариках являются жизнеспособными при хранении в течение по меньшей мере 35 недель при 30°C. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 75, 80, 85, 90 или 95% микробных клеток в шариках являются жизнеспособными при хранении в течение по меньшей мере 35, 40, 45, 50 или 52 недель при 30°C.

В различных вариантах осуществления бактерии или грибы являются полезными в сельском хозяйстве и/или садоводстве, например бактерии представляют собой пестицидные и/или инсектицидные, и/или поддерживающие рост и/или развитие растений средства, или любую их комбинацию.

В различных вариантах осуществления одна или несколько бактерий могут представлять собой *Serratia* (например, *Serratia entomophila* или *Serratia proteomaculans*),

Xanthomonas, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* (*Enterococcus*), *Yersinia* (например, *Yersinia entomophaga*), *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pasteuria*, *Azobacter*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Cyanobacteria*, *Paecilomyces*, *Streptomyces*, *Chromobacterium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Collimonas*, *Sinorhizobium*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Pedococcus*, *Leuconostoc*, *Aeromonas*, *Neptunomonas*, *Klebsiella*, *Ponchonia*, *Brevibacillus*, *Acinetobacter*, *Paraburkholderia*, *Herbaspirillum*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium*, *Ensifer*, *Sphingomonas*, *Azobacter*, *Lysobacter*, *Stenotrophomonas*

любую комбинацию двух или более из них.

В различных вариантах осуществления один или несколько грибов могут представлять собой *Beauveria*, *Penicillium*, *Metarhizium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Coniothyrium*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Sclerotinia* и микоризу или любую комбинацию двух или более из них.

Бактериальные и грибковые микроорганизмы, подходящие для использования в настоящем изобретении, предпочтительно выбраны из одного или нескольких родов *Azotobacter*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* и *Pseudomonas*, в дополнение к специфическим бактериям и грибам, таким как *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter*, *Bacillus polymyxa*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Serratia plymuthica*, *Trichoderma herzianum*, *Trichoderma viride* соответственно, или любой их комбинации.

Используя способ составления по настоящему изобретению, жизнеспособность микробных клеток во время хранения и применения в полевых условиях улучшена по сравнению с общепринятым способом (см. фиг. 1А и 1В). Этот способ является особенно подходящим для чувствительных микроорганизмов, таких как грамотрицательные бактерии, а также грибы. Микробные клетки, составленные с помощью этих способов, показали более высокие уровни выживаемости во время хранения и в случае применения к семенам по сравнению с другими известными способами. Кроме того, благодаря совместимости с широким спектром штаммов, способ позволяет одновременно составлять и культивировать более одного микробного штамма в одном препарате. Таким образом, затраты на производство мультиштаммового препарата являются сниженными по сравнению с подходом индивидуального культивирования.

Примеры

Следующие примеры приведены для облегчения понимания изобретения, но не предполагаются и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом объем изобретения. Примеры не включают подробное описание общепринятых способов, например культивирование микроорганизмов. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области.

Пример 1. Срок хранения микроорганизмов, составленных по технологии консервации бактерий и грибов (BFC).

Результаты, полученные для штаммов со штамм-специфически оптимизированным параметром ферментации и составления.

Потенциал технологии "stabilization formulation technology" в качестве примера продемонстрирован для штаммов, полезных для выбранных растений. Жизнеспособность микробных клеток (КОЕ/г), полученных с помощью разработанной технологии, сравнивали с инкапсулированными общепринятым способом клетками в соответствии с Bashan et al. (1986). В зависимости от первоначальной цели исследования препараты хранили в течение различных периодов времени при 30°C.

Микробные клетки, размноженные и составленные с помощью способов, описанных в настоящем документе, показали превосходящие уровни выживаемости во время хранения и в случае применения, например, к семенам по сравнению с другими известными способами. Кроме того, способы, описанные в настоящем документе, позволяют одновременно культивировать более одного микробного штамма в одном устройстве. Изобретение включает две основные концепции:

i) комбинированный подход к составлению и ферментации, который улучшает стабильность при хранении и повышает устойчивость составленных микробных клеток к десикации и вредным эффектам во время хранения и применения; и

ii) способ экономически эффективного культивирования более чем одного штамма микроорганизмов в одном устройстве.

На первой стадии индивидуальные прекультуры от бактерий или грибов получали и суспендировали

ли в растворе полимера, который может содержать дополнительные носители и добавки. В некоторых вариантах осуществления раствор полимера представляет собой 1,5-5% раствор. В некоторых вариантах осуществления раствор полимера представляет собой раствор альгината. В некоторых вариантах осуществления раствор альгината представляет собой альгинат натрия. В некоторых вариантах осуществления раствор альгината натрия представляет собой 1,5-5,0% раствор. В зависимости от подлежащего инокуляции штамма (штаммов) плотность клеток доводили до 10^0 - 10^8 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^4 - 10^8 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^3 - 10^7 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^2 - 10^6 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^1 - 10^5 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^0 - 10^4 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^5 - 10^8 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^4 - 10^7 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^3 - 10^6 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^2 - 10^5 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^1 - 10^4 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^0 - 10^3 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^6 - 10^8 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^4 - 10^6 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^2 - 10^4 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до около 10^0 - 10^2 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до 10^1 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до 10^2 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до 10^3 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до 10^4 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до 10^5 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до 10^6 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до 10^7 КОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления плотность инокуляции клетками доводили до 10^8 КОЕ/мл.

Формирование альгинатных шариков осуществляли путем капельного добавления раствора в ванну с раствором CaCl_2 , используя вибрационную насадку. После промывки для удаления остаточного раствора CaCl_2 шарики переносили в подобную ферментеру систему для культивирования в шариках, которая может быть описана как реактор с псевдооживленным слоем. Показатели роста и максимальное количество клеток напоминали таковые из планктонных культур, но могли быть немного выше. Через 24-72 ч культивирования шарики снова промывали. Промытые шарики могут быть необязательно обработаны растворами, содержащими осмопротективные соединения. Последняя стадия включала сушку при температуре окружающей среды в соответствующих сушильных устройствах (включая, но без ограничения статический слой в сушильной камере или барабанной сушилке) в течение 24-30 ч. В зависимости от микроорганизма и применяемого протокола плотность клеток в конечном продукте изменялась от 10^9 до 10^{12} КОЕ/г сухого веса. Способы, описанные в настоящем документе, усиливают способность составленных (стабилизированных) микробных клеток переживать десикацию и голодание в течение времени хранения и применения. Авторы изобретения сделали новое и неожиданное открытие, состоящее в том, что сочетание пониженной плотности инокуляции и последующего культивирования в шариках является важным для конечной стабильности и длительного срока хранения шариков. В отличие от подходов планктонной ферментации, клетки, полученные с помощью способов, описанных в настоящем документе, вынуждены размножаться в виде колоний внутри полимерного шарика. Таким образом, клетки, полученные с помощью способов, описанных в настоящем документе, образуют подобные биопленке структуры, включая образование матриксов, состоящих из внеклеточных полимерных веществ. Действительно, формирование биопленок и жизнь в биопленках является типичным образом жизни микроорганизмов в природе. В естественных условиях встроенные в биопленки микроорганизмы выживают в неблагоприятных условиях благодаря защитным свойствам матрицы биопленки. В одном аспекте изобретения генетический потенциал любого микроорганизма формировать защитные биопленки искусственно индуцирован посредством удивительного сочетания пониженной плотности инокуляции и культивирования в шариках, что приводит к долгосрочному улучшению выживаемости. Способы, описанные в настоящем документе, также являются подходящими для экономически эффективной мультиштаммовой ферментации. В некоторых вариантах осуществления только предварительное культивирование проводят в отдельных реакторах, тогда как основное культивирование проводят в одном устройстве. Кроме того, стадии после культивирования упрощаются за счет обработки только одного препарата.

Пример 2. Характеристика стабильности композиций, полученных с использованием технологии BFC.

Серии экспериментов выполняли, чтобы продемонстрировать вклад стадий в технологии BFC,

Stenotrophomonas rhizophila SPA-P69 (SPA-P69) получали с использованием следующих параметров по умолчанию: SPA-P69 выращивали в 0,5× питательном бульоне II (SIFIN, Germany) и суспендировали в 1,5% растворе альгината натрия с получением плотности клеток прекультуры 10^6 КОЕ/мл. Композиция 0,5× питательного бульона II имеет следующий состав: 1,75 г/л казеинового пептона, 1,25 г/л мясного пептона, 1,25 г/л желатинового пептона, 0,75 г/л дрожжевого экстракта и 2,5 г/л хлорида натрия. Альгинатные шарики формировали путем капельного введения раствора в 150 мМ CaCl_2 с использованием вибрационной насадки, имеющего диаметр насадки 100 мкм. Сформированные шарики промывали для удаления избытка CaCl_2 и шарики переносили в реактор с псевдооживленным слоем для вторичного культивирования в шариках капсулированных микроорганизмов при 22°C в течение 48 ч. После культивирования шарики промывали перед сушкой при температуре окружающей среды в неподвижном слое в сушильной камере в течение 24-30 ч. Для этих экспериментов эти параметры по умолчанию модулировали, как описано в следующей таблице, и жизнеспособность инкапсулированных штаммов, полученных с использованием этих экспериментальных параметров, сравнивали через различные промежутки времени при хранении.

Таблица 1

Параметры по умолчанию и измененные параметры и условия	
Штамм	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> SPA-P69
Концентрация альгината	1,5% (по умолчанию)
Концентрация CaCl_2	150 мМ (по умолчанию)
Диаметр насадки	100 мкм (по умолчанию) 75 мкм
Плотность инокуляции	1×10^5 КОЕ/мл 1×10^6 КОЕ/мл (по умолчанию) 1×10^7 КОЕ/мл 1×10^8 КОЕ/мл
Время культивирования	12 ч 24 ч 36 ч 48 ч (по умолчанию)
Среда для культивирования	Питательный бульон II (по умолчанию)
Температура культивирования	22°C (по умолчанию)

В первом эксперименте оценивали влияние времени, затраченного на вторичное культивирование. SPA-P69 составляли по методике технологии BFC, описанной выше, за исключением того что времена культивирования в шариках варьировались между образцами. Инкапсулированные образцы SPA-P69 подвергали культивированию в шариках в течение 0, 12, 24, 36 и 48 ч, и КОЕ/г сухой массы анализировали сразу же после стадии культивирования (t_c), после стадии сушки (t_0), после 14 дней хранения при 30°C или после 42 дней хранения при 30°C. Более длительные периоды культивирования в шариках привели к увеличению выживаемости клеток; это было особенно заметно при сравнении образцов, которые хранились в течение 42 дней при 30°C. Инкапсулированный *S. rhizophila* SPA-P69, который получали с использованием стадии культивирования в шариках в течение 48 ч, показал снижение на 0,65 log КОЕ/г сухой биомассы после 42 дней хранения при 30°C по сравнению с количеством КОЕ на г сухой биомассы, зарегистрированным сразу же после культивирования. Также следует отметить, что образцы, которые подвергались культивированию в шариках в течение 36 ч или более, показали повышенную выживаемость *S. rhizophila* SPA-P69 в образцах, которые были высушены, по сравнению с образцами, проанализированными непосредственно перед стадией сушки. Результаты показаны в табл. 2 и на фиг. 14, изображения иллюстративных шариков показаны на фиг. 15.

Таблица 2

Влияние времени культивирования на количество клеток до, после сушки и через 42 дня после хранения при 30°C

Часы культ. в шариках	После культ. в шариках (t_c)	После сушки (t_0)		После 14 дней хранения при 30°C (t_{14})			После 42 дня хранения при 30°C (t_{42})		
		КОЕ/г сухой массы влажных шариков	КОЕ/г сухой массы высушенных шариков	Δ log10 КОЕ/г сухой массы ($t_0 - t_c$)	КОЕ/г сухой массы высушенных шариков	Δ log10 КОЕ/г сухой массы ($t_{14} - t_c$)	% Δ log10 КОЕ/г сухой массы ($t_{14} - t_c$)	CFU/г сухой массы высушенных шариков	% Δ log10 КОЕ/г сухой массы ($t_{42} - t_c$)
0	7,79	0,00	-7,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	9,40	0,00	-9,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	11,46	10,31	-1,15	8,78	-2,68	-25,98	7,90	-3,57	-31,12
36	11,73	12,00	0,27	11,48	-0,26	-2,14	10,13	-1,61	-13,71
48	11,53	11,88	0,35	11,52	-0,01	-0,09	10,88	-0,65	-5,62

Во втором эксперименте оценивали влияние плотности инокуляции перед культивированием. SPA-P69 составляли по методике технологии BFC с использованием различных плотностей инокуляции (10^5 , 10^6 , 10^7 КОЕ/мл). Количество КОЕ/г сухой массы анализировали после инкапсуляции, но перед культивированием в шариках (t_c), сразу же после стадии культивирования в течение 48 ч в шариках (t_c), после стадии сушки (t_0), после 14 дней хранения при 30°C (t_{14}) и после 42 дней хранения при 30°C (t_{42}). Более низкие плотности инокуляции привели к меньшим log-потерям КОЕ/г сухой массы после хранения по сравнению с количеством КОЕ/г сухой массы, обнаруженным сразу же после стадии культивирования в шариках. Результаты показаны в табл. 3 и на фиг. 16; изображения иллюстративных шариков показаны на фиг. 17. В табл. 4 описаны характеристики колоний, сформированных в шариках, полученных с использованием методологии технологии BFC с различными плотностями инокуляции.

Таблица 3

Влияние плотности инокуляции перед культивированием на количество клеток до, после сушки и после 42 дней после хранения при 30°C											
Плотность инокуляции	После инкапсулирования (t_c)	После 48 ч культивирования в шариках (t_c)		После сушки (t_0)		После 14 дней хранения при 30°C (t_{14})			После 42 дня хранения при 30°C (t_{42})		
	КОЕ/г сухой массы влаж. шариков	КОЕ/г сухой массы влаж. шариков	$\Delta \log_{10}$ КОЕ/г сухой массы ($t_c - t_0$)	КОЕ/г сухой массы шариков	$\Delta \log_{10}$ КОЕ/г сухой массы ($t_0 - t_c$)	КОЕ/г сухой массы высуш. шариков	$\Delta \log_{10}$ КОЕ/г сух. мас. ($t_{14} - t_c$)	% $\Delta \log_{10}$ КОЕ/г сух. мас. ($t_{14} - t_c$)	КОЕ/г сухой массы высуш. шариков	$\Delta \log_{10}$ КОЕ/г сухой массы ($t_{42} - t_c$)	% $\Delta \log_{10}$ КОЕ/г сухой массы ($t_{42} - t_c$)
10^5	7,03	11,47	4,45	11,92	0,45	11,49	0,02	0,15	10,92	-0,55	-4,82
10^6	7,79	11,53	3,74	11,88	0,35	11,52	-0,01	-0,09	10,88	-0,65	-5,62
10^7	8,84	11,83	2,89	11,78	-0,05	11,50	-0,33	-2,84	10,63	-1,20	-10,16
10^8	9,85	11,97	2,12	11,76	-0,21	11,24	-0,74	-6,25	10,13	-1,84	-15,41

Таблица 4

Характеристики колоний, образованных в шариках, полученных с использованием методологии технологии BFC с различными плотностями инокуляции

	Плотность инокуляции			
	1,0E+5	1,0E+6	1,0E+7	1,0E+8
Число колоний/шарик	12,5	125	1250	12500
Диаметр колонии (мкм)	16,42	9,33	5,58	не обнаружено
Объем колонии (мкм ³)	1,89E+4	3,37E+3	1,29E+3	не обнаружено
КОЕ/колония	1,14E+05	2,02E+4	7,74E+3	не обнаружено
КОЕ/шарик	1,42E+06	2,53E+6	9,68E+6	не обнаружено

Пример 3. Метаболическое профилирование микроорганизмов, составленных по технологии консервации бактерий и грибов (BFC) с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения.

Приготовление штаммов с использованием BFC и эталонных способов *Stenotrophomonas rhizophila* SPA-P69, *Sphingomonas sanguinis*, *Pseudomonas brassicacearum* L13 и *Serratia plymuthica* 3Re каждый индивидуально составляли с использованием методологии BFC. Для создания эталонных инкапсулированных в альгинат планктонно растущих клеток ("Alginate Planktonic") клетки в жидкой культуре осаждали и ресуспендировали 1/10 исходного объема, используя 0,9% NaCl. 10-кратно концентрированную клеточную суспензию смешивали с раствором альгината таким образом, чтобы плотности клеток в полученных альгинатных шариках были аналогичны плотностям, полученным после культивирования в шариках. Сразу после формирования шариков Alginate Planktonic шарики сушили на воздухе и хранили при 30°C. Эталонные инкапсулированные в альгинате *Stenotrophomonas rhizophila* SPA-P69, *Pseudomonas brassicacearum* L13 и *Serratia plymuthica* 3Re также получали с использованием способа Bashan (1986).

Подготовка образцов.

Для анализа метаболитов собирали около 100 мг клеточной массы для каждого образца и репликата (3 на микроб/способ). Клеточный материал от планктонно растущих бактерий получали путем осаждения центрифугированием 1,9 мл жидкой культуры в 2 мл пробирках при 13500×g в течение 15 мин при 4°C и удаления супернатанта. Образцы от бактерий, иммобилизованных в альгинатных шариках, получали путем растворения 200 мг сухих шариков в 40 мл 50 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ в пробирках по 50 мл с использованием орбитального шейкера в течение 3 ч при комнатной температуре. Бактериальный осадок получали с помощью двух стадий центрифугирования. Первую стадию центрифугирования проводили при 9000×g в течение 20 мин при 10°C. После удаления супернатанта оставшийся осадок ресуспендировали в 1,0 мл 50 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, а затем подвергали дополнительной стадии центрифугирования при 13500×g в течение 15 мин при 4°C и супернатант удаляли. Массу альгинатных гранул взвешивали.

Для разрушения бактериальных клеток клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл холодного метанола при -70°C , переносили в пробирки с завинчивающейся крышкой объемом 2 мл, содержащие 250 мг стеклянных шариков диаметром 0,25-0,5 мм и три стеклянных шарика диаметром 3 мм, и обрабатывали с использованием прибора FastPrep-24 (MPBiomedicals, Illkrich, France) в течение 2×30 с при скорости на уровне 4 (самая низкая). Наконец, для удаления клеточного дебриса суспензию центрифугировали при 13500 в течение 15 мин при 4°C . 500 мкл супернатанта собирали и хранили при -70°C до проведения анализа. Для изготовления контрольных образцов среды для культивирования (NBII) аликвоты по 100 мкл питательного бульона II смешивали с 1 мл метанола. Контрольные образцы для альгинатных шариков получали путем растворения 2 г влажных стерильных альгинатных шариков в 40 мл $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (50 mM) и смешивания 100 мкл раствора с 1 мл метанола.

Характеристики образцов дополнительно описаны в табл. 5.

Таблица 5

Усредненные характеристики образцов, полученных для определения профиля метаболитов

	Stenotrophomonas rhizophila SPA-P69				Sphingomonas sanguinis		
	BFC (культивирование в шариках)	Планктонные	Инкапсулированные в альгинат планктонные	Bashan	BFC (культивирование в шариках)	Планктонные	Инкапсулированные в альгинат планктонные
Число клеток/мл (г сухих шариков)	1,78E+11	2,96E+09	6,78E+10	9,11E+10	8,43E+09	2,65E+09	7,01E+09
Объем, мл (масса, г) образца	2,00E-01	1,50E+00	2,00E-01	2,00E-01	2,00E-01	1,50E+00	2,00E-01
Масса клеточного осадка (мг)	1,07E+02	9,78E+01	1,03E+02	1,02E+02	1,02E+02	9,61E+01	1,00E+02
Расчетное значение КОЕ/LC-MS образца	3,57E+10	4,45E+09	1,36E+10	1,82E+10	1,69E+09	3,97E+09	1,40E+09

Определение профиля метаболитов с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения.

Для анализа метаболитов использовали систему Thermofisher, HPLC и Orbitrap (Q-Exactive) HPLC-MS-System со следующими характеристиками: колонка представляла собой Atlantis dC18, 3 мкм, $2,1 \times 100$ мм; скорость потока 0,3 мл/мин; градиент 10% В (2 мин)-50% В (5 мин)-80% (15 мин)-10% В (5 мин) с общим временем анализа 40 мин; подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота/ $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$; В: 0,1% муравьиная кислота/ацетонитрил.

Специфические параметры масс-спектрометра представляли собой следующие: напряжение 3100; температура капилляра: 330; режим положительных, отрицательных ионов дополнительно; разрешение: 70000, цель AGC: 1×10^6 , максимальное время впрыска (IT): 200 мс, диапазон сканирования: 100-1500 м/з; MS2-параметр: разрешение: 17,500.

Общие параметры масс-спектрометра представляли собой следующие: выбор предшественника: использование предшественника MS (n-1); использование переоценки нового предшественника: True; использование изотопного паттерна в переоценке прекурсоров: True; хранение хроматограмм: False.

Настройки Spectrum Properties Filter представляли собой следующие: "Нижний предел RT" (Lower RT Limit): 0; "Верхний предел RT" (Upper RT Limit): 0; "Первое сканирование" (First Scan): 0; "Последнее сканирование" (Last Scan): 0; "Игнорировать указанные сканирования" (Ignore Specified Scans): (не указано); "Состояние минимального заряда" (Lowest Charge State): 0; "Состояние максимального заряда" (Highest Charge State): 0; "Минимальная масса предшественника" (Min. Precursor Mass): 100 Да; "Максимальная масса предшественника" (Max. Precursor Mass): 5000 Да; "Пороговое значение общей интенсивности" (Total Intensity Threshold): 0; "Минимальное количество пиков" (Minimum Peak Count): 1.

Настройки Scan Event Filter представляли собой следующие: "Масс-анализатор" (Mass Analyzer): (не указан); "Порядок MS" (MS Order): любой; "Тип активации" (Activation Type): (не указан); "Минимальная энергия соударения" (Min. Collision Energy): 0; "Максимальная энергия соударения" (Max. Collision Energy): 1000; "Тип сканирования" (Scan Type): любой; "Режим полярности" (Polarity Mode): (не указан).

Настройки Peak filter представляли собой следующие: "Пороговое значение S/N" (S/N Threshold) (только FT): 1,5. Настройки "Replacements for Unrecognized Properties" представляли собой следующие: Unrecognized Charge Replacements: 1; Unrecognized Mass Analyzer Replacements: ITMS; Unrecognized MS Order Replacements: MS2; Unrecognized Activation Type Replacements: CID; Unrecognized Polarity Replacements: +; Unrecognized MS Resolution@200 Replacements: 60000; Unrecognized MSn Resolution@200 Replacements: 30000.

Анализ данных методом высокоэффективной хроматографии (HPLC) в сочетании с масс-спектрометрией проводили с использованием программы Compound Discoverer version 2.1.0.398 (ThermoFisher) и рабочего процесса нецелевой метаболомики для поиска и обнаружения различий между образцами. Анализ данных рабочего процесса включал выравнивание времени удерживания, обнаружение неизвестных соединений и группировку соединений по всем образцам, прогнозируемые элементные составы для всех соединений, заполненные пробелы по всем образцам и скрытый химический фон (с использованием стандартных образцов).

Для группировки неизвестных соединений настройки "Compound Consolidation settings" представляли собой следующие: "Допуск по массе" (Mass Tolerance): 5 ppm (частей на миллион), "Допуск по RT" (RT Tolerance) [мин]: 0,05. В "Fragment Data Selection" использовали следующие "Предпочтительные ионы" (Preferred Ions): [M+H]⁺+1; [M-H]⁻-1. Для заполнения пробелов использовали следующие "Общие настройки" (General Settings): "Допуск по массе" (Mass Tolerance): 5 ppm, "Пороговое значение S/N" (S/N Threshold): 1,5, Use Real Peak Detection: "Истинно" (True). Для нормализации областей настройки "QC-based Area Correction" представляли собой следующие: "Модель регрессии" (Regression Model): "Линейная" (Linear), "Минимальный охват QC" (Min. QC Coverage) [%]: 50, "Максимальная область QC RSD" (Max. QC Area RSD) [%]: 30, "Максимальное количество файлов между файлами QC" (Max. # Files Between QC Files): 20. Настройки "Area Normalization" представляли собой следующие: "Тип нормализации" (Normalization Type): "Нет" (None), "Исключение контролей" (Exclude Blanks): "Истинно" (True).

Для определения неизвестного соединения допуск по массе был установлен на 5 ppm, допуск по интенсивности на 30%, пороговое значение S/N, равное 3, мин. интенсивность пика 1000000, ионы:

[2M+ACN+H]⁺+1, [2M+ACN+Na]⁺+1, [2M+FA-H]⁻-1,

[2M+H]⁺+1, [2M+Na]⁺+1, [2M+NH₄]⁺+1, [2M-H]⁻-1, [2M-H+HAc]⁻-1, [M+2H]⁺+2, [M+3H]⁺+3,

[M+ACN+2H]⁺+2, [M+ACN+H]⁺+1, [M+ACN+Na]⁺+1, [M+Cl]⁻-1, [M+FA-H]⁻-1, [M+H]⁺+1,

[M+H+K]⁺+2, [M+H+Na]⁺+2, [M+H+NH₄]⁺+2, [M+H-H₂O]⁺+1, [M+H-NH₃]⁺+1, [M+K]⁺+1,

[M+Na]⁺+1, [M+NH₄]⁺+1, [M-2H]⁻-2, [M-2H+K]⁻-1, [M-H]⁻-1, [M-H+HAc]⁻-1, [M-H-H₂O]⁻-1,

основные ионы: [M+H]⁺+1; [M-H]⁻-1, минимальное количество элементов: C H, Max. Element Counts: C₉₀H₁₉₀Cl₄K₂N₁₀Na₂O₁₅P₃S₅.

Для обнаружения пиков использовали следующие настройки: "Пики фильтров" (Filter Peaks): "Истинно" (True), "Максимальная ширина пика" (Max. Peak Width) [мин]: 0,5, "Удаление синглет" (Remove Singlets): "Истинно" (True), "Минимальное число сканирований на пик" (Min. # Scans per Peak): 5, "Минимальное число изотопов" (Min. # Isotopes): 1. Настройки коррекции площади и нормализации площади на основе QC представляли собой следующие: "Модель регрессии" (Regression Model): "Линейная" (Linear), "Минимальное покрытие QC" (Min. QC Coverage) [%]: 50, "RSD максимальной площади на основе QC" (Max. QC Area RSD) [%]: 30, "Максимальное число файлов между файлами QC" (Max. # Files Between QC Files): 20; "Площадь нормализации" (Area Normalization): "Тип нормализации" (Normalization Type): "Нет" (None), "Исключая контроли" (Exclude Blanks): "Истинно" (True). Настройки "Предсказание композиции" (Composition prediction) представляют собой следующие: "Допуск по массе" (Mass Tolerance): 5 ppm, "Минимальное число элементов" (Min. Element Counts): C H, "Максимальное число элементов" (Max. Element Counts): C₉₀H₁₉₀Cl₄N₁₀O₁₈P₃S₅, мин. RDBE: -1, макс. RDBE: 40, мин. Н/С: 0,1, макс. Н/С: 4, "Максимальное число кандидатов" (Max. # Candidates): 10, "Максимальное число внутренних кандидатов" (Max. # Internal Candidates): 200. Настройки "Совпадение фрагментов" (Fragment matching settings) представляли собой следующие: "Использование совпадения фрагментов" (Use Fragments Matching): "Истинное" (True), "Допуск по массе" (Mass Tolerance): 5 mmu, "Пороговое значение S/N" (S/N Threshold): 3.

Соединения идентифицировали с использованием mzCloud (ddMS2) и ChemSpider (формула или точная масса). Настройки поиска mzCloud представляли собой следующие: "Классы соединений" (Compound Classes): "Все" (All), "Совпадение типа активации ионов" (Match Ion Activation Type): "Ложно" (False), "Совпадение энергии активации ионов" (Match Ion Activation Energy): "Совпадение с допуском" (Match with Tolerance), "Допуск по энергии активации ионов" (Ion Activation Energy Tolerance): 20, "Применение порогового значения интенсивности" (Apply Intensity Threshold): "Истинно" (True), "Допуск по массе предшественника" (Precursor Mass Tolerance): 10 ppm, "Допуск по массе фрагмента FT" (FT Fragment Mass Tolerance): 10 ppm, "Допуск по массе фрагмента IT" (IT Fragment Mass Tolerance): 0,4 Да, "Поиск идентичности" (Identity Search): HighRhem HighRes, "Поиск сходства" (Similarity Search): Similarity Forward, "Библиотека" (Library): "Справочная информация" (Reference), "Постобработка" (Post Processing): "Перекалибровано" (Recalibrated), "Пороговое значение фактора совпадения" (Match Factor Threshold): 50, "Максимальное количество результатов" (Max. # Results): 10. Настройки совпадения паттернов (Pattern matching) представляли собой следующие: "Допуск по интенсивности" (Intensity Tolerance) [%]: 30, "Пороговое значение интенсивности" (Intensity Threshold) [%]: 0,1, "Пороговое значение S/N" (S/N Threshold): 3, мин. "Спектральное соответствие" (Spectral Fit) [%]: 30, мин. Pattern Cov. [%]: 90, "Использовать динамическую калибровку" (Use Dynamic Recalibration): "Истинно" (True).

В ChemSpider использовались следующие источники данных: BioСус, базы данных E. coli Metabolome Database, Human Metabolome Database, KEGG, MeSH, NIST Chemistry WebBook Spectra, PubChem и Yeast Metabolome Database.

Поиски сходства также выполняли для всех соединений с данными ddMS2 с использованием mzCloud. Соединения картировали на биологические пути с использованием базы данных KEGG. Для картирования на путь KEGG использовали следующие настройки: 1. "Настройки поиска по массе" (Mass Search Settings): "Допуск по массе" (Mass Tolerance): 5 ppm; 2. "Настройки поиска по формуле" (Formula Search Settings): "Максимальное число предсказанных композиций, подлежащих поиску на соединение" (Max. # of Predicted Compositions to be searched per Compound): 3 и 3. "Настройки отображения" (Display Settings): "Максимальное число путей" (Max. # Pathways) в колонке "Пути": 20.

Батч-нормализацию на основе QC применяли, когда были доступны образцы QC. Рабочий процесс также включал вычисление дифференциального анализа (t-критерий или ANOVA), определение р-значения, определение скорректированного р-значения, коэффициентов, кратного изменения и CV.

Используя программу ThermoFisher Compound Discoverer, файлы переменных с разделителями-запятыми (CSV), представляющие таблицу с файлами входных данных (Input Files Table) и таблицу с ожидаемыми характеристиками (Expected Features Table), были экспортированы, как описано в руководстве Thermo Compound Discoverer User Guide (доступно на thermofisher.com). Всю последующую обработку и анализ выполняли на статистическом языке R, версия 3.5.1 (R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. R-project.org/). Если не указано иное, все анализы выполняли одинаково, но отдельно для наборов данных положительных и отрицательных ионов. Группы пиков строили с использованием функции XCMS `dogroupChromPeaksnearest` с параметрами по умолчанию (Smith et al. (2006), XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using Nonlinear peak alignment, matching, and identification, *Analytical Chemistry*, 78:779-787). В каждом образце интенсивности пиков, имеющих идентичные m/z и время удерживания, суммировали. Наборы данных для всех образцов объединяли в единую матрицу, при этом индикатор NA представлял отсутствие обнаружения определенного пика в конкретном образце. Для увеличения плотности набора данных были удалены метаболиты, представленные NA в более чем половине образцов. Остальные значения NA были заменены минимальным значением интенсивности, определяемым как половина наименьшей ненулевой интенсивности набора данных. Для нормализации уровней интенсивности по образцам выполняли квантильную нормализацию с использованием функции "normalize.quantiles" в пакете `preprocessCore` (Bolstad B (2018), `preprocessCore`: A collection of pre-processing functions. Версия 1.42.0 пакета R доступна по адресу github.com/bmbolstad/preprocessCore). Нормализованные интенсивности были преобразованы log-2 для последующего статистического анализа.

Для уменьшения ненужной множественности проверки статистической гипотезы выполняли неспецифическую фильтрацию с использованием генного фильтра [Gentleman2018] для удаления метаболитов с коэффициентом дисперсии меньше 0,03 или интерквартильным интервалом меньше 0,5. Статистическое t-тестирование выполняли с помощью функции Лимма `lmFit` (Ritchie et al. (2015), "limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies", *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47.), используя эмпирическую байесовскую оценку дисперсии с помощью функции `eBayes` и используя функцию `topTable` для получения корректировки р-значения по Бенджамини и Хохбергу. Чтобы спроецировать метаболиты на известные метаболические пути и наименования соединений, алгоритм `mummichog` (Li et al., Predicting Network Activity from High Throughput Metabolomics, Ouzounis C.A., ed. *PLoS Computational Biology*, 2013, 9(7):e1003123) использовали посредством имплементации в `MetaboAnalystR` (Chong & Xia (2018) `MetaboAnalystR`: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data, *Bioinformatics*, 2018 Jun 28). `InitDataObjects` вызывали с типом анализа, установленным на "mummichog", за которым следовали `UpdateMummichogParameters` с `instrumentOpt`, установленным на "0,1", ионной полярностью, установленной на положительную или отрицательную, и `pvalCutoff`, установленным на 1,0E-6. Наконец, функция `PerformMummichog` была вызвана с соответствующей моделью прокариот вместе с параметрами "fisher" и "gamma" для `enrichOpt` и `pvalOpt` соответственно. Идентификаторы соединений сопоставляли с соответствующими описательными названиями KEGG (Kanehisa & Goto (2000), KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes, *Nucleic Acids Res.*, 28(1):27-30). Log-кратное изменение корректировали, чтобы отразить относительное KOE/LC-MS образца.

Соединения, увеличенные по составленным по BFC *Sphingomonas sanguinis* и *Stenotrophomonas rhizophila* SPA-P69 по сравнению с контрольными композициями, показаны в табл. 6А. Соединения, увеличенные по составленным по BFC *Sphingomonas sanguinis* по сравнению с эталонной композицией *Alginat Planktonic*, показаны в табл. 6В. EPS относится к внеклеточному полимерному веществу. Следует понимать, что иллюстративные соединения включают родственные соединения, такие как окисленные и восстановленные формы и производные.

Таблица 6А

Соединения, увеличенные по составленным по BFC *Sphingomonas sanguinis* и *Stenotrophomonas rhizophila* SPA-P69 по сравнению с эталонными композициями

Классы или функции	Иллюстративное соединение(я)	Диапазон титр-скорр. кратного изменения относит. эталонных композиций	<i>Sphingomonas sanguinis</i>	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> SPA-P69	
			Титр-скорр. кратное изм. BFC относительно эталонной композиции Alginate Planktonic	Титр-скорр. кратное изм. BFC относительно эталонной композиции Alginate Planktonic	Титр-скорр. кратное изм. BFC относительно эталонной композиции Bashan
Другие	нафтазарин	13,8-485,3	485,33	13,83	75,04
Витамин/Redox	NAD+/NADH	1,25-4,0	3,13	3,73	3,98
АА, белок, EPS	Тиамин	2,3-143,5	143,48	9,59	2,26
	Аденин	1,1-15,9	7,46	15,95	1,07
	триптофан	1,7-13,9	13,89	2,77	3,79
АА, не-белок	фенилаланин	1,3-4,4	4,40	1,28	1,58
	гомоцистеин	3,7-16,1	16,09	6,65	3,69
Стабилизация	триптофан	1,7-13,9	13,89	2,77	3,79
Цикличность пути	гомоцистеин	3,7-16,1	16,09	6,65	3,69
	эритрозо-4-фосфат	3,2-9,7	8,06	2,03	1,64
	пиридоксин фосфат	3,1-5,3	4,40	1,28	1,58
	фенилаланин	1,3-4,4	4,40	1,28	1,58

Таблица 6В

Соединения, увеличенные по составленным по BFC *Sphingomonas sanguinis* относительно эталонной композиции Alginate Planktonic

Классы/Функция	Иллюстративное соединение(я)	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
		Титр-скорректированное кратное изменение- BFC относительно эталонной композиции Alginate Planktonic
Другие	нафтазарин	485,33
Витамин/Redox	Тиамин	143,48
	Никотинамид	8,12
	Аденин	7,46
	NAD+/NADH	3,13
Стабилизация	Глутаминовая кислота/глутамат	55,44
Цикличность пути	триптофан	13,89
	спермидин	6,07
	Пиоцианин	1,55
	Гомоцистеин	16,09

Другие	Аденозин	10,18
	Эритрозо-4-фосфат	8,06
	Пиридоксин фосфат	4,40
	Фенилаланин	4,40
	Метионин	4,16
	N-метил-L-глутамат	0,91
	Метилтиониния хлорид	1,82
EPS	Глюкозамин/хитозамин	6,58
DNA/RNA, EPS	Цитозин/аденин	8,95
Антиоксидант	Глутатион	97,31
AA, белок, EPS	Лимонная кислота	8,21
	Пиоцианин	1,55
	Глутамовая кислота /глутамат	55,44
AA, не-белок	Триптофан	13,89
	Тирозин	6,58
	Фенилаланин	4,40
	Метионин	4,16
	Лизин	2,70
	Пролин	2,63
	Гомоцистеин	16,09

Таблица 6С

Соединения, увеличенные по составленным по BFC *Stenotrophomonas rhizophila* SPA-P69 относительно эталонных композиций

Классы/ Функции	Иллюстративное соединение(я)	Stenotrophomonas rhizophila SPA-P69	
		Титр-скорректированное кратное изменение BFC относительно эталонной композиции Alginate Planktonic	Титр- скорректированное кратное изменение BFC относительно эталонной композиции Bashan
Другие	Нафтазарин	13,83	75,04
AA, не-белок	Гомоцистеин	6,65	3,69
AA, белок, EPS	Триптофан	2,77	3,79
	Фенилаланин	1,28	1,58
Осмолит	Рамноза	1,48	2,38
Цикличность пути	Гомоцистеин	6,65	3,69
	Эритрозо-4-фосфат	2,03	1,64
		1,28	1,58
		1,28	1,58
Стабилизация		2,77	3,79
Витамин/Redox	NAD+/NADH	3,73	3,98
	Тиамин	9,59	2,26
	Аденин	15,95	1,07

Пример 4. Характеристики колоний в шариках, полученных по технологии BFC.

Paraburkholderia caledonica и *Enterobacter cowanii* получали методом BFC с использованием плотностей инокуляции прекультуры от $2E+7$ до $4E+7$ с различными временами культивирования в шариках и для *Enterobacter cowanii* использовали различные проценты альгината и диаметры насадки.

Образцы *Paraburkholderia caledonica* готовили с использованием насадки диаметром 80 мкм и 2% раствора альгината. Культивирование в шариках проводили в течение 47, 138 или 168 ч. Образцы *Enterobacter cowanii* готовили с использованием насадки диаметром 80 мкм и насадки диаметром 120 мкм, а также 2 и 3% растворов альгината. Культивирование в шариках выполняли в течение 50, 70 или 71 ч. Шарик, изготовленные с помощью насадки диаметром 80 мкм, имели средний диаметр 186 мкм и диа-

пазон 134-235 мкм во влажном состоянии, средний диаметр 78 мкм и диапазон 50-103 мкм после сушки. Шарики имели приблизительно от 2 до 100 колоний на шарик. Средний, наименьший и самый большой диаметры шариков указаны в табл. 7А и 7В. Диаметр колонии измеряли в самой широкой точке колонии. Измерения колоний проводили во влажных слоях. Увеличение времени культивирования в шариках привело только к умеренному увеличению диаметра колонии.

Таблица 7А

Измерение размера колоний инкапсулированных по технологии BFC Paraburkholderia caledonica

Измерение размера колоний Paraburkholderia caledonica				
Партия	Время (ч)	Наименьшая колония (мкм)	Средняя колония (мкм)	Самая большая колония (мкм)
180907-80 мкМ-2% Альгинат	47	16	21	35
180907-80 мкМ-2% Альгинат	138	15	25	37
180907-80 мкМ-2% Альгинат	168	19	27	41
Среднее:		16	24	38

Таблица 7В

Измерение размера колоний инкапсулированных по методу BFC Enterobacter cowanii

Измерение размера колоний Enterobacter cowanii				
Партия	Время (ч)	Наименьшая колония (мкм)	Средняя (мкм)	Самая крупная колония (мкм)
180803-175-80 мкМ: 2% Альгинат	50	21	32	40
180620-175-80 мкМ: 3% Альгинат	70	26	31	33
180619-175-120 мкМ: 3% Альгинат	71	24	37	43
Среднее:		24	33	39

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полимерная композиция для иммобилизации, культивирования и хранения микроорганизмов, содержащая один или несколько инкапсулированных микроорганизмов в одном или нескольких многоклеточных агрегатах, встроенных в самопродуцируемый внеклеточный биогенный матрикс внутри полимерных частиц, при этом самопродуцируемый внеклеточный биогенный матрикс содержит нафтазарин, при этом по меньшей мере один микроорганизм имеет общую концентрацию по меньшей мере 10^8 КОЕ/г сухой массы и хранится при 30°C в течение 14 недель, что приводит к потере менее чем $1 \log_{10}$ КОЕ/г сухой массы.

2. Полимерная композиция по п.1, отличающаяся тем, что композиция содержит нафтазарин в количестве, по меньшей мере в 10 раз большем по сравнению с контрольной композицией, которая включает тот же самый микроорганизм(ы), как планктонно растущие клетки.

3. Полимерная композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что самопродуцируемый внеклеточный биогенный матрикс дополнительно содержит одно или несколько соединений, выбранных из группы, состоящей из гомоцистеина, NAD⁺/NADH, триптофана, тиамина, эритрозо-4-фосфата, фенилаланина, пиридоксина фосфата и аденина.

4. Полимерная композиция по п.3, отличающаяся тем, что самопродуцируемый внеклеточный биогенный матрикс дополнительно содержит один или несколько из гомоцистеина, NAD⁺/NADH, триптофана, тиамина, эритрозо-4-фосфата, фенилаланина, пиридоксина фосфата или аденина по меньшей мере в 1 раз большем количестве по сравнению с контрольной композицией, которая включает тот же самый микроорганизм(ы), как планктонно растущие клетки.

5. Полимерная композиция по п.1, отличающаяся тем, что полимерные частицы являются влажными и по меньшей мере 1 из одного или нескольких многоклеточных агрегатов имеет диаметр в диапазоне от 14 до 43 мкм, по меньшей мере 25% одного или нескольких многоклеточных агрегатов имеют диаметр в диапазоне от 14 до 43 мкм, по меньшей мере 50% одного или нескольких многоклеточных агрегатов имеют диаметр в диапазоне от 14 до 43 мкм и по меньшей мере 75% одного или нескольких многоклеточных агрегатов имеют диаметр в диапазоне от 14 до 43 мкм.

6. Полимерная композиция по п.1, отличающаяся тем, что полимерные частицы содержат биоразлагаемый полимер, где биоразлагаемый полимер выбран из группы, состоящей из альбумина, коллагена, желатина, фибриногена, казеина, фибрина, гемоглобина, трансферрина, хитина, хитозана, гиалуроновой

кислоты, гепарина, хондроитина, кератинсульфата, альгината, крахмала, декстрина, декстрана, полимолочной кислоты, полигликолевой кислоты, сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты, полигидроксимасляной кислоты, поликапролактона, полиангидрида, агарозы, агара, хитозана и полиалкилцианоакрилата.

7. Полимерная композиция по п.1, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна из полимерных частиц имеет диаметр менее 200 мкм, диаметр менее 100 мкм, диаметр менее 75 мкм, диаметр менее 50 мкм.

8. Полимерная композиция по п.1, отличающаяся тем, что один или несколько инкапсулированных микроорганизмов представляют собой клетки бактерий и/или грибов.

9. Полимерная композиция по п.1, отличающаяся тем, что один или несколько инкапсулированных микроорганизмов содержат по меньшей мере два микроорганизма различного генетического происхождения, где по меньшей мере два микроорганизма различного генетического происхождения выбраны по меньшей мере из двух из группы архей, простейших, бактерий, грибов и водорослей.

10. Способ получения полимерной композиции по любому из пп.1-9, включающий следующие стадии:

а) суспендирование одной или нескольких прекультур микробных клеток в растворе полимерного вещества;

б) иммобилизация указанных микробных клеток путем капельного внесения раствора, полученного на стадии а), в раствор многовалентных ионов с получением тем самым полимерных частиц;

с) культивирование инкапсулированных микроорганизмов в указанных полимерных частицах в течение по меньшей мере 12 ч в жидкой среде до достижения увеличения плотности клеток по меньшей мере от 2 до 10 log;

д) сбор полимерных частиц;

е) сушка полимерных частиц,

где микроорганизмы образуют многоклеточные агрегаты, внедренные в самопродуцируемый внеклеточный биогенный матрикс внутри полимерных частиц, и где самопродуцируемый внеклеточный биогенный матрикс содержит нафтазарин.

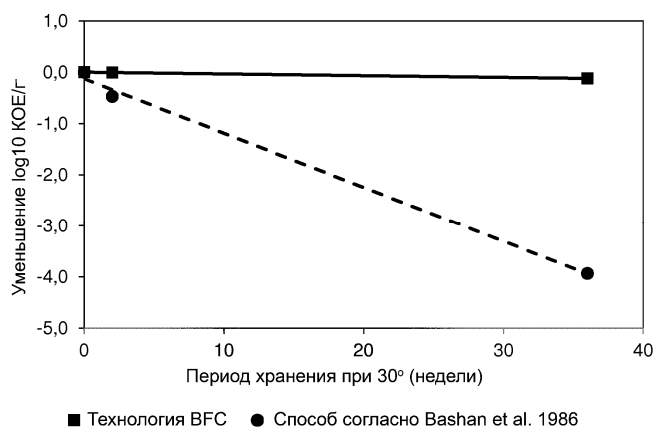
11. Способ по п.10, отличающийся тем, что высушенные полимерные частицы являются регидратированными и содержат один или несколько многоклеточных агрегатов с диаметром в диапазоне от 14 до 43 мкм.

12. Способ по п.10, отличающийся тем, что полимерное вещество представляет собой биоразлагаемый полимер, где биоразлагаемый полимер выбран из группы, состоящей из альбумина, коллагена, желатина, фибриногена, казеина, фибрина, гемоглобина, трансферрина, хитина, хитозана, гиалуроновой кислоты, гепарина, хондроитина, кератинсульфата, альгината, крахмала, декстрина, декстрана, полимолочной кислоты, полигликолевой кислоты, сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты, полигидроксимасляной кислоты, поликапролактона, полиангидрида, агарозы, агара, хитозана и полиалкилцианоакрилата.

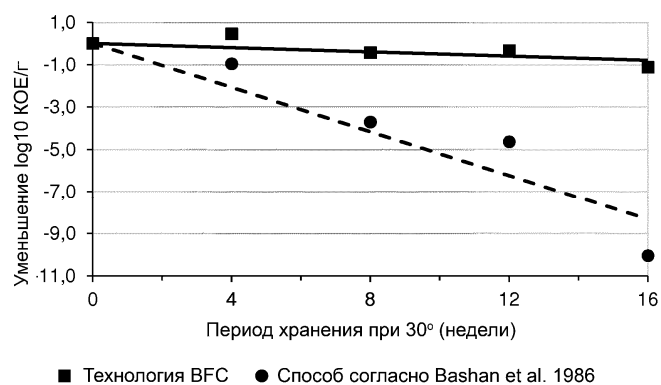
13. Способ по п.10, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из полимерных частиц имеет диаметр менее 200 мкм, диаметр менее 100 мкм, диаметр менее 75 мкм, диаметр менее 50 мкм.

14. Способ по п.10, отличающийся тем, что инкапсулированные микроорганизмы представляют собой клетки бактерий и/или грибов.

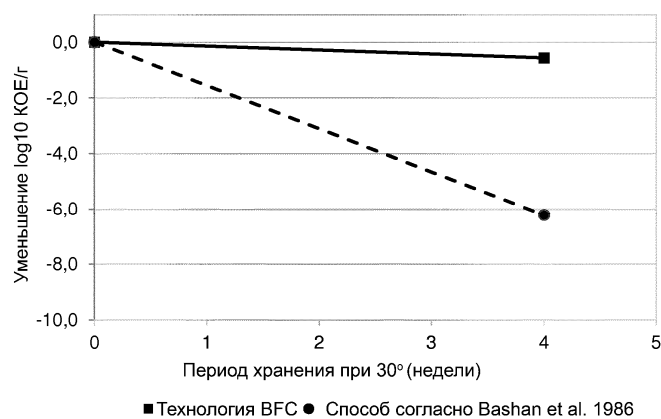
15. Способ по п.10, отличающийся тем, что инкапсулированные микроорганизмы содержат по меньшей мере два микроорганизма различного генетического происхождения, где по меньшей мере два микроорганизма различного генетического происхождения выбраны по меньшей мере из двух групп: архей, простейших, бактерий, грибов и водорослей.



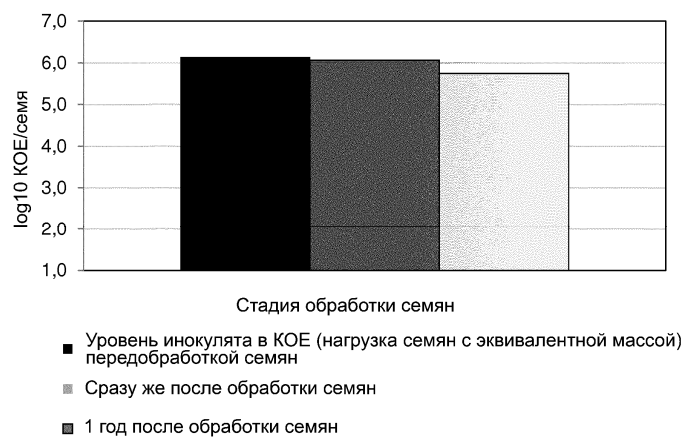
Фиг. 1А



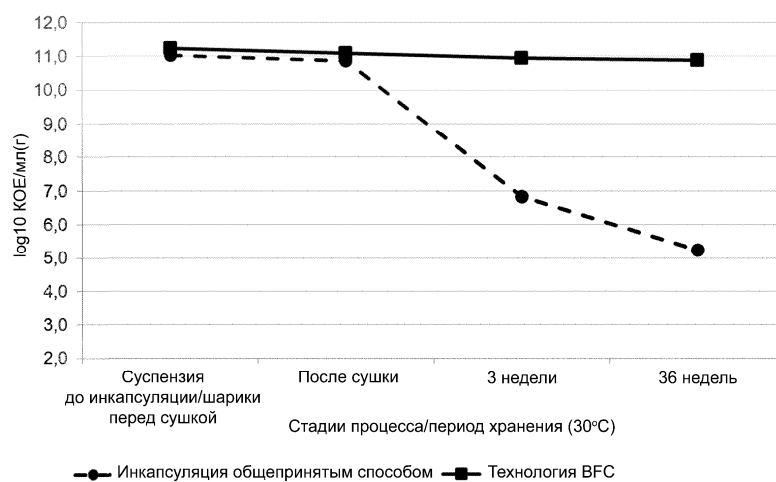
Фиг. 1В



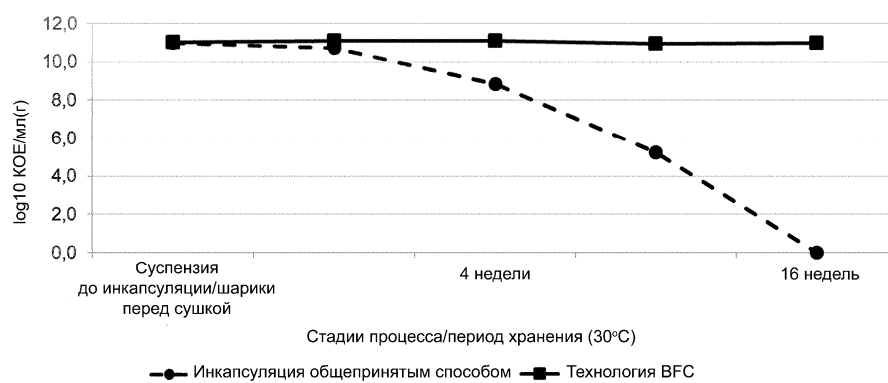
Фиг. 1С



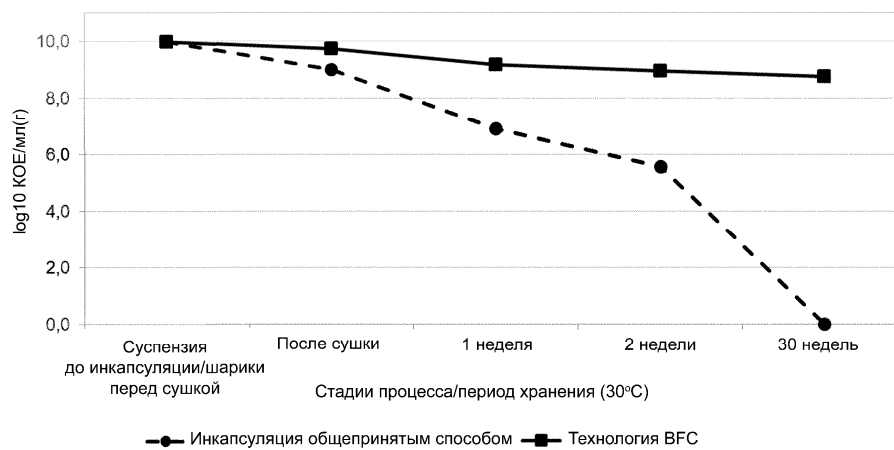
Фиг. 2



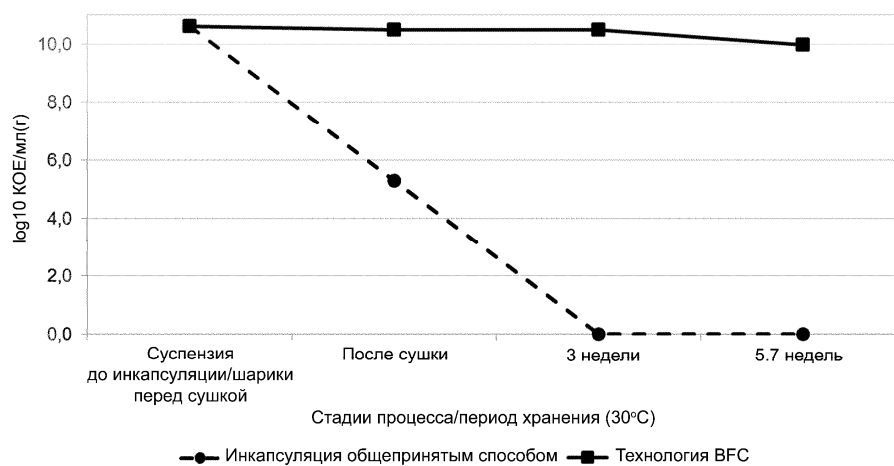
Фиг. 3



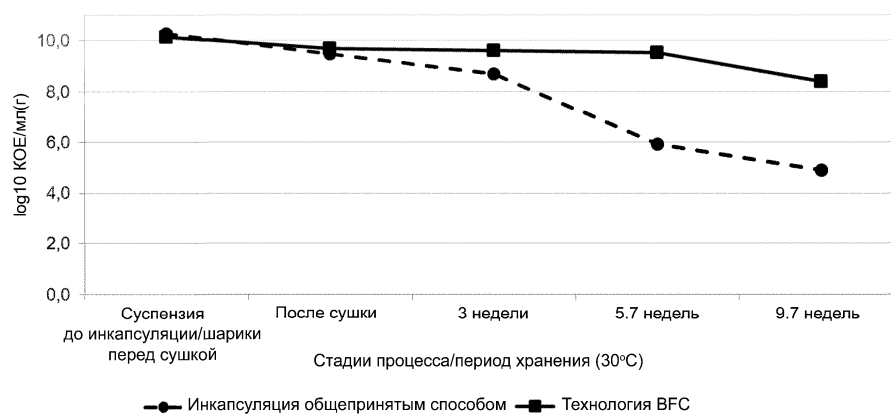
Фиг. 4



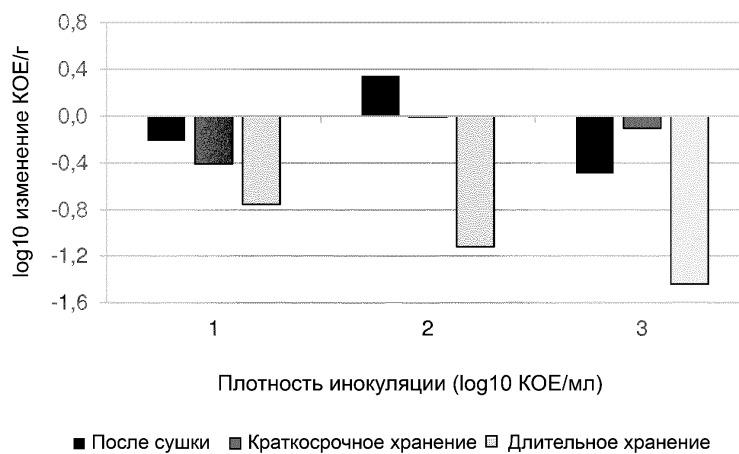
Фиг. 5



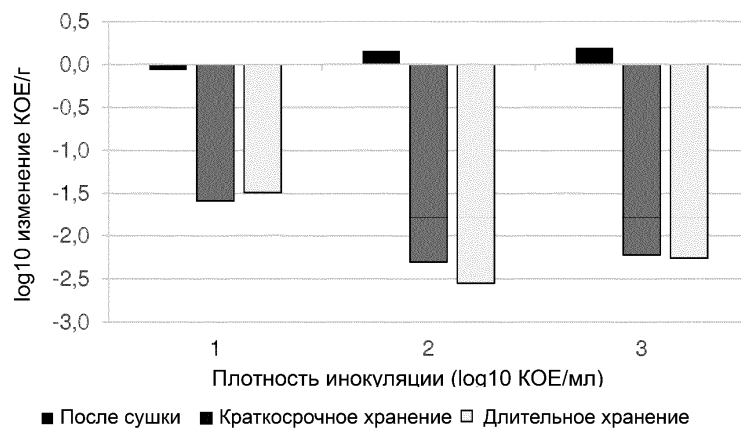
Фиг. 6



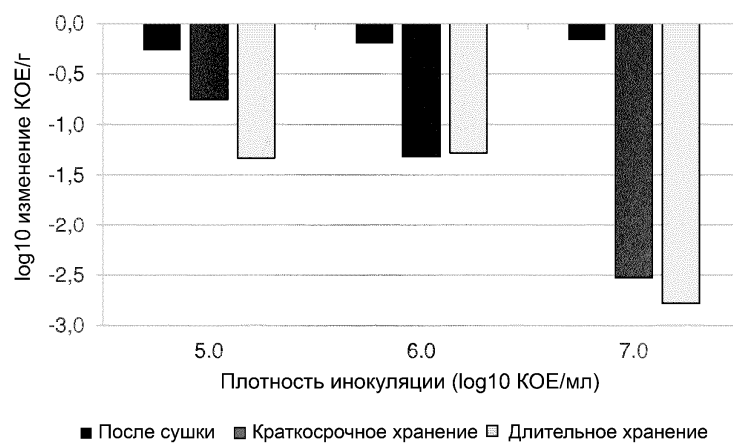
Фиг. 7



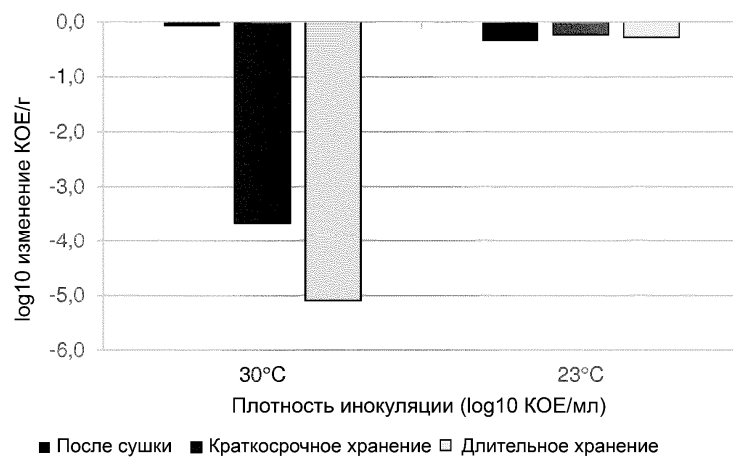
Фиг. 8А



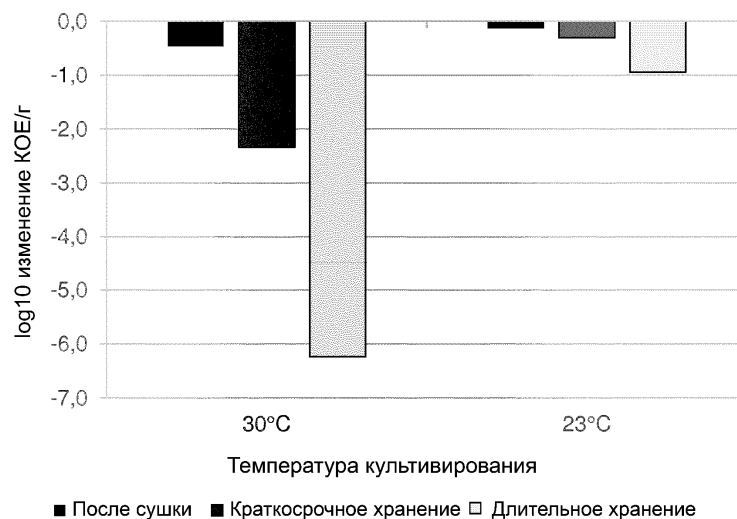
Фиг. 8В



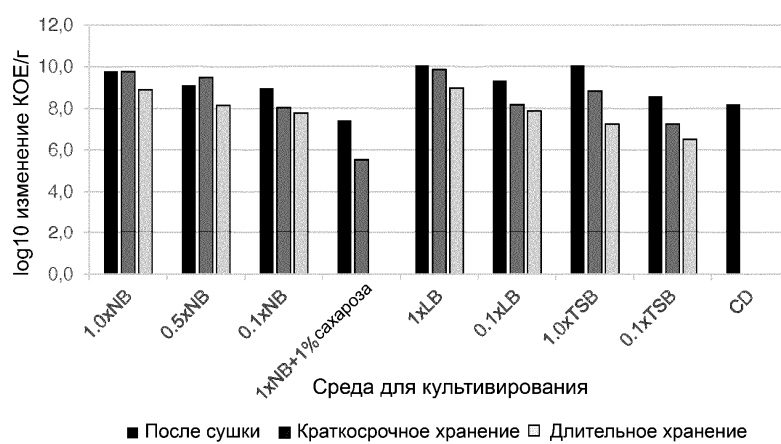
Фиг. 9



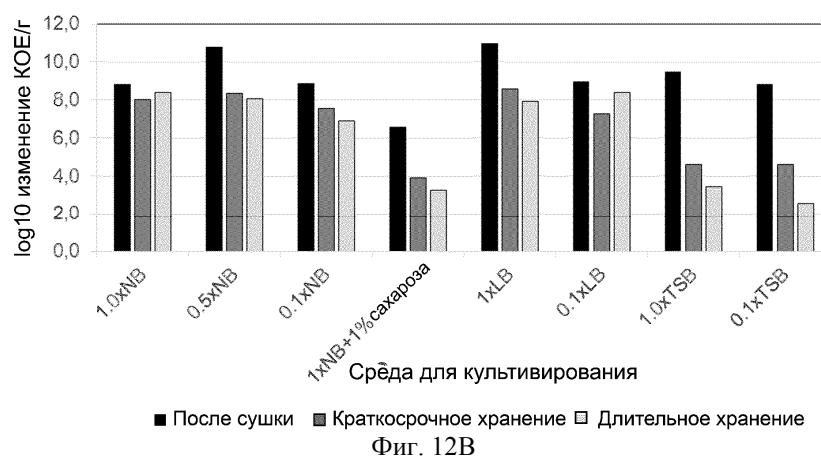
Фиг. 10



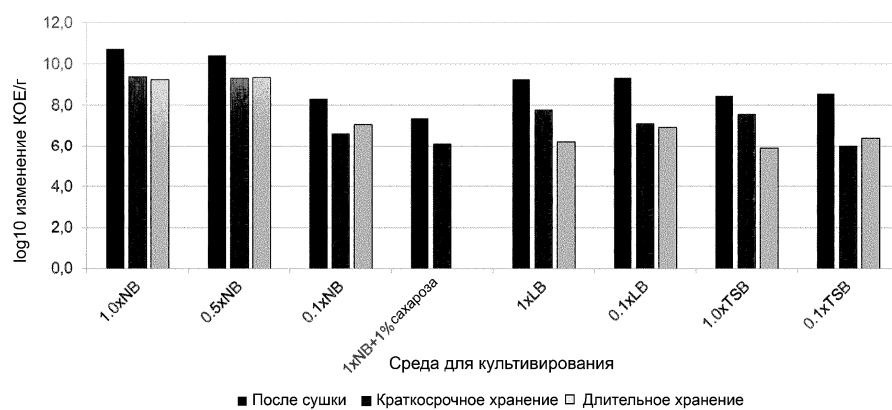
Фиг. 11



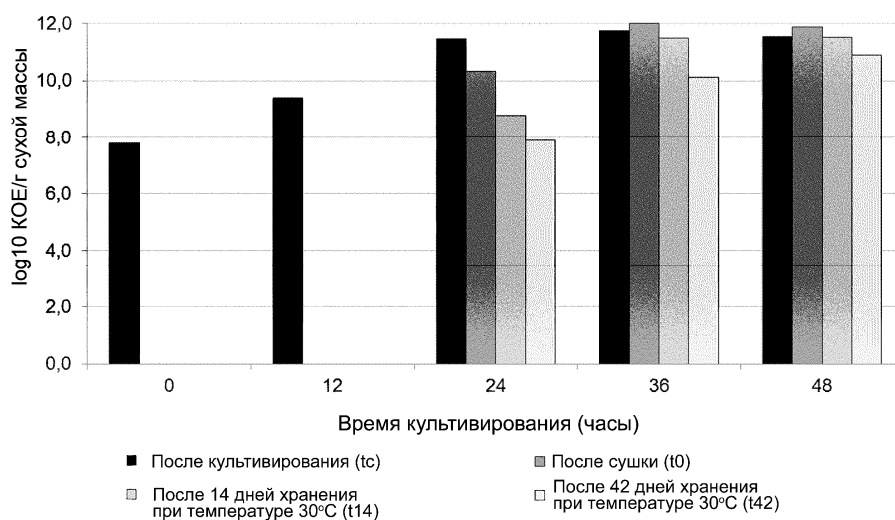
Фиг. 12А



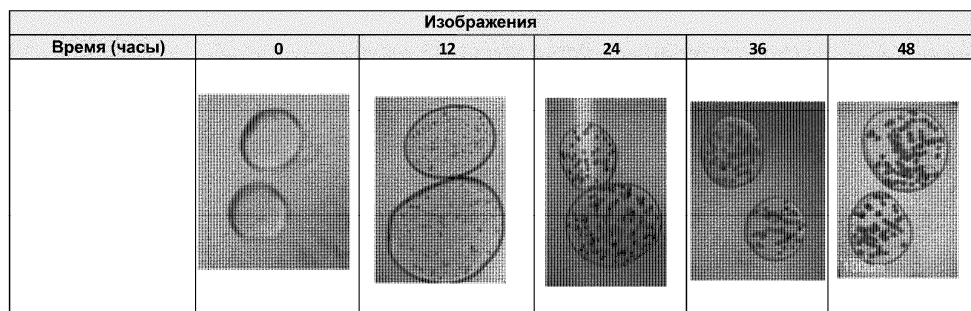
Фиг. 12В



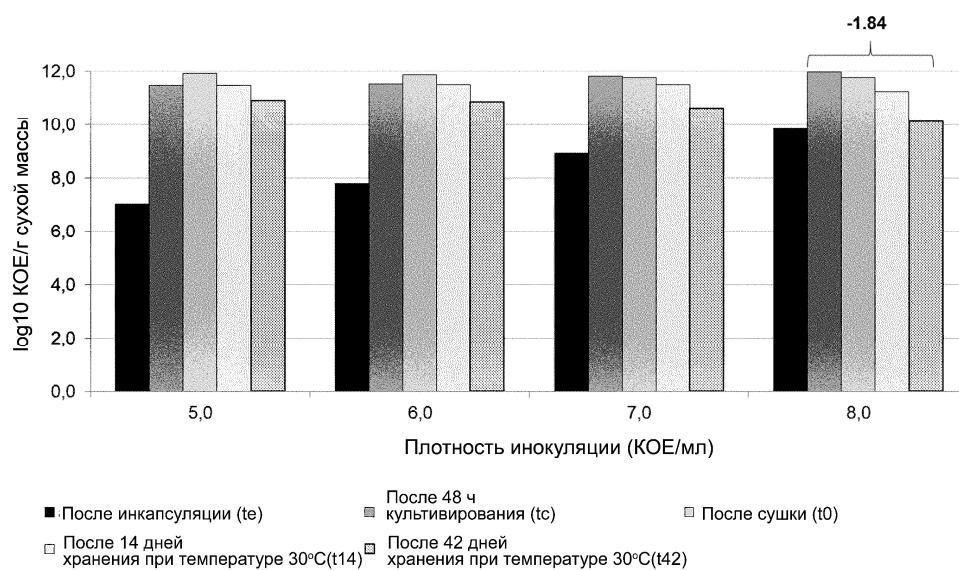
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

Изображения после 48 ч культивирования				
Плотность инокуляции (КОЕ/мл)	1.0E+5	1.0E+6	1.0E+7	1.0E+8

Фиг. 17



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2