

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045393**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.22

(21) Номер заявки
202090388

(22) Дата подачи заявки
2018.07.19

(51) Int. Cl. *A01N 63/00* (2006.01)
A61K 36/06 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(54) **ЭФФЕКТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ДРОЖЖЕЙ *Pichia* И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЗДОРОВЬЯ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ**

(31) **62/537,670; 62/563,992**

(32) **2017.07.27; 2017.09.27**

(33) **US**

(43) **2020.05.12**

(86) **PCT/US2018/042818**

(87) **WO 2019/023034 2019.01.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЛОКУС АГРИКАЛЧЕ АйПи
КОМПАНИ, ЛЛК (US)**

(72) Изобретатель:
**Фармер Шон, Алибек Кен, Зорнер
Пол С., Адамс Кент, Молдакожаев
Алибек, Мазумдер Шармиста,
Милованович Майя (US)**

(74) Представитель:
**Тагбергенова М.М., Тагбергенова А.Т.
(KZ)**

(56) US-A1-20100254957
US-A1-20130034883
US-A1-20040115171
US-A1-20070065540
US-A1-20160083705

(57) В изобретении предложены композиции на основе микроорганизмов, содержащие культивированные микроорганизмы и/или продукты их жизнедеятельности, а также способы и системы для получения и применения таких композиций. Более конкретно, заявленное изобретение относится к композициям на основе микроорганизмов, содержащим биологически чистые дрожжи, выбранные из клады *Pichia*, и/или продукты их жизнедеятельности, такие как био-ПАВ, ферменты и растворители. Также предложены способы применения этих композиций для повышения производительности в сельском хозяйстве, садоводстве, животноводстве и выращивании аквакультуры.

B1

045393

**045393
B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки на выдачу патента

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет предварительных заявок на выдачу патента США № 62/537670, поданной 27 июля 2017 г., и № 62/563,992, поданной 27 сентября 2017 г., каждая из которых включена в данное описание посредством ссылки в полном объеме.

Уровень техники изобретения

В сельском хозяйстве, садоводстве, животноводстве и промышленности аквакультуры некоторые распространенные проблемы препятствуют возможности фермеров увеличить получение урожая, сохраняя при этом низкий уровень расходов. Они включают инфекции и инвазии, вызванные бактериями, грибами и другими вредителями и патогенами; большие расходы на корм и химические удобрения, в том числе их влияние на окружающую среду и здоровье; и трудность растворения необходимых питательных веществ, в частности фосфата, с получением удобных для использования форм, но не ограничиваются ими.

В сельском хозяйстве и садоводстве фермеры полагались на использование синтетических химических веществ и химических удобрений для повышения урожайности и защиты сельскохозяйственных культур от патогенов, вредителей и болезней; однако при чрезмерном или неправильном применении эти вещества могут попадать в поверхностные воды, стекать в грунтовые воды и испаряются в воздух. Ответственное использование этих веществ как источников загрязнения воздуха и воды является важнейшей экологической и коммерческой задачей. Даже при правильном использовании чрезмерная зависимость и длительное применение некоторых химических удобрений и пестицидов приводят к пагубному изменению почвенных экосистем, снижают устойчивость к стрессу, увеличивают резистентность вредителей и затрудняют рост и жизнеспособность растений и животных.

Для животноводства и выращивания аквакультур стоимость кормления может быть значительной. Так, например, кормление популяции рыб, особенно в случае крупномасштабного разведения, составляет основную часть текущих затрат на получение аквакультуры. Корм для рыб должен содержать высокоусваиваемые источники белка наряду с полным набором других компонентов, необходимых для правильного питания, в том числе аминокислоты, углеводы, витамины, минералы, холестерин и незаменимые жирные кислоты. Традиционно, источники корма включали рыбную муку, полученную, например, из дикой или выращиваемой рыбы, например рыбную муку, смесь креветок и муку из кальмаров; однако из-за растущих расходов в фермерстве и производстве рыбы на приготовления традиционных кормов, полученных из рыбы и технического рыбьего жира, во многих хозяйствах по получению аквакультуры начали использовать корм на основе зерна для кормления рыб. В настоящее время для производства корма для рыбы используются такие ингредиенты, как кукуруза, соя, цельная пшеница и сорго. Воздействие на здоровье самих рыб диет на основе зерна окончательно не известно, но, тем не менее, вероятно может вызывать нежелательные последствия в перспективе.

Крупномасштабные животноводческие хозяйства, как правило, полагаются на кормовое зерно, такое как кукуруза и соевые бобы, для обеспечения необходимых углеводов, волокон и белка для оптимального роста животных. Эти пищевые продукты не являются оптимальными для животных, чьи желудки лучше всего приспособлены к перевариванию травы и других растений с высоким содержанием целлюлозы, и это может привести к ряду проблем. Например, животноводческим хозяйствам, опирающимся на корма на основе зерна, часто приходится полагаться на антибиотики для профилактики распространения болезни, так как неподходящая диета в сочетании с тесными условиями жизни высококонцентрированных кормовых хозяйств приводит к получению животных с ослабленной иммунной системой.

В дополнение к стоимости кормления и защиты как сельскохозяйственных культур, так и выращиваемых животных, недостаток питательных веществ, в частности дефицит фосфора, часто является постоянной проблемой этих отраслей. Фосфор в виде фосфатов необходим для биосинтеза генетического материала и АТФ, а также многих других функций для роста и жизнеспособности всех организмов. Для того, чтобы предотвратить или вылечить дефицит фосфора у растений, производители часто применяют фосфорсодержащие удобрения, как правило, в почву. Применение этих соединений в почве, однако, не гарантирует, что растение будет способно поглощать и использовать фосфор. Некоторые формы фосфора, такие как фитаты, являются нерастворимыми или иным образом не поддающимися абсорбированию корнями растения. Фитат служит хранилищем для фосфора, энергии, катионов и миоинозита (предшественника клеточной стенки), который остается в такой форме, которая не может быть использована растениями и нежвачными животными.

Для выращиваемых животных, таких как пасущиеся в районах, где почвы имеют низкое содержание растительного биодоступного фосфора, дефицит фосфора может привести к проблемам, включая бесплодие, снижение производство молока (например, у крупного рогатого скота), а также к неадекватной минерализации костей (например, у рыб, млекопитающих и птиц). Диетические добавки (например, с неорганическими кормовыми фосфатами) являются наиболее распространенным способом борьбы с этими проблемами, но могут быть дорогостоящими при использовании в больших масштабах.

Для удовлетворения глобальных потребностей в устойчивых способах получения продовольственных и потребительских продуктов микроорганизмы, такие как бактерии, дрожжи и грибы, а также их

продукты жизнедеятельности, становятся все более и более полезными во многих ситуациях, включая сельское хозяйство и садоводство, земледелие, лесное хозяйство и ремедиацию почв, вод и других природных ресурсов. Так, например, фермеры осваивают использование биологических агентов, таких как живые микроорганизмы, биопрепараты, полученные из них, и их комбинаций, в качестве биопестицидов и биоудобрений. Эти биологические агенты обладают важными преимуществами по сравнению с другими традиционными пестицидами и удобрениями, в том числе: 1) они являются менее вредными по сравнению с обычными химическими веществами; 2) они являются более эффективными и специфичными; 3) они часто быстро биоразлагаются, что приводит к меньшему загрязнению окружающей среды.

Экономические затраты производства продовольственных товаров в больших масштабах, а также неблагоприятное влияние на здоровье и окружающую среду существующих способов производства продолжают негативно влиять на экономическую целесообразность и попытки обеспечить растущее население мира продуктами питания.

Таким образом, существует постоянная потребность в улучшенных, нетоксичных и экологически чистых способах выращивания сельскохозяйственных культур, животноводства и выращивания рыб с низкой стоимостью. В частности, существует потребность в продуктах для лечения и профилактики распространения болезней и инвазий в сельском хозяйстве, животноводстве и выращивании аквакультуры; дополняющих почвы для повышения роста сельскохозяйственных культур и снижающих стоимость кормления скота и выращиваемых рыб, и все это без ущерба для здоровья и жизнеспособности сельскохозяйственных культур, животных и людей-потребителей.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложены микроорганизмы, а также продукты их жизнедеятельности, такие как био-ПАВ, метаболиты и/или ферменты. В настоящем изобретении также предложены способы применения этих микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, а также способы и системы для их получения. Преимущественно продукты на основе микроорганизмов и способы по настоящему изобретению являются экологически чистыми, безопасными для применения в хозяйстве и экономически эффективными.

В предпочтительных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены композиции на основе микроорганизмов, содержащие культивированные микроорганизмы и/или продукты их жизнедеятельности, а также способы получения таких композиций и способы их применения в сельском хозяйстве, садоводстве, животноводстве и выращивании аквакультуры. Как правило, композиции на основе микроорганизмов могут быть использованы для профилактики и/или лечения инфекции или инвазии у растений и животных; улучшения почвы и повышения роста сельскохозяйственных культур и/или повышения роста и улучшения здоровья скота и рыбы.

Более конкретно, композиции на основе микроорганизмов могут быть использованы для защиты растений, людей или животных путем борьбы с инфекциями, инвазиями и/или заболеваниями, вызванными болезнетворными одно- или многоклеточными организмами, в том числе грибами, бактериями, паразитами и нематодами, но не ограничиваясь ими; повышения урожайности и качества продукции; обогащения почвы; в качестве добавки к корму для скота и/или для добавки к корму для рыбы и водных животных. Способы такого применения также предусмотрены в данном документе.

В конкретных вариантах осуществления изобретения микроорганизм заявленной композиции на основе микроорганизмов представляет собой биологически чистые дрожжи, выбранные из клады *Pichia*, такие как, например, *P. anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*), *P. kudriavzevii* (*Wickerhamomyces kudriavzevii*), и/или *P. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), и/или их комбинации. Также предусмотрено включение других дрожжей клады *Pichia* или дрожжей, тесно связанных с ней (например, принадлежащих к тому же роду или семейству), и/или продуктов их жизнедеятельности.

Композиции на основе микроорганизмов заявленного изобретения могут быть получены посредством процессов культивирования, варьирующихся от маломасштабных до крупномасштабных. Указанные процессы культивирования включают глубинное культивирование, твердофазную ферментацию (SSF) и их комбинации, но не ограничиваются ими.

Дрожжи в композиции могут находиться в активной или неактивной форме. Кроме того, композиция также может содержать ферментационный бульон, полученный в результате культивирования дрожжей, который может включать, в частности, клеточные компоненты и продукты жизнедеятельности микроорганизмов, такие как био-ПАВ, метаболиты и/или ферменты. Преимущественно прямое использование композиции, т.е. без дальнейшей стабилизации, сохранения и хранения, сохраняет высокую жизнеспособность микроорганизмов, снижает возможность загрязнения посторонними агентами и нежелательными микроорганизмами и поддерживает активность продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

В некоторых вариантах осуществления композиция на основе микроорганизмов дополнительно содержит носитель. Носитель может представлять собой любой подходящий носитель, известный в данной области техники, который обеспечивает доставку дрожжей или продуктов жизнедеятельности дрожжей к целевым растениям, почве, животным, рыбам и т.д. таким образом, что продукт остается жизнеспособным, или, в случае неактивных дрожжей, сохраняет компоненты, необходимые для обеспечения эффек-

тивности.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит адъювант, способный повышать эффективность композиции. Так, например, фульвовая кислота, гуминовая кислота или гуamat могут выступать в качестве вспомогательных веществ, которые особенно пригодны в вариантах осуществления, описывающих композиции для улучшения почвы.

Композиция на основе микроорганизмов может быть составлена в виде, например, жидкой суспензии, эмульсии, лиофилизированного порошка или полученного распылительной сушкой, твердого вещества, гранул или геля.

В некоторых вариантах осуществления композиции заявленного изобретения имеют преимущества по сравнению, например, только с очищенными метаболитами микроорганизмов, например, из-за использования полной культуры микроорганизмов. Эти преимущества могут включать одно или несколько из следующих: высокие концентрации маннопротеина как части наружной поверхности клеточной стенки дрожжей; присутствие бета-глюкана в клеточных стенках дрожжей; наличие био-ПАВ в культуре и присутствие растворителей (например, молочной кислоты, этилацетата и т.д.) и других метаболитов (например, витаминов, минералов, углеводов и источников белка) в культуре. Эти преимущества присутствуют при использовании активных или неактивных дрожжей.

В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы, а также метаболиты и другие продукты жизнедеятельности микроорганизмов действуют синергетически друг с другом.

В одном варианте осуществления заявленное изобретение относится к способам получения продукта жизнедеятельности дрожжей *Pichia* путем культивирования штамма микроорганизма согласно заявленному изобретению в условиях, подходящих для роста и получения продуктов жизнедеятельности; и, необязательно, очистки продуктов жизнедеятельности. В некоторых вариантах осуществления продукт жизнедеятельности является не очищенным, но вместо этого используется в исходном виде, например, включающем ферментационный бульон, в котором он был получен. Примеры продуктов жизнедеятельности в соответствии с заявленным изобретением включают ферменты, кислоты, растворители, этанол, белки, аминокислоты, био-ПАВ и другие вещества. В конкретных вариантах осуществления предложены способы получения фермента фитазы.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам повышения производительности в промышленности, выбранной из сельского хозяйства, садоводства, животноводства и выращивания аквакультуры, в которой эффективное количество композиции на основе микроорганизмов по заявленному изобретению применяют к специальному или целевому участку, связанному с выбранной промышленностью. Участок применения будет зависеть от промышленности и может включать, например, растение и/или его окружающую среду или животное и/или его окружающую среду.

Применение заявленных способов может включать применение композиции на основе микроорганизмов непосредственно к растению, животному и/или их окружающей среде. Микроорганизмы могут быть живыми (или жизнеспособными) или неактивными во время применения.

В случае живых микроорганизмов микроорганизмы могут расти *in situ* на участке применения и продуцировать любые активные соединения или продукты жизнедеятельности на месте. Следовательно, высокая концентрация микроорганизмов и полезных продуктов жизнедеятельности может быть достигнута легко и непрерывно на участке обработки (например, SAFO или рыбоводческом хозяйстве).

С этой целью способы могут включать добавление материалов для повышения роста микроорганизмов во время применения (например, добавление питательных веществ для стимуляции роста микроорганизмов). В одном варианте осуществления источники питательных веществ могут включать, например, азот, нитрат, фосфор, магний и/или углерод.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают стадию культивирования композиции на основе микроорганизмов перед применением. Предпочтительно композицию на основе микроорганизмов культивируют на участке применения или около него, например, менее чем 100 миль от участка.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения и/или профилактики инфекции, инвазии и/или заболевания в сельском хозяйстве, садоводстве, животноводстве и/или хозяйстве по получению аквакультуры, в которых композицию на основе микроорганизмов по заявленному изобретению применяют к растению, животному и/или их окружающей среде. В некоторых вариантах осуществления композицию применяют непосредственно к организму или вредителю, который вызывает или вызвал инфекцию, инвазию и/или заболевание.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы для обогащения почвы, в которых композицию на основе микроорганизмов по заявленному изобретению применяют к почве. Предпочтительно способы могут повысить урожайность и улучшить качество сельскохозяйственных культур и продуктов, выращенных в почве. Кроме того, способы могут помочь в сохранении фосфата путем восстановления непригодного для использования фосфата, присутствующего в почве, и преобразования его в форму, легко поглощаемую растениями.

В некоторых вариантах осуществления заявленное изобретение обеспечивает дешевые материалы и способы для кормления скота и выращиваемых рыб с использованием заявленной композиции на основе

микроорганизмов. Композиция может быть использована в качестве высокопитательного источника дополнительного питания для скота, например, путем введения композиции в кормушки наряду с традиционным кормом для скота и употребления скотом композиции. Композиция на основе микроорганизмов может быть использована в качестве высокопитательного дополнительного источника питания для рыб, например, путем введения композиции в рыбоводный пруд или аквариум и употребления рыбой композиции. Предпочтительно настоящее изобретение может быть использовано для снижения стоимости кормления скота и выращиваемых рыб при одновременном повышении роста и улучшения здоровья животных, например, путем поддерживания их роста и их иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления заявленное изобретение предоставляет материалы и способы для лечения и/или профилактики дефицита питательных веществ у растений и/или животных. В случае дефицита питательных веществ у растения способы могут включать применение заявленных композиций на основе микроорганизмов к почве вокруг растения. В случае дефицита питательных веществ у животного способы могут включать применение заявленных композиций на основе микроорганизмов к корму и/или питьевой воде животного. В одном варианте осуществления дефицит питательных веществ представляет собой дефицит фосфора.

Преимущественно, настоящее изобретение может быть использовано без выделения больших количеств неорганических соединений в окружающую среду. Кроме того, в композициях и способах используются компоненты, которые являются биоразлагаемыми и токсикологически безопасными. Таким образом, настоящее изобретение может быть использовано для повышения производительности в сельском хозяйстве, садоводстве, животноводстве и/или рыбоводстве в качестве "зеленой" обработки.

Краткое описание графических материалов

На фигуре показан график, иллюстрирующий концентрации фосфата, используемые для определения активности *Pichia anomala* в отношении производства фитазы.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предложены композиции на основе микроорганизмов, содержащие культивированные микроорганизмы и/или продукты их жизнедеятельности, а также способы получения и применения таких композиций. Композиции на основе микроорганизмов могут быть использованы в сельском хозяйстве, садоводстве, животноводстве и выращивании аквакультуры, например, для профилактики и/или лечения инфекции или инвазии у растений и животных; улучшения почвы и повышения роста сельскохозяйственных культур и/или повышения роста и улучшения здоровья скота и рыбы.

В конкретных вариантах осуществления изобретения микроорганизм заявленной композиции на основе микроорганизмов представляет собой биологически чистые дрожжи, выбранные из клады *Pichia*, такие как, например, *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*), *Pichia kudriavzevii* (*Wickerhamomyces kudriavzevii*), и/или *Pichia guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), и/или их комбинации. Также предусмотрено включение других дрожжей клады *Pichia* или дрожжей, тесно связанных с ней (например, *P. occidentalis*), и/или продуктов их жизнедеятельности.

Заявленное изобретение также относится к способам повышения производительности в промышленности, выбранных из сельского хозяйства, садоводства, животноводства и выращивания аквакультуры, в которых способ включает применение композиции на основе микроорганизмов согласно заявленному изобретению к специальному участку, связанному с промышленностью. Например, участок применения может являться растением, животным и/или средой, окружающей растение или животное.

Выбранные определения.

Используемый в данном документе термин "композиция на основе микроорганизмов" означает композицию, которая содержит компоненты, которые были получены в результате жизнедеятельности микроорганизмов или других клеточных культур. Таким образом, композиция на основе микроорганизмов может содержать сами микроорганизмы и/или продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Микроорганизмы могут находиться в вегетативном состоянии, в форме спор, в форме мицелия, в любой другой форме пропагул микроорганизмов или их смеси. Микроорганизмы могут быть в форме планктона, или в форме биопленки, или в виде смеси обоих. Продуктами жизнедеятельности могут быть, например, метаболиты (например, био-ПАВ), компоненты клеточной мембраны, экспрессированные белки и/или другие клеточные компоненты. Микроорганизмы могут быть целыми или лизированными. Клетки могут полностью отсутствовать или присутствовать, например, в концентрации 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} или 1×10^{11} или более клеток или пропагул на 1 мл композиции.

Используемый в данном документе термин "пропагула" означает любую часть микроорганизма, из которой может развиваться новый и/или зрелый организм, включая клетки, конидии, цисты, споры (например, репродуктивные споры, эндоспоры и экзоспоры), мицелий, почки и семена, но не ограничиваясь ими.

В заявленном изобретении дополнительно предложены "продукты на основе микроорганизмов", которые представляют собой продукты, которые должны применяться на практике для достижения желаемого результата. Продукт на основе микроорганизмов может представлять собой просто композицию на основе микроорганизмов, собранную в процессе культивирования микроорганизмов. Альтернативно,

продукт на основе микроорганизмов может содержать дополнительные ингредиенты, которые были добавлены. Указанные дополнительные ингредиенты могут включать, например, стабилизаторы, буферы, подходящие носители (например, воду или растворы солей), добавленные питательные вещества для поддержки дальнейшей жизнедеятельности микроорганизмов, усилители роста, не являющиеся питательными веществами, и/или агенты, которые облегчают отслеживание микроорганизмов и/или композиции в среде, в которой они применяются. Продукт на основе микроорганизмов может также содержать смеси композиций на основе микроорганизмов. Продукт на основе микроорганизмов может также содержать один или несколько компонентов композиции на основе микроорганизмов, которые были обработаны каким-либо образом, таким как фильтрация, центрифугирование, лизирование, сушка, очистка и тому подобное, но не ограничиваясь ими.

Используемый в данном документе термин "собранный" относится к удалению части или всей композиции на основе микроорганизмов из емкости для выращивания.

Используемый в данном документе термин "изолированная" или "очищенная" молекула или соединение по существу не содержат других соединений, таких как клеточный материал, с которым они связаны в природном состоянии. Очищенный или выделенный полинуклеотид (рибонуклеиновая кислота (РНК) или дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)) не содержит генов или последовательностей, которые фланкируют его в своем естественном состоянии. Очищенный или выделенный полипептид не содержит аминокислот или последовательностей, которые его фланкируют в своем естественном состоянии.

Используемая в данном документе "биологически чистая культура" означает культуру, выделенную из материалов, с которыми она связана в природе. В предпочтительном варианте осуществления культура изолирована от всех других живых клеток. В других предпочтительных вариантах осуществления биологически чистая культура имеет преимущественные характеристики по сравнению с культурой того же микроорганизма, который существует в природе. Преимущественными характеристиками могут быть, например, повышение производства одного или более желаемых продуктов жизнедеятельности.

В определенных вариантах осуществления очищенные соединения составляют по меньшей мере 60 мас.% (сухой вес) представляющего интерес соединения. Предпочтительно препарат представляет собой по меньшей мере 75 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 90 мас.% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99 мас.% представляющего интерес соединения. Например, очищенное соединение представляет собой соединение, которое составляет по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 99 или 100 мас.% желаемого соединения по массе. Чистота измеряется любым подходящим стандартным методом, например колоночной хроматографией, тонкослойной хроматографией или высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ).

Термин "метаболит" относится к любому веществу, продуцируемому в процессе метаболизма (т.е. продукту жизнедеятельности), или веществу, необходимому для участия в определенном метаболическом процессе. Метаболит может представлять собой органическое соединение, которое является исходным веществом (например, глюкоза), промежуточным соединением (например, ацетил-КоА) или конечным продуктом (например, н-бутанол) метаболизма. Примеры метаболитов включают биополимеры, ферменты, кислоты, растворители, спирты, белки, витамины, минеральные вещества, микроэлементы, аминокислоты и био-ПАВ, но не ограничиваются ими.

Используемый в данном документе термин "модулировать" взаимозаменяем с термином "изменять" (например, увеличивать или снижать). Такие изменения обнаруживаются известными в уровне техники стандартными способами, такими как описанные в данном документе.

Представленные в данном документе диапазоны считаются условным обозначением для всех значений в указанном диапазоне. Например, под диапазоном от 1 до 20 понимают любое значение, комбинацию значений или поддиапазон из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, а также все промежуточные десятичные значения между вышеупомянутыми целыми числами, такие как, например, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и 1,9. Что касается поддиапазонов, специально предусмотрены "охваченные поддиапазоны", которые находятся в пределах любой конечной точки диапазона. Например, охваченный поддиапазон примерного диапазона от 1 до 50 может содержать от 1 до 10, от 1 до 20, от 1 до 30 и от 1 до 40 в одном направлении или от 50 до 40, от 50 до 30, от 50 до 20 и от 50 до 10 в другом направлении.

Используемый в данном документе термин "снижает" относится к отрицательному изменению, составляющему по меньшей мере 1, 5, 10, 25, 50, 75 или 100%.

Используемый в данном документе термин "референтный" относится к стандартному или контрольному значению.

Используемый в данном документе термин "ПАВ" относится к поверхностно-активному веществу, которое снижает поверхностное натяжение (или межфазное натяжение) между двумя жидкостями или между жидкостью и твердым веществом. ПАВ действуют как детергенты, смачивающие агенты, эмульгаторы, пенообразователи и диспергаторы. Термин "био-ПАВ" представляет собой ПАВ, продуцируемое живым организмом.

Используемый в данном документе термин "сельское хозяйство" означает выращивание и разведе-

ние растений и/или грибов для получения продуктов питания, волокон, биотоплива, лекарственных средств, косметических средств, пищевых добавок, декоративных целей и других видов использования. Согласно заявленному изобретению сельское хозяйство может также включать садоводство, ландшафтный дизайн, садоводство, сохранение растений, плодоводство и древоводство. Кроме того, сельское хозяйство согласно настоящему документу дополнительно включает почвоведение (например, педологию и эдафологию), а также агрономию или уход, мониторинг и управление почвой и получение сельскохозяйственных культур.

Используемый в данном документе термин "скот" относится к любому одомашненному животному, выращенному в сельскохозяйственных или промышленных условиях для производства сельхозтоваров, таких как продукты питания, волокна и рабочая сила. Термин "животноводство" включает разведение, выращивание, вскармливание, содержание, поддержание и/или забой этих животных. Скот может быть выращен в естественных условиях, например в открытом поле, на ферме или в кормовых хозяйствах для животных. Виды животных, охваченных термином скот, могут включать альпак, крупный рогатый и молочный скот, бизонов, свиней, овец, коз, лошадей, мулов, ослов, верблюдов, кур, индеек, уток, гусей, цесарок и сквобов, но не ограничиваются ими.

Используемое в настоящее документе "кормовое хозяйство для животных" или "AFO" относится к земельному участку или базе (не включая базу рыбоводства), где животных содержали, содержат или будут содержать или держать и кормить или поддерживать в течение в общей сложности 45 или более дней в течение любого 12-месячного периода и где сельскохозяйственные культуры, растительность, кормовые растения или остатки после сбора урожая не поддерживаются в нормальном вегетационном периоде в любой части базы. AFO в основном используют искусственные сооружения и оборудование (для кормления, создания температурного режима, хранения и использования навоза и т.д.), в месте выращивания и обработки.

Термин "CAFO" или "концентрированное AFO" представляет собой AFO, которое концентрирует большое количество животных в относительно небольших и ограниченных пространствах, размер которых отвечает определенным пороговым уровням, определенным Агентством по охране окружающей среды.

Используемые в данном документе термины "аквакультура", "выращивание аквакультур", "водное фермерство", "водное хозяйство" или "рыбоводство" означают разведение, выращивание и вылов водных животных в рыбоводческом хозяйстве. Выращивание аквакультуры может быть интенсивным (опираясь на технологии для разведения рыбы в искусственных загонах при высокой плотности) или экстенсивным (выполненное в океане или в естественных и искусственных озерах, заливах, фьордах рек или других водоемах). Выращивание аквакультуры включает производство морепродуктов из инкубаторов для рыб и моллюсков, которые выращиваются до товарного размера в загонах, прудах, резервуарах, аквариумах, клетках или каналах. Кроме того, выращивание аквакультуры включает морское фермерство, что влечет за собой выращивание морских организмов в открытой морской воде или закрытых участках с морской водой. Кроме того, выращивание аквакультуры включает восстановление количества или "прирост", при котором рыб и моллюсков из инкубатора выпускают в дикую природу в попытке восстановить популяции в дикой природе или прибрежной среде обитания. Более того, выращивание аквакультуры включает разведение декоративных рыб для продажи в аквариум, а также содержание декоративных рыб, размещенных в аквариумах. Виды, которые могут быть выращены, включают пресноводных или морских рыб и моллюсков, а также могут включать декоративных рыб, съедобных рыб, рыб для спорта, живца, ракообразных, моллюсков, водоросли, морские овощи или икру.

Используемый в данном описании термин "рыбоводческое хозяйство" представляет собой любую водную среду, где происходит или может происходить выращивание аквакультуры. Рыбоводческие хозяйства в соответствии с данным описанием могут включать все типы водных сред или участков водных сред, будь они искусственными или природными, в том числе пруды, ирригационные каналы, реки, озера, океаны, фьорды, резервуары, аквариумы, клетки или каналы.

Используемый в данном документе термин "вредитель" представляет собой любой организм, кроме человека, который является разрушительным, болезнетворным и/или вредным для человека или человеческих нужд (например, сельское хозяйство, садоводство, уход за скотом, выращивание аквакультуры). Вредители могут вызывать инфекции, инвазии и/или заболевание. Вредители могут быть одно- или многоклеточными организмами, в том числе вирусами, грибами, бактериями, паразитами и/или нематодами, но не ограничиваясь ими.

Используемый в данном документе термин "лечение" относится к эрадикации, снижению, облегчению, реверсированию или профилактике степени, проявления или симптома состояния или расстройства в любой степени и включает, но не требует, полное излечение состояния или расстройства. Лечение может представлять собой излечение, улучшение или частичное облегчение расстройства. Лечение может также включать профилактику состояния или расстройства, которое, как использовано в данном документе, означает задержку начала или прогрессирования конкретного проявления или симптома состояния или расстройства.

Композиции на основе микроорганизмов.

В заявленном изобретении предложены композиции на основе микроорганизмов, содержащие полезные микроорганизмы, а также продукты их жизнедеятельности, такие как био-ПАВ, метаболиты, кислоты, растворители и/или ферменты. В заявленном изобретении также предложены способы применения этих композиций для повышения производительности в сельском хозяйстве, садоводстве, животноводстве и выращивании аквакультуры. Кроме того, в заявленном изобретении предложены материалы и способы получения композиций на основе микроорганизмов.

Предпочтительно, чтобы композиции на основе микроорганизмов, полученные в соответствии с заявленным изобретением, были нетоксичными (например, токсичность при проглатывании составляет больше, чем 5 г/кг массы тела) и могли быть применены в высоких концентрациях, не вызывая раздражения, например, кожи или желудочно-кишечного тракта человека или животного. Таким образом, заявленное изобретение особенно пригодно, когда применение композиций на основе микроорганизмов происходит в присутствии живых организмов, таких как скот и рыбы, производимых людьми и для потребления человеком.

В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы по заявленному изобретению являются биологически чистыми дрожжами-киллерами. В частности, в заявленном изобретении используют дрожжи-киллеры, принадлежащие к роду *Pichia*. Еще более конкретно, в одном варианте осуществления микроорганизмы включают *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*), *Pichia guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), *Pichia kudriavzevii* (*Wickerhamomyces kudriavzevii*) и/или их комбинации.

Микроорганизмы и композиции на основе микроорганизмов по заявленному изобретению имеют ряд полезных свойств, которые являются пригодными для повышения производительности в сельском хозяйстве, садоводстве, животноводстве и выращивании аквакультуры. Например, в одном варианте осуществления композиция содержит био-ПАВ. Био-ПАВ могут присутствовать в композиции в результате роста микроорганизмов, присутствующих в композиции, или био-ПАВ могут быть получены отдельно от других микроорганизмов и добавлены к композиции в исходном виде и/или в очищенной форме. В качестве примера продукты жизнедеятельности микроорганизмов в исходном виде могут содержать ферментационный бульон, в котором они были получены.

Био-ПАВ ингибируют микробную адгезию к различным поверхностям, предотвращают образование биопленок и могут иметь мощные эмульгирующие и деэмульгирующие свойства. Кроме того, био-ПАВ способны снижать поверхностное и межфазное натяжение воды, например, в рыбоводческих хозяйствах и аквариумах.

В некоторых вариантах осуществления био-ПАВ заявленной композиции являются гликолипидными био-ПАВ, такими как липиды маннозилеритрита, софоролипиды, рамнолипиды или трегалозные липиды. Био-ПАВ также могут быть липопептидами, такими как сурфактин, итурин, фенгицин и лихенизин.

В конкретном варианте осуществления композиция содержит один или более гликолипидов, таких как липиды маннозилеритрита (MEL), которые в большом количестве продуцируют, например, дрожжи *Pseudozyma*, и софоролипиды (SLP), которые продуцируют, например, дрожжи *Starmerella* и дрожжи *Pichia*.

MEL и SLP демонстрируют превосходные свойства снижения поверхностного и межфазного натяжения, высокоэффективные эмульгирующие и деэмульгирующие свойства, а также разностороннее биохимическое и физиологическое воздействия посредством, например, их противогрибковых, антибактериальных, противопаразитарных и/или противовирусных свойств.

В некоторых вариантах осуществления концентрация одного или более био-ПАВ в композиции составляет от 0,001 до 90% по массе (мас.%), предпочтительно от 0,01 до 50 мас.% и более предпочтительно от 0,1 до 20 мас.%. Био-ПАВ могут дополнительно присутствовать в количестве около 0,01 до около 500 г/л, от около 0,5 до около 50,0 г/л, от около 1,0 до около 10,0 г/л или от около 2,0 до около 5,0 г/л.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит ферменты, образованные микроорганизмами. Эти ферменты могут присутствовать в композиции в результате роста микроорганизмов в ней или могут быть получены отдельно и добавлены в исходном виде и/или в очищенной форме в композицию. В качестве примера ферменты в исходном виде могут содержать ферментационный бульон, в котором они были получены.

В конкретном варианте осуществления композиция содержит фермент фитазу. Предпочтительно способы культивирования, описанные в данном документе, в дополнение к конкретной комбинации описанных видов дрожжей, работают синергически для получения фитазы в неожиданно высоких концентрациях и с неожиданной эффективностью.

В некоторых вариантах осуществления концентрация фитазы (или другого фермента) в композиции составляет от 0,001 до 90% по массе (мас.%), предпочтительно от 0,01 до 50 мас.% и более предпочтительно от 0,1 до 20 мас.%. Фитаза (или другой фермент) может дополнительно присутствовать в количестве от около 0,01 до около 500 г/л, от около 0,5 до около 50,0 г/л, от около 1,0 до около 10,0 г/л или от около 2,0 до около 5,0 г/л.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит дополнительные про-

дукты жизнедеятельности микроорганизмов в исходном виде или очищенной форме, такие как ферменты, био-ПАВ, растворители, кислоты, белки, минералы и/или витамины.

Метаболиты в исходном виде могут быть в форме, например, жидкой смеси, содержащей осадок метаболита в ферментационном бульоне, полученном в результате культивирования микроорганизма. Этот раствор в исходном виде может содержать от около 25 до около 75%, от около 30 до около 70%, от около 35 до около 65%, от около 40 до около 60%, от около 45 до около 55% или около 50% чистого метаболита.

В некоторых вариантах осуществления композиция на основе микроорганизмов по заявленному изобретению может содержать ферментационный бульон, содержащий живую и/или неактивную культуру и/или метаболиты микроорганизмов, продуцируемые микроорганизмом, и/или любые остаточные питательные вещества. Продукт ферментации может быть использован непосредственно без экстракции или очистки. При желании, экстракция и очистка могут быть легко достигнуты с использованием стандартных методов или методик экстракции и/или очистки, описанных в литературе.

Преимущественно в соответствии с заявленным изобретением композиция на основе микроорганизмов может содержать бульон, в котором были выращены микроорганизмы. Композиция может представлять собой, например, по меньшей мере 1, 5, 10, 25, 50, 75 или 100 мас.% бульона. Количество биомассы в композиции может составлять, например, от 0 до 100 мас.%, включая все процентные значения в диапазоне между ними.

Содержание биомассы в ферментационном бульоне может составлять, например, от 5 до 180 г/л или более. В одном варианте осуществления содержание твердых веществ в бульоне составляет от 10 до 150 г/л.

Ферментация микроорганизмами.

В заявленном изобретении используют способы культивирования микроорганизмов и получения метаболитов микроорганизмов и/или других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Более конкретно, в заявленном изобретении предложены материалы и методы для производства биомассы (например, жизнеспособного клеточного материала), внеклеточных метаболитов (например, небольших молекул и выделенных белков), остаточных питательных веществ и/или внутриклеточных компонентов (например, ферментов и других белков).

Настоящее изобретение дополнительно использует процессы культивирования, которые подходят для культивирования микроорганизмов и получения метаболитов микроорганизмов в любом желаемом масштабе, от маломасштабных (например, лабораторная установка) до крупномасштабных (например, промышленное применение). Указанные процессы культивирования включают глубинное культивирование/ферментацию, твердофазную ферментацию (SSF) и их комбинации, но не ограничиваются ими.

Используемый в данном документе термин "культивирование" относится к выращиванию клеток в контролируемых условиях. Культивирование может быть аэробным или анаэробным.

Емкость для выращивания микроорганизмов, используемый в соответствии с заявленным изобретением, может представлять собой любой ферментер или реактор для культивирования для промышленного использования. В одном варианте осуществления емкость может иметь функциональные элементы управления/датчики или может быть связана с функциональными элементами управления/датчиками для измерения важных факторов в процессе культивирования, таких как pH, кислород, давление, температура, мощность на валу мешалки, влажность, вязкость и/или плотность микроорганизмов и/или концентрация метаболитов.

Емкость также может быть способна контролировать рост микроорганизмов внутри емкости (например, измерение количества клеток и фаз роста). Альтернативно, суточный образец может быть взят из емкости и подвергнут подсчету методами, известными в данной области техники, такими как посев методом разведения.

В предпочтительных вариантах осуществления установка для выращивания микроорганизмов, содержащая множество емкостей для выращивания микроорганизмов, продуцирует новые микроорганизмы с высокой плотностью и/или продукты жизнедеятельности микроорганизмов, представляющие интерес, в желаемом масштабе. Установка для выращивания микроорганизмов может быть расположена в месте применения или рядом с ним. Установка производит композиции на основе микроорганизмов с высокой плотностью при периодическом, полунепрерывном или непрерывном культивировании.

Распределенные установки для выращивания микроорганизмов могут быть расположены в месте, где будет использоваться продукт на основе микроорганизмов (например, в поле или рыбноводческом хозяйстве). Например, средство для выращивания микроорганизмов может находиться менее чем в 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3 или 1 миле от места использования или могут быть расположены непосредственно на месте использования.

В некоторых вариантах осуществления производство может или не может быть достигнуто с помощью местных и/или распределенных способов ферментации, а это означает, что обычные способы также могут быть использованы в соответствии с заявленным изобретением. Преимущественно местные и/или распределенные установки для выращивания микроорганизмов обеспечивают решение текущей проблемы, заключающейся в том, чтобы полагаться на крупных промышленных производителей, чье качество

продукции страдает из-за задержек в процессе переработки, затруднений в цепочке поставок, неправильного хранения и других непредвиденных обстоятельств, которые препятствуют своевременной доставке и применению полезного продукта.

Установки для выращивания микроорганизмов производят новые композиции на основе микроорганизмов, содержащие сами микроорганизмы, метаболиты микроорганизмов и/или другие компоненты бульона, в котором выращиваются микроорганизмы. При желании, композиции могут иметь высокую плотность вегетативных клеток, неактивных клеток, пропагул или смесь вегетативных клеток, неактивных клеток и/или пропагул.

Преимущественно композиции могут быть адаптированы для использования в указанном месте. В одном варианте осуществления установка для выращивания микроорганизмов расположена на участке, где будут использоваться продукты на основе микроорганизмов, или вблизи него. Установки для выращивания микроорганизмов могут работать без подключения к сети с использованием, например, солнечной, ветровой и/или гидроэлектрической энергии.

Установки для выращивания микроорганизмов обеспечивают универсальность производства за счет способности адаптировать продукты на основе микроорганизмов для улучшения взаимодействия с географическими регионами назначения. Например, системы по заявленному изобретению способны использовать возможности природных микроорганизмов и их продуктов метаболизма. Местные микроорганизмы могут быть идентифицированы на основании, например, солеустойчивости, способности расти при высоких температурах и/или способности продуцировать определенные метаболиты.

Поскольку продукт на основе микроорганизмов образуется на месте или вблизи места применения, без необходимости стабилизации, консервации, длительного хранения и обширных процессов транспортировки, характерных для обычного производства, может быть получена гораздо более высокая плотность живых (или неактивных) микроорганизмов, что требует гораздо меньший объем продукта на основе микроорганизмов для использования на месте применения или обеспечивает гораздо более высокую плотность применения микроорганизмов, где это необходимо. Это снижает возможность загрязнения посторонними агентами и нежелательными микроорганизмами, поддерживает активность продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, а также позволяет эффективно использовать уменьшенный биореактор (например, меньший резервуар для ферментации и меньший объем исходного материала, питательных веществ, агентов для регулирования pH и пеногасителей и т.д.) без необходимости стабилизировать клетки. Произведенные локально высокоплотные и устойчивые культуры микроорганизмов более эффективны в полевых условиях, чем те, которые подверглись стабилизации вегетативных клеток или некоторое время находились в цепочке поставок.

Местное получение продукта на основе микроорганизмов также способствует включению в продукт ферментационного бульона. Бульон может содержать агенты, образующиеся во время ферментации, которые особенно хорошо подходят для местного применения. Это дополнительно облегчает портативность продукта.

Сокращение сроков транспортировки позволяет производить и доставлять новые партии микроорганизмов и/или их метаболитов в определенное время и в объеме, как этого требует местный спрос. Местное производство и доставка в течение, например, 24 ч после ферментации обеспечивает чистые композиции с высокой плотностью клеток и существенно снижает стоимость доставки. Учитывая перспективы быстрого продвижения в разработке более эффективных и мощных микроорганизмов для инокуляции, потребители получают большую выгоду от этой способности быстро доставлять продукты на основе микроорганизмов.

В одном варианте осуществления способ культивирования, выполняемый с использованием обычных способов или с использованием местных или распределенных систем, использует культуральную среду, содержащую мелласу, мочевины и пептон.

В одном варианте осуществления концентрация мелассы составляет от 2 до 6%, предпочтительно 4%. В одном варианте осуществления концентрация мочевины составляет от 0,01 до 1,0%, предпочтительно 0,2%. В одном варианте осуществления концентрация пептона составляет от 1,0 до 5%, предпочтительно 2,5%.

В одном варианте осуществления способ включает дополнение культивирования источником азота. Источником азота может быть, например, нитрат калия, нитрат аммония, сульфат аммония, фосфат аммония, аммиак, мочевина и/или хлорид аммония. Указанные источники азота могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

Способ культивирования может обеспечивать оксигенацию растущей культуры. В одном варианте осуществления используется медленное движение воздуха для удаления воздуха с низким содержанием кислорода и введения насыщенного кислородом воздуха. Насыщенный кислородом воздух может быть воздухом окружающей среды, ежедневно пополняемым через механизмы, включающие турбинные мешалки для механического перемешивания жидкости и распределители воздуха для подачи пузырьков газа в жидкость для растворения кислорода в жидкости.

Способ может дополнительно включать дополнение культивирования источником углерода. Источником углерода обычно является углевод, такой как глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, трегалоза,

манноза, маннит и/или мальтоза; органические кислоты, такие как уксусная кислота, fumarовая кислота, лимонная кислота, пропионовая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота и/или пировиноградная кислота; спирты, такие как этанол, изопропил, пропанол, бутанол, пентанол, гексанол, изобутанол и/или глицерин; жиры и масла, такие как соевое масло, масло рисовых отрубей, оливковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и/или льняное масло. Указанные источники углерода могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

В одном варианте осуществления в питательную среду включены факторы роста и микроэлементы для микроорганизмов. Это особенно предпочтительно при культивировании микроорганизмов, которые не способны вырабатывать все необходимые им витамины. Неорганические питательные вещества, включая микроэлементы, такие как железо, цинк, медь, марганец, молибден и/или кобальт, также могут быть включены в питательную среду. Кроме того, источники витаминов, незаменимых аминокислот и микроэлементов могут быть включены, например, в форме муки или муки крупного помола, таких как кукурузная мука, или в форме экстрактов, таких как дрожжевой экстракт, экстракт картофеля, экстракт говядины, экстракт соевых бобов, экстракт банановой кожуры и тому подобное или в очищенных формах. Аминокислоты, такие как, например, те, которые нужны для биосинтеза белков, например L-аланин, также могут быть включены.

В одном варианте осуществления также могут быть включены неорганические соли. Пригодными неорганическими солями могут быть дигидрофосфат калия, гидрофосфат дикалия, гидрофосфат натрия, сульфат магния, хлорид магния, сульфат железа, хлорид железа, сульфат марганца, хлорид марганца, сульфат цинка, хлорид свинца, сульфат меди, хлорид кальция, карбонат кальция и/или карбонат натрия. Указанные неорганические соли могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

В некоторых вариантах осуществления способ культивирования может дополнительно включать добавление дополнительных кислот и/или противомикробных препаратов в жидкую питательную среду перед и/или во время процесса культивирования. Противомикробные агенты или антибиотики могут использоваться для защиты культуры от загрязнения. Например, в питательную среду могут быть добавлены *Streptomyces erythromycin*, хмель или хмелевая кислота и/или небольшие количества, например 50-100 ч./млн, софоролипидов или других био-ПАВ в качестве противобактериальных агентов. Кроме того, когда во время культивирования образуется газ, могут быть добавлены пеногасители для профилактики образования и/или накопления пены.

Значение pH смеси должно соответствовать интересующему микроорганизму. Буферы и регуляторы pH, такие как карбонаты и фосфаты, могут быть использованы для стабилизации pH в пределах предпочтительного значения. Контроль pH также может быть использован для профилактики загрязнения культуры. Например, культивирование может быть инициировано при низком значении pH, которое подходит для роста дрожжей (например, 3,0-3,5), а затем после накопления дрожжей увеличено (например, до 4,5-5,0) и стабилизировано в течение оставшегося периода ферментации. Когда ионы металлов присутствуют в высоких концентрациях, может потребоваться использование хелатирующего агента в жидкой питательной среде.

Микроорганизмы могут быть выращены в планктонной форме или в виде биопленки. В случае биопленки в емкости может быть субстрат, на котором можно выращивать микроорганизмы в состоянии биопленки. Система также может иметь, например, возможность применять стимулы (такие как механическое раздражение), которые стимулируют и/или улучшают характеристики роста биопленки.

В одном варианте осуществления способ культивирования микроорганизмов осуществляют при температуре от примерно 5 до примерно 100°C, предпочтительно от 15 до 60°C, более предпочтительно от 25 до 50°C. В дополнительном варианте осуществления культивирование может проводиться непрерывно при постоянной температуре. В другом варианте культивирование может подвергаться изменению температуры.

В одном варианте осуществления оборудование, используемое в способе и процессе культивирования, является стерильным. Оборудование для культивирования, такое как реактор/емкость, может быть отделенным от стерилизационного устройства, например от автоклава, но подключено к нему. Оборудование для культивирования также может иметь стерилизационный блок, который стерилизует *in situ* перед началом инокуляции. Воздух можно стерилизовать способами, известными в данной области техники. Например, окружающий воздух может проходить по меньшей мере через один фильтр, прежде чем попадет в емкость. В других вариантах осуществления питательная среда может быть пастеризована или, необязательно, вообще не нагреваться, причем может быть использована низкая активность воды и низкое значение pH для борьбы с ростом бактерий.

В других вариантах осуществления система для культивирования может быть самостоятельно стерилизуемой, т.е. культивируемый организм способен предотвращать загрязнение другими организмами в результате производства противомикробных продуктов жизнедеятельности или метаболитов.

В одном варианте осуществления ПАВ, ферменты, метаболиты и/или другие белки получают путем культивирования штамма микроорганизма по заявленному изобретению в условиях, подходящих для роста и их получения; и, необязательно, очистки ПАВ, фермента, метаболита или другого белка. Любой

из полезных продуктов жизнедеятельности, которые, как известно, получают с помощью дрожжей *Pichia*, может быть получен и очищен в соответствии с заявленным изобретением. Они включают био-ПАВ, ферменты, такие как экзо- β -1,3-глюканаза, хитиназы и фитаза, растворители, белки, липиды, источники углерода, а также минералы и витамины, такие как витамины B1, B2, B3 (PP), B5, B7 (H), B6 и E, но не ограничиваются ими.

Продукт жизнедеятельности микроорганизмов, продуцируемый микроорганизмами, которые представляют интерес, может удерживаться в микроорганизмах или секретироваться в ростовую среду. В другом варианте осуществления способ получения продукта жизнедеятельности микроорганизмов может дополнительно включать стадии концентрирования и очистки продукта жизнедеятельности микроорганизмов, представляющего интерес. В дополнительном варианте осуществления ростовая среда может содержать соединения, которые стабилизируют активность продукта жизнедеятельности микроорганизмов.

Содержание биомассы в ферментационном бульоне может составлять, например, от 5 до 180 г/л или более. В одном варианте осуществления содержание твердых веществ в бульоне составляет от 10 до 150 г/л.

Когда пришло время собирать продукт на основе микроорганизмов из емкости или емкостей для выращивания, микроорганизмы и/или бульон, полученный в результате роста микроорганизмов, могут быть удалены из емкости для выращивания и перенесены, например, через трубопровод для немедленного использования. Эти микроорганизмы могут быть в активной или неактивной форме или могут содержать комбинацию активных и неактивных микроорганизмов.

Композиция (микроорганизмы, бульон или микроорганизмы и бульон) может быть также помещена в контейнеры соответствующего размера, принимая во внимание, например, предполагаемое использование, предполагаемый способ применения, размер ферментационной емкости и любой способ транспортировки от установки для выращивания микроорганизма до места использования. Таким образом, контейнеры, в которые помещена композиция на основе микроорганизмов, могут иметь объем, например, от 1 до 1000 галлонов или более. В определенных вариантах осуществления контейнеры имеют объем 2, 5, 25 галлонов или больше.

Другие компоненты могут быть добавлены, когда собранный продукт помещают в контейнеры и/или доставляют по трубам (или иным образом транспортируют для использования). Добавками могут быть, например, буферы, носители, другие композиции на основе микроорганизмов, производимые в той же или другой установке, модификаторы вязкости, консерванты, питательные вещества для роста микроорганизмов, отслеживающие агенты, пестициды и другие ингредиенты, специфичные для предполагаемого использования.

В одном варианте осуществления всю культуральную композицию микроорганизмов удаляют по завершении культивирования (например, после достижения желаемой плотности клеток или плотности указанного метаболита в бульоне). В указанном периодическом режиме культивирования начинают выращивать совершенно новую партию после получения первой партии.

В другом варианте осуществления только часть продукта ферментации удаляется за один раз. В этом варианте осуществления биомасса с жизнеспособными клетками остается в сосуде в качестве инокулянта для новой партии культивирования. Композиция, которая удаляется, может представлять собой бульон, не содержащий клеток, или может содержать клетки. Таким образом, создают полунепрерывную систему.

Приготовление продуктов на основе микроорганизмов.

Одним из продуктов на основе микроорганизмов по заявленному изобретению является просто ферментационный бульон, содержащий микроорганизм и/или метаболиты микроорганизмов, продуцируемые микроорганизмом, и/или любые остаточные питательные вещества. Продукт ферментации может быть использован непосредственно без экстракции или очистки. При желании, экстракция и очистка могут быть легко достигнуты с использованием стандартных методов или методик экстракции и/или очистки, описанных в литературе.

Микроорганизмы в продукте на основе микроорганизмов могут находиться в активной или неактивной форме. Продукты на основе микроорганизмов могут содержать комбинации активных и неактивных микроорганизмов.

Продукты на основе микроорганизмов могут использоваться без дальнейшей стабилизации, консервации и хранения. Преимущественно, прямое использование этих продуктов на основе микроорганизмов сохраняет высокую жизнеспособность микроорганизмов, уменьшает возможность загрязнения посторонними агентами и нежелательными микроорганизмами и поддерживает активность продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Микроорганизмы и/или бульон, полученный в результате роста микроорганизмов, могут быть удалены из емкости для выращивания и перенесены, например, через трубопровод для немедленного использования. В других вариантах осуществления, как описано выше, композиция (микроорганизмы, бульон или микроорганизмы и бульон) может быть помещена в контейнеры соответствующего размера.

После сбора композиции на основе микроорганизмов из емкости для выращивания дополнительные

компоненты могут быть добавлены, когда собранный продукт помещают в контейнеры и/или доставляют по трубам (или иным образом транспортируют для использования). Добавки могут представлять собой, например, буферные агенты, носители, адьюванты, другие композиции на основе микроорганизмов, полученные на той же или другой установке, модификаторы вязкости, консерванты, питательные вещества для роста микроорганизмов, агенты для отслеживания, биоциды, другие микроорганизмы, небактериальные ПАВ, эмульгаторы, смазывающие вещества, буферные агенты, регуляторы растворимости, регуляторы pH, стабилизаторы, устойчивые к ультрафиолету агенты и другие ингредиенты, специфичные для предполагаемого использования.

В одном варианте осуществления композиция может дополнительно содержать буферные агенты, включая органические кислоты и аминокислоты или их соли для стабилизации pH около предпочтительного значения. Значение pH композиции на основе микроорганизмов должно соответствовать интересующему микроорганизму.

Подходящие буферы включают цитрат, глюконат, тартрат, малат, ацетат, лактат, оксалат, аспарат, малонат, глюкогептонат, пируват, галактарат, глюкарат, тартронат, глутамат, глицин, лизин, глутамин, метионин, цистеин, аргинин и их смеси, но не ограничиваются ими. Фосфорная и фосфористая кислоты или их соли также могут быть использованы. Синтетические буферы пригодны для использования, но предпочтительно использовать природные буферы, такие как органические кислоты и аминокислоты или их соли.

В дополнительном варианте осуществления регуляторы pH включают гидроксид калия, гидроксид аммония, карбонат или бикарбонат калия, соляную кислоту, азотную кислоту, серную кислоту или их смеси.

В одном варианте осуществления в композицию на основе микроорганизмов могут быть включены дополнительные компоненты, такие как водный препарат соли, такой как бикарбонат или карбонат натрия, сульфат натрия, фосфат натрия или бифосфат натрия.

Преимущественно продукт на основе микроорганизмов может содержать бульон, в котором были выращены микроорганизмы. Продукт может представлять собой, например, по меньшей мере 1, 5, 10, 25, 50, 75 или 100 мас.% бульона. Количество биомассы в продукте может составлять, например, от 0 до 100 мас.%, включая все процентные значения в диапазоне между ними.

В некоторых вариантах осуществления композиция на основе микроорганизмов согласно заявленному изобретению дополнительно содержит носитель. Носитель может представлять собой любой подходящий носитель, известный в данной области техники, который обеспечивает доставку дрожжей или продуктов жизнедеятельности дрожжей к целевым растениям, почве, животным, рыбам и т.д. таким образом, что продукт остается жизнеспособным, или, в случае неактивных дрожжей, сохраняет компоненты, необходимые для обеспечения эффективности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в частности в контексте сельского хозяйства, композиция на основе микроорганизмов может дополнительно содержать адьювант для повышения эффективности композиции. В одном варианте осуществления адьювант выбирают из одного или более из фульвовых кислот, гуминовых кислот или гумата.

По желанию, композиция может храниться до использования. Время хранения предпочтительно короткое. Так, время хранения может составлять менее 60, 45, 30, 20, 15, 10, 7, 5, 3, 2, 1 дня или 12 ч. В предпочтительном варианте осуществления, если в продукте присутствуют живые клетки, продукт хранят при прохладной температуре, такой как, например, менее 20, 15, 10 или 5°C. С другой стороны, композицию био-ПВА обычно можно хранить при температуре окружающей среды.

В некоторых вариантах осуществления композиции заявленного изобретения имеют преимущества по сравнению, например, только с очищенными метаболитами микроорганизмов, из-за, например, использования полной культуры микроорганизмов. Эти преимущества могут включать одно или несколько из следующих: высокие концентрации маннопротеина как части наружной поверхности клеточной стенки дрожжей; присутствие бета-глюкана в клеточных стенках дрожжей; наличие био-ПАВ в культуре; и присутствие растворителей и других метаболитов (например, молочной кислоты, этанола, этилацетата и т.д.) в культуре. Эти преимущества присутствуют при использовании активных или неактивных дрожжей.

Композиция на основе микроорганизмов может быть составлена как продукт на основе микроорганизмов в виде, например, жидкой суспензии, эмульсии, лиофилизированного порошка или полученного распылительной сушкой, гранул, твердого вещества или геля.

Другие составы, которые предусмотрены как подходящие для конкретного применения.

В одном варианте осуществления, в частности для использования в применениях для скота, продукт на основе микроорганизмов может быть составлен в виде кормового брикета, содержащего однородные концентрации желаемого микроорганизма или продукта жизнедеятельности микроорганизма, например очищенной фитазы, в брикете. Способы, известные в данной области техники для получения кормовых брикетов, могут быть использованы для их производства, включая измельчение под давлением. Предпочтительно процесс получения брикетов является "холодным" гранулированием или процессом, который не использует высокую температуру или пар.

В одном варианте осуществления, в частности для использования для применений в водных хозяйствах, штаммы микроорганизмов культивируют с целью получения неактивной композиции на основе микроорганизмов. Композицию получают путем культивирования желаемого микроорганизма, разрушая микроорганизм с помощью микрофлюидизатора (или любым другим способом, известным в данной области техники, чтобы не вызывать денатурации белка), пастеризуют и добавляют к продукту питания в концентрированной форме. В одном варианте осуществления инактивация происходит при температуре пастеризации (от 65 до 70°C в течение периода времени, достаточного для инактивации 100% клеток дрожжей) и увеличение значения pH до около 10,0. Это вызывает частичный гидролиз клеток и позволяет освободить некоторые питательные компоненты. Затем композицию нейтрализуют до pH около 7,0-7,5 и смешивают различные компоненты гидролиза. Полученный в результате продукт на основе микроорганизмов может быть затем использован, например, в корм рыбы и для обработки воды в рыбноводческом хозяйстве.

Продукты на основе микроорганизмов по настоящему изобретению могут использоваться в различных уникальных условиях благодаря, например, способности эффективно доставлять 1) свежий ферментационный бульон с активными метаболитами; 2) смесь клеток и/или пропагул и ферментационного бульона; 3) композицию с высокой плотностью клеток, включая вегетативные клетки и/или пропагулы; 4) продукты на основе микроорганизмов, не требующие времени на их получение, и 5) продукты на основе микроорганизмов в удаленные места.

Продукты на основе микроорганизмов по настоящему изобретению особенно выгодны по сравнению с традиционными продуктами, в которых клетки были отделены от метаболитов и питательных веществ, присутствующих в ферментационной питательной среде.

Штаммы микроорганизмов, выращенные в соответствии с заявленным изобретением.

Микроорганизмами, выращенными в соответствии с системами и способами по настоящему изобретению, могут быть, например, бактерии, дрожжи и/или грибы. Эти микроорганизмы могут быть природными или генетически модифицированными микроорганизмами. Например, микроорганизмы могут быть трансформированы специфическими генами для проявления специфических характеристик. Микроорганизмы также могут быть мутантами желаемого штамма. Используемый в данном документе термин "мутант" означает штамм, генетический вариант или подтип эталонного микроорганизма, причем мутант имеет одну или несколько генетических вариаций (например, точечную мутацию, миссенс-мутацию, нонсенс-мутацию, делецию, дупликацию, мутацию со сдвигом рамки или экспансию повторов) по сравнению с эталонным микроорганизмом. Процедуры получения мутантов хорошо известны в области микробиологии. Например, УФ-мутагенез и нитрозогуанидин широко используются для этой цели.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления микроорганизм представляет собой любые дрожжи, известные как "дрожжи-киллеры". Используемый в данном документе термин "дрожжи-киллеры" означает штамм дрожжей, характеризующийся секрецией токсических белков или гликопротеинов, против которого сам штамм является невосприимчивым. Экзотоксины, выделяемые дрожжами-киллерами, способны убивать другие штаммы дрожжей, грибов или бактерий. Например, микроорганизмы, с которыми можно бороться дрожжами-киллерами, включают *Fusarium* и другие нитчатые грибы. Такие дрожжи могут включать *Wickerhamomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Ustilago Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluveromyces*, *Torulopsis*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces* и другие, но не ограничиваются ими.

В конкретном варианте осуществления в заявленном изобретении используют дрожжи-киллеры, принадлежащие к роду *Pichia*. Еще более конкретно, микроорганизмы по заявленному изобретению включают *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*), *Pichia guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), *Pichia kudriavzevii* (*Wickerhamomyces kudriavzevii*) и/или их комбинации. Эти три микроорганизма *Pichia* и их метаболиты и другие продукты жизнедеятельности (иногда обозначенные в данном документе как "ЗР" или "Triple-P") работают синергетически друг с другом с получением желаемых результатов при использовании для улучшения здоровья растений и животных, как описано в настоящем изобретении.

Эти дрожжи имеют ряд полезных характеристик, полезных для настоящего изобретения, в том числе их способность продуцировать полезные метаболиты. Например, *Pichia anomala* характеризуются экзо-β-1,3-глюканазной активностью, что делает их способными убивать или ингибировать рост широкого спектра патогенных грибов. Кроме того, при культивировании в течение 5-7 дней *Pichia anomala* продуцирует био-ПАВ, которые способны снижать поверхностное/межфазное натяжение воды, а также проявляют противомикробные и противогрибковые свойства.

Pichia kudriavzevii продуцируют метаболиты с противобактериальной активностью в отношении нескольких патогенов животных и человека, таких как *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas alcaligenes*. Более того, токсины, продуцируемые *P. kudriavzevii*, способны бороться со многими другими грамположительными и грамотрицательными бактериями, которые могут вызвать бактериальные заболевания у растений.

Штаммы *Pichia guilliermondii* продуцируют гидролитические ферменты, в том числе β-1,3-глюканазы и хитиназы. Эти ферменты, как известно, имеют нематоцидные (например, против

Meloidogyne incognita) и противогрибковые (например, против *V. cinerea*) свойства.

В дополнение к различным продуктам жизнедеятельности эти дрожжи способны продуцировать фитазу, фермент фосфатазу, которая катализирует гидролиз фитиновой кислоты (фитата или миоинозит гексакисфосфата). Фитиновая кислота представляет собой неперевариваемую органическую форму фосфора, который при гидролизе освобождает пригодную к употреблению форму неорганического фосфора.

Дополнительно, дрожжи *Pichia* являются продуцентами ряда белков (составляющих до 50% сухой биомассы клеток), липидов и источников углерода, а также полного спектра минералов и витаминов (B1; B2; B3 (PP); B5; B7 (H); B6; E).

В соответствии с заявленным изобретением также могут быть использованы другие штаммы микроорганизмов, в том числе, например, другие штаммы микроорганизмов, способных накапливать значительные количества, например, ферментов, кислот, белков, био-ПАВ, минералов и витаминов, которые являются полезными для повышения производительности в сельском хозяйстве, садоводстве, животноводстве и выращивании аквакультуры.

Способы повышения производительности в сельском хозяйстве, садоводстве, животноводстве и выращивании аквакультуры.

В некоторых вариантах осуществления в заявленном изобретении предложены экологически чистые, экономически эффективные материалы и способы для повышения производительности в сельском хозяйстве, садоводстве, животноводстве и/или выращивании аквакультуры. Более конкретно, в заявленном изобретении предложены способы улучшения здоровья и качества культивируемых растений, грибов и/или животных с использованием продуктов на основе микроорганизмов по заявленному изобретению. В одном варианте осуществления предложены способы для кормления скота и/или выращиваемых рыб.

Конкретно, заявленное изобретение относится к способам повышения производительности в промышленности, выбранной из сельского хозяйства, садоводства, животноводства и выращивания аквакультуры, в которой эффективное количество композиции на основе микроорганизмов по заявленному изобретению применяют к специальному или целевому участку, связанному с выбранной промышленностью. Участок применения будет зависеть от промышленности и может включать, например, растение и/или его окружающую среду или животное и/или его окружающую среду.

Используемые в данном документе термины "применение" композиции или продукта к цели или участку или "обработка" цели или участка относятся к приведению в контакт композиции или продукта с целью или участком таким образом, чтобы композиция или продукт могли оказать воздействие на эту цель или участок. Воздействие может быть обусловлено, например, ростом микроорганизмов и/или действием метаболита, фермента, био-ПАВ или другого продукта жизнедеятельности. Применение или обработка может включать применение композиции на основе микроорганизмов непосредственно к растению, грибам, животному и/или их окружающей среде.

Применение может дополнительно включать приведение в контакт композиции или продукта непосредственно с растением, частью растения и/или окружающей средой растения (например, почвой) или непосредственно с животным, частью тела животного и/или окружающей средой животного (например, источником пищи животного). Заявленный продукт на основе микроорганизмов, например, может быть распылен в виде жидкости или сухого порошка, пыли, гранул, микрогранул, твердого вещества, смачиваемого порошка, сыпучего порошка, эмульсий, микрокапсул, масел, гелей, паст или аэрозолей.

В одном варианте осуществления заявленное изобретение обеспечивает применение продуктов на основе микроорганизмов в поле в условиях сельского хозяйства и садоводства. Продукты на основе микроорганизмов по заявленному изобретению могут быть применены, например, через ирригационную систему, в виде спрея, в виде обработки семян, к поверхности почвы, к сельскохозяйственным культурам, к поверхностям растений или грибов и/или поверхностям вредителей. Механическое применение также облегчается с помощью обычного снаряжения, а роботизированное применение - с помощью воздушных или наземных "дронов". Любые части растения могут быть выбраны для обработки по заявленному изобретению, включая фрукты, цветы, луковицы, листья, зерно, корни, семена и/или стебли, но не ограничиваясь ими.

В одном варианте осуществления заявленное изобретение обеспечивает применение продуктов на основе микроорганизмов в поле в условиях животноводства. Продукты на основе микроорганизмов могут быть применены непосредственно к животным, например, в виде перорального, внутривенного, подкожного или местного лекарственного средства или добавки или добавлены в корм и/или воду для животных. Продукты на основе микроорганизмов также могут быть применены к среде обитания животных, например, в виде спрея или покрытия, к земле или поверхностям загонов или непосредственно к поверхностям вредителей.

В одном варианте осуществления заявленное изобретение обеспечивает применение продуктов на основе микроорганизмов в полевых условиях в животноводстве. Продукты на основе микроорганизмов могут быть применены к рыбоводческому хозяйству, например, путем закачивания, распыления, выливания или впрыскивания композиций в воду рыбоводческого хозяйства или, например, путем покрытия или распространения композиции на различные поверхности, стены или загоны рыбоводческого хозяй-

ства. Кроме того, композиции могут быть применены к животным как таковым, например, в виде источника пищи.

Микроорганизмы могут быть живыми (или жизнеспособными) или неактивными во время применения. В случае живых микроорганизмов микроорганизмы могут расти *in situ* на участке применения и продуцировать любые активные соединения или продукты жизнедеятельности на месте. Следовательно, высокая концентрация микроорганизмов и полезных продуктов жизнедеятельности может быть достигнута легко и непрерывно на участке обработки (например, САФО или рыбоводческом хозяйстве).

С этой целью способы могут включать добавление дополнительных материалов для усиления роста микроорганизмов во время применения (например, добавление питательных веществ для ускорения роста микроорганизмов). В одном варианте осуществления источники питательных веществ могут включать, например, азот, нитрат, фосфор, магний и/или углерод.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают культивирования композиции на основе микроорганизмов перед применением. Предпочтительно композицию на основе микроорганизмов культивируют на участке применения или около него, например, менее чем 100 миль от участка.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы для профилактики и/или лечения инфекции или инвазии, вызванных болезнетворными одно- или многоклеточными организмами; улучшения почвы и повышения роста сельскохозяйственных культур и/или повышения роста и улучшения здоровья скота и рыбы.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения и/или профилактики инфекции, инвазии, заболевания и/или их распространения. В конкретных вариантах осуществления болезнетворные инфекции, инвазии и/или заболевания, которые вызваны болезнетворными одно- или многоклеточными организмами, в том числе грибами, бактериями, паразитами и/или нематодами, но не ограничиваясь ими, которые являются болезнетворными для растений, грибов и/или сельскохозяйственных культур; скота и других наземных животных и/или рыбы и других водных организмов.

В одном варианте осуществления способ включает применение композиции на основе микроорганизмов, содержащей дрожжи *Pichia* и/или продукты их жизнедеятельности к участку, причем композиция убивает и/или конкурентно ингибирует рост болезнетворных грибов; убивает и/или конкурентно ингибирует рост болезнетворных грамположительных и грамотрицательных бактерий; убивает болезнетворные гельминтные паразиты и/или убивает болезнетворные нематоды. Комбинации этих дрожжей, каждая из которых имеют уникальные способности убивать, создают эффективный синергетический агент для биологической борьбы, например, в органическом сельском хозяйстве, органическом животноводстве и органических отраслях выращивания аквакультур.

Предпочтительно способы усиливают иммунную систему и/или защищают от патогенов растения, скот и выращиваемых рыб без использования агрессивных химических веществ или антибиотиков.

В конкретном варианте осуществления способ используется для повышения производительности в сельском хозяйстве путем профилактики и/или лечения инфекций, инвазий и/или заболеваний сельскохозяйственных культур, растений и/или грибов в условиях сельского хозяйства.

Примеры бактериальных инфекций, поражающих растения, против которых эффективно заявленное изобретение, включают *Pseudomonas syringae* pathovars; *Ralstonia solanacearum*; *Agrobacterium tumefaciens*; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; *Xanthomonas campestris* pathovars., *Xanthomonas axonopodis* pathovars; *Erwinia amylovora*; *Xylella fastidiosa*; *Dickeya* (*dadantii* и *solani*); *Pectobacterium carotovorum* (и *Pectobacterium atrosepticum*); *Clavibacter michiganensis* (*michiganensis* и *sepedonicus*), *Pseudomonas savastanoi* и *Candidatus Liberibacter asiaticus*, но не ограничиваются ими.

Примеры вирусных инфекций, поражающих растения, против которых эффективно заявленное изобретение, включают *Carlavirus*, *Abutilon*, *Hordeivirus*, *Potyvirus*, *Mastrevirus*, *Badnavirus*, *Reoviridae* *Fijivirus*, *Oryzavirus*, *Phytoreovirus*, *Mycroevirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Ipomovirus*, *Vymovirus*, *Cucumovirus*, *Luteovirus*, *Begomovirus*, *Rhabdoviridae*, *Tospovirus*, *Comovirus*, *Sobemovirus*, *Nepovirus*, *Tobravirus*, *Benyvirus*, *Furovirus*, *Pecluvirus* и *Pomovirus*, но не ограничиваются ими.

Нематоды также можно лечить с помощью заявленного изобретения. Примерами нематод являются образующие цисты нематоды родов *Heterodera* (например, *H. glycines*, *H. avenae* и *H. shachtii*) и *Globodera* (например, *G. rostochiensis* и *G. pallida*); нематоды щетинистых корнеплодов родов *Trichodorus*; стеблевые нематоды рода *Ditylenchus*; картофельная нематода *Heterodera rostochiensis*; корневые нематоды рода *Meloidogyne* (например, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. arenaria* и *M. incognita*); поражающие корень нематоды рода *Pratylenchus* (например, *P. goodeyi*, *P. penetrans*, *P. bractrvurus*, *P. zaeae*, *P. coffeae*, *P. bractrvurus* и *P. thornei*); цитрусовые нематоды рода *Tylenchulus* и жалящие нематоды рода *Belonolaimus*.

Другие болезни растений или сельскохозяйственных культур, против которых эффективны заявленные способы и композиции, включают вредителей и/или патогенные микроорганизмы, вызывающие прекращение роста, рак растений, гнили, увядание, ржавчину, антракноз, бактериальные пятна, килу, пузырчатую головню кукурузы, галлы, ризоктиниоз, ложную и настоящую мучнистую росу, паршу, пятнистость листьев, грибковую плесень, вирус мозаики, пузырчатость и скручивание листьев.

В другом варианте осуществления способ используется для повышения производительности в животноводстве путем профилактики и/или лечения инфекций, инвазий и/или заболеваний скота и других

наземных животных.

Примеры заболеваний, против которых являются эффективными заявленные способы и композиции, включают кандидоз, трихофитию, сложную респираторную инфекцию крупного рогатого скота, аскохитоз (кlostридиальный), респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота, вирусную диарею крупного рогатого скота, бактериоз, вызванный *Haemophilus Somnus*, инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота, заболевание, вызванное *Pasteurella Haemolytica* и *Pasteurella Multocida*, бешенство, оспу птиц, грипп, болезнь Ньюкасла, контагиозный катар верхних дыхательных путей, птичью холеру, колибактериоз, бактериоз, вызванный *Bordetella bronchiseptica*, аспергиллез, микоплазмоз, восточный энцефалит лошадей, ботулизм, геморрагический энтерит, бактериоз, вызванный *Salmonella*, язвенный или некротический энтерит, пуллорозную болезнь, тиф птиц, заболевание, вызванное *Coccidia*, червей (например, круглого гельминта, хлыстовика, почечного гельминта), угри, бактериоз, вызванный *Staphylococcus*, бактериоз, вызванный *Streptococcus*, парвовирус, лептоспироз и другие, но не ограничиваются ими.

В еще одном варианте осуществления способ используется для повышения производительности в выращивании аквакультуры путем профилактики и/или лечения инфекций, инвазий и/или заболеваний рыб и других водных и/или морских организмов в рыбоводческом хозяйстве. Предпочтительно, чтобы дрожжи композиции на основе микроорганизмов в соответствии с этим вариантом осуществления применялись к рыбоводческому хозяйству в неактивном состоянии.

Примеры патогенных микроорганизмов, против которых являются эффективными заявленные способы и композиции, включают вирусы (например, *Aquabirnavirus*, *Betanodavirus*, *Orthomyxovirus*, *Alphavirus*, *rhabdoviruses* и *Ranavirus*), бактерии (например, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Flavobacterium*, *Francisella*, *Photobacterium*, *Piscirickettsia*, *Pseudomonas*, *Tenacibaculum*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Lactococcus*, *Renibacterium* и *Streptococcus*), грибы (например, *Saprolegnia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Exophiala*, *Ichthyophonous*, *Branchiomyces*, *Dermocystidium*, *Prototheca*, *Oscillatoria*, *Phoma herbarum* и *Raecilomyces*), водяную плесень (например, *Saprolegnia* sp.) и паразиты (например, нематоды, ленточные черви, круглые гельминты, пиявки, тля, многоклеточные паразиты, такие как копеподы, одноклеточные паразиты, такие как *Ichthyophthirius multifiliis*, и гельминты, такие как *Eustrongylides*), но не ограничиваются ими.

Вирусные заболевания водных организмов, которые могут быть облегчены или предотвращены с использованием заявленного изобретения, включают инфекционный панкреатический некроз, вирус некроза нервной системы, вирус анемии лосося, заболевания поджелудочной железы, инфекционный некроз гемопоэтической ткани лососёвых, и вирус геморрагической септицемии, и эпизоотический некроз гемопоэтической ткани, но не ограничиваются ими.

Бактериальные заболевания водных организмов, которые могут быть смягчены или предотвращены с использованием заявленного изобретения, включают гниль плавников, водянку рыб, сепсис, вызванный подвижной аэромонадой, фурункулез, бактериозы, вызванные *Chryseobacterium*, кишечную септицемию сома, заболевание, вызванное *Edwardsiella* или вызывающее нагноение, столбиковую болезнь рыб, ложную столбиковую болезнь рыб, заболевание, вызванное *Flavobacteriia*, или заболевание мальков радужной форели, бактериальное заболевание жабр, заболевание, вызванное *Francisella*, зимнюю язвенную болезнь, заболевание, вызванное *Pasteurella*, заболевание, вызванное *Piscirickettsia* или риккетсиозную септицемию, септицемию, вызванную псевдомонадами, или краснуха карпов, заболевание, вызванное *Tenacibaculum maritimum*, заболевание, вызванное *Vibrio*, заболевание, вызванное *Yersinia* или кишечное заболевание "красный рот" лососёвых, заболевание, вызванное *Lactococcus garvieae*, заболевание, вызванное *Nocardia*, бактериальное заболевание почек, заболевание, вызванное *Staphylococcus*, заболевание, вызванное *Streptococcus*, и геморрагическую септицемию, но не ограничиваются ими. Другие заболевания или инвазии водных организмов, которые могут быть смягчены или предотвращены с использованием заявленного изобретения, включают жаберную гниль, заболевания, вызванные ихтиофонусом, сапролегниевыми, бархатную болезнь, эрозию головы и вертеж.

В дополнительных вариантах осуществления заявленного изобретения предложены способы для повышения производительности в сельском хозяйстве путем обогащения почвы, причем к почве применяют композиции на основе микроорганизмов по заявленному изобретению. С помощью применения композиции, содержащей одни или более культивированных дрожжей *Pichia* к почве и, необязательно, одного или более адъювантов, заявленные способы могут повысить урожайность и улучшить качество продукции и продуктов растительного происхождения, выращенных благодаря, например, присутствию полезных метаболитов микроорганизмов, таких как фитаза, аминокислоты, белки, витамины и микроэлементы. В конкретном варианте осуществления адъюванты представляют собой фульвовую кислоту, гуминовую кислоту или гумат.

Предпочтительно наличие фитазы позволяет лечить и/или предотвратить дефицит питательных веществ у растений. В частности, настоящее изобретение может быть использовано для лечения и/или профилактики дефицита фосфора в растениях при нанесении на почву вокруг растений.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение может быть использовано в сохранении фосфата. Когда фосфаты присутствуют в почве в нерастворимых формах, они остаются там,

непригодные для использования корневой системой растений. Путем добавления продукта Triple-P в почву фосфаты могут быть преобразованы в более растворимые формы, которые могут быть извлечены растениями.

Заявленное изобретение дополнительно предлагает дешевые материалы и способы для кормления скота с использованием заявленной композиции на основе микроорганизмов. В одном варианте осуществления композиция на основе микроорганизмов составлена с или применяется к корму животного и/или питьевой воде животного в качестве пищевой добавки.

Композиция на основе микроорганизмов может быть использована в качестве высокопитательного источника дополнительного питания для скота, например, путем введения композиции в кормушки наряду с традиционным кормом для скота и употребления скотом композиции. В одном варианте осуществления композиция может быть смешана с компонентами корма и составлена в однородные, гомогенизированные брикеты. В качестве пищевой добавки продукты на основе микроорганизмов могут обеспечить, среди прочих преимуществ, фитазу и дополнительные источники аминокислот, белков, витаминов и микроэлементов.

В некоторых вариантах осуществления композиция на основе микроорганизмов дополнительно может быть использована для лечения и/или профилактики дефицита питательных веществ в животноводстве. В частности, заявленное изобретение может быть использовано в качестве пищевой добавки для лечения и/или профилактики дефицита фосфора у скота, дополняя источник их корма фитазой.

Предпочтительно заявленное изобретение может быть использовано для снижения стоимости кормления скота при одновременном повышении роста и улучшения здоровья домашнего скота, например, путем поддержания их роста и их иммунной системы и обеспечения дополнительными источниками фосфора, аминокислот, белков, витаминов и других микроэлементов.

В других вариантах осуществления заявленное изобретение обеспечивает дешевые материалы и способы для кормления рыб с использованием заявленной композиции на основе микроорганизмов. Композиция на основе микроорганизмов может быть использована в качестве высокопитательной пищевой добавки для рыб, например, путем введения композиции в окружающую рыб среду и употребления рыбой композиции и/или корма. Композиция также может применяться к или комбинироваться со стандартным кормом для рыб и скармливаться выращиваемым рыбам. Предпочтительно заявленное изобретение может быть использовано для снижения стоимости кормления выращиваемых рыб.

В некоторых вариантах осуществления заявленное изобретение относится к способам повышения производительности при выращивании аквакультуры путем повышения поглощения питательных веществ выращиваемыми рыбами. В частности, при поглощении рыбой, био-ПАВ, которые продуцируются микроорганизмами по заявленному изобретению, способствуют повышению общего состояния здоровья и качества выращиваемых рыб путем повышения поглощения питательных веществ, в том числе жирорастворимых витаминов, внутри пищеварительного тракта рыбы.

Композиция может применяться к окружающей рыбу среде, такой как вода в рыбноводческом хозяйстве, в форме, например, жидкого раствора или в виде сухого порошка, муки, хлопьев или твердого вещества. Предпочтительно, чтобы у рыбы, которая поглощает заявленные композиции, происходило повышенное увеличение веса по сравнению с рыбой, которую кормят обычной рыбной мукой, причем в основном увеличение веса происходит в результате повышения процента белка в теле, что сопровождается более низким процентом жира в теле.

В другом варианте осуществления заявленное изобретение предлагает способы дополнения кормление рыб, а также способы снижения стоимости кормления рыб. Композиция на основе микроорганизмов по заявленному изобретению может применяться к окружающей рыбу среде в качестве единственного источника клеточного белка, содержащей неактивные клетки дрожжей, которые обеспечивают множество белков, углеводов, липидов, жирных кислот, аминокислот, витаминов и минералов в концентрированных количествах. В некоторых вариантах осуществления композиция на основе микроорганизмов может быть использована для лечения и/или профилактики дефицита питательных веществ у рыбы. В частности, заявленное изобретение может быть использовано в качестве пищевой добавки для лечения и/или профилактики дефицита фосфора у выращиваемых рыб, дополняя источник их корма фитазой.

Из-за растущих расходов на традиционные корма, полученные из рыбы и технического рыбьего жира, во многих хозяйствах по получению аквакультуры начали использовать корм на основе зерна для кормления рыб. В настоящее время для производства корма для рыбы используются такие ингредиенты, как кукуруза, соя и сорго. Воздействие на здоровье самих рыб диет на основе зерна окончательно не известно, но, тем не менее, вероятно может вызывать нежелательные последствия в перспективе.

Кроме того, успех, например, индустрии морепродуктов частично основан на привлекательных преимуществах для здоровья употребления человеком морепродуктов, таких как высокий уровень омега-3 жирных кислот. При переходе выращиваемых рыб от животной пищи или всеядности к строгой растительной диете содержание питательных веществ в конечном рыбном продукте может быть изменено, например, содержание жирных кислот в рыбных продуктах может быть снижено. Влияние такого изменения на индустрию морепродуктов, а также на питание человека может быть обширным.

Таким образом, действуя в качестве добавки к существующим кормам рыб, заявленное изобретение

может быть использовано для снижения растущих затрат при использовании традиционных кормов для рыбы на основе рыбы. Заявленное изобретение может снизить стоимость кормления рыб, обеспечивая при этом возвращение к традиционным кормам для рыб на основе рыбы, и все это без ущерба для здоровья и качества выращиваемых рыб.

Примеры

Более глубокое понимание настоящего изобретения и его многочисленных преимуществ можно получить из следующих примеров, приведенных в качестве иллюстрации. Следующие примеры иллюстрируют некоторые способы, применения, варианты осуществления и варианты настоящего изобретения. Они не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение. Многочисленные изменения и модификации могут быть сделаны в отношении изобретения.

Пример 1. Культивирование продукта дрожжей *Pichia* "Triple-P".

Предложены система и способ ферментации для использования в соответствии с заявленным изобретением для снижения затрат на культивирование дрожжей *Pichia*, а также создания недорогого и эффективного получения этих дрожжей в промышленных масштабах.

Производство Triple-P осуществляется с помощью культуры дрожжей с использованием нетрадиционных методов и при аэробных условиях, которые являются эффективными для стимулирования роста и продуцирования метаболита. Предпочтительно, чтобы каждый из штаммов *Pichia* культивировали отдельно, после чего полученные культуры смешивали с использованием механической мешалки с образованием продукта Triple-P.

Предпочтительно системы и способы по заявленному изобретению являются недорогими для производства любого размера и могут производить практически неограниченные количества продуктов на основе дрожжей. Кроме того, эти системы могут управляться, например, фермером или производителем, не имеющим практически никакого предыдущего опыта работы с системами ферментации.

Ферментацию проводят в масштабируемом реакторе как периодический процесс, предпочтительно без перемешивания. Используют портативный реактор с возможностью распределения, содержащий вертикальный параллелепипедный резервуар. Система оснащена системой перемешивания, состоящей из двух систем труб, каждая из которых оснащена насосным механизмом для выкачивания культуры из нижней части резервуара и внесения в верхние части резервуаров. Воздушный компрессор используют для добавления отфильтрованного воздуха в систему для аэрации для движущейся культуры.

Добавление отфильтрованного воздуха в резервуары контролировали с помощью барботажного механизма, который выполняется через барботер. Отфильтрованный воздух для барботирования генерируют водной насосной системой большого объема. В общей сложности, на резервуар приходится по два 72-дюймовых барботера.

Реактор имеет рабочий объем 550-1,000 л для выращивания дрожжей для получения клеток и метаболитов; однако размеры, материал (например, металлический) и конфигурация реакторов может различаться (в зависимости от требований).

Затраты на получение культуры снижены, потому что реакторы не стерилизуют с использованием традиционных методов. Вместо этого, для получения *Pichia* дрожжи-киллеры способны к самостоятельной стерилизации, т.е. их продукты жизнедеятельности борются с загрязнением культуры любыми возможными загрязняющими микроорганизмами. Кроме того, может быть использован метод санации пустых сосудов, который включает обработку внутренних поверхностей 1% перекисью водорода и промывание дезинфицирующим раствором и горячей водой под высоким давлением.

Инокуляция реактора может быть выполнена с помощью 20-30 л активно растущей культуры, чтобы обеспечить наличие желаемых токсинов и/или других продуктов жизнедеятельности в посевном материале и предотвратить размножение возможных загрязнителей, или с помощью концентрированного супернатанта *Pichia*. Кроме того, инокуляция может начинаться при уровне pH 2,5-3,5 и увеличиваться до 4,5-5,0 после 12 ч во время начала цикла ферментации.

Температура и pH ферментации не являются критическими, но в целом температура должна быть в пределах от около 25 до менее 37°C, предпочтительно от около 25 до 30°C. Уровень pH должен находиться в диапазоне от около 3,0 до около 5,0, предпочтительно от около 3,5 до около 4,5. Стабилизация pH в процессе ферментации не является необходимой, но рекомендуется повысить pH до 3,5-4,0, если происходит снижение ниже 3,0.

При необходимости, регуляция или поддержание pH в процессе ферментации может быть осуществлены с использованием ручных или автоматических методов, обычных в данной области техники, например с помощью автоматических регуляторов pH для добавления основания. Предпочтительные основания, используемые для регуляции pH, включают NaOH и KOH, но не ограничиваются ими.

Для получения *Pichia* путем ферментации могут использовать как сложную среду, такую как NYDB (питательный бульон, 10 г, дрожжевой экстракт, 8 г, декстроза 20 г на 1 л воды), PDB (картофельно-декстрозный бульон), ME (солодовый экстракт), так и среду с известным химическим составом с добавлением различного источника углерода, такого как глюкоза, сахароза, сорбит, меласса и т.д.

Тем не менее, в случае необходимости, стоимость среды может быть дополнительно снижена путем включения в ее состав только трех основных компонентов, как указано ниже.

Компонент	Концентрация (г/л)	Вес (г/л)
Дрожжевой экстракт	5	5,000
Глюкоза	30	30,000
Мочевина	1	1000

Обычное время выращивания составляет от 48 до 72 ч, и концентрация КОЕ составляет от 0,6 до 1,0 млрд клеток/мл.

Готовая культура является конечным продуктом для многих видов применений. Тем не менее, в случае необходимости, дрожжевые клетки могут быть собраны путем центрифугирования, фильтрации или осаждения. Полученная в результате паста дрожжей (влажная биомасса) может быть сохранена путем добавления соли, глицерина, лактозы, трегалозы, сахарозы, аминокислоты для увеличения срока годности при хранении.

Большинство коммерческих продуктов дрожжей получают путем высокоскоростного центрифугирования для отделения клеток дрожжей от жидкой среды. Собранные клетки дрожжей могут быть высушены с помощью сублимационной сушки, сушки в псевдоожоженном слое или распылительной сушкой. Высушенные продукты будут повторно гидратированы в воде при подготовке к использованию. Эти стадии могут повредить клеточные стенки и стать причиной гибели клеток.

Если дрожжевые клетки должны храниться в течение длительного времени перед использованием, они должны быть помещены в соответствующие контейнеры и храниться при 4°C. При использовании этого способа дрожжевые клетки оседают на дно контейнеров через два дня. Супернатант среды может быть удален с помощью сливания жидкости, оставляя небольшое количество супернатанта для покрытия клеток дрожжей. В этих условиях и после шести месяцев хранения жизнеспособность клеток *Pichia* не будут резко снижаться.

Пример 2. Расчет производства фитазы с использованием *Pichia anomala*.

Pichia anomala выращивали в реакторе для ферментации при pH, доведенном до 5,0, в течение 72 ч в следующей ростовой среде: меласса (4%), мочевины (0,2%), пептон (2,5%).

Фитиновую кислоту получали из семян кунжута, разрушая/дробя семена. Части семян (5 г) затем добавляли к 10 мл воды и перемешивали. Среду и клетки тестировали на наличие фитазы. 0,2 М глицинового буфера использовали для доведения pH до 4 и pH фитиновой кислоты также доводили до 4.

После 3 дней активность фитазы измеряли путем приготовления 6 различных стандартов:

- 0) 550 мкл воды,
- 1) 10 мкл 50 мМ фосфата калия и 540 мкл воды,
- 2) 20 мкл 50 мМ фосфата калия и 530 мкл воды,
- 3) 30 мкл 50 мМ фосфата калия и 520 мкл воды,
- 4) 40 мкл 50 мМ фосфата калия и 510 мкл воды,
- 5) 50 мкл 50 мМ фосфата калия и 500 мкл воды.

15 контролей фитиновой кислоты готовили с использованием 500 мкл фитиновой кислоты, 25 мкл 0,2 М глицинового буфера и 25 мкл воды.

15 контрольных образцов фитазы готовили с использованием 25 мкл фитазы, 25 мкл 0,2 М глицинового буфера и 500 мкл воды.

15 образцов фитазы готовили с использованием 500 мкл фитиновой кислоты, 25 мкл 0,2 М глицинового буфера и 25 мкл фитазы.

Раствор 4 мл уксусной кислоты - аммоний молибдат - H₂SO₄ (50 мл – 25 мл – 25 мл) добавляли к каждому из 6 стандартов.

Каждый из образцов и контролей переносили в водяную баню на 30 мин при 37°C. Через 30 мин к каждому из образцов и контролей быстро добавляли 4 мл раствора уксусной кислоты-аммоний молибдат-H₂SO₄ для осаждения фосфата. Затем их центрифугировали и 300 мкл супернатанта растворяли в 600 мкл воды.

Далее, 500 мкл всех образцов, контролей и стандартов загружали в луночные планшеты устройства Variscan и измеряли оптическую плотность при 400 нм.

Значения стандартов измеряли 3 раза и брали их средние значения. Значение стандарта 0 вычитали из значения каждого из стандартов 1-5 для достижения числа, которое коррелировало с оптической плотностью определенной концентрации фосфата. Средняя оптическая плотность для каждого из стандартов приведена в табл. 1. Средняя оптическая плотность образцов и контролей приведена в табл. 2.

Таблица 1

Средняя оптическая плотность (OD) и уровни (мМ) фосфата, измеренные для стандартов 0-5

Стандарт	Оптическая плотность (OD)	Фосфат (мМ)
0	0	0
1	0,0456	0,9091
2	0,1426	1,8182
3	0,1696	2,7273
4	0,2566	3,6364
5	0,2726	4,5455

Таблица 2

Средняя оптическая плотность (OD) образцов и контролей.

Образец/Контроль	Оптическая плотность (OD)
Контроль фитиновой кислоты	0,26
Контрольный образец фитазы	0,047
Образец фитазы	0,319

Для определения миллимолей высвобожденного фосфата среднюю оптическую плотность контрольных образцов фитазы добавляли к средней оптической плотности контролей фитиновой кислоты и вычитали из средней оптической плотности образца фитазы. Полученное число составляло 0,012 OD. На основании приведенной фигуры значение высвобожденного фосфата составило 0,198 мМ.

$$(1) \frac{\text{единицы/мл ферментативной активности}}{\text{активности}} = \frac{(\text{мМ фосфата}) \times (\text{коэффициент разбавления})}{(\text{время}) \times (\text{количество добавленного фермента})}$$

Наконец, в соответствии с вышеуказанным уравнением (1) концентрация фитазы в реакторе была рассчитана как 792 ед/мл.

Пример 3. Применение Triple-P к растениям помидора.

Растения помидора обрабатывали продуктом Triple-P. Наблюдалось увеличение высоты растений помидора на 20-25%. Кроме того, как количество, так и размер образованных плодов увеличивались на 50%.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения производительности в сельском хозяйстве и садоводстве, отличающийся тем, что способ включает применение композиции, содержащей дрожжи *Pichia anomala*, *Pichia kudriavzevii* и *Pichia guilliermondii* и ферментационный бульон, в котором культивировались каждые из дрожжей к почве, в которой выращивают растения, при этом способ повышает производительность за счет одного или нескольких из следующих следствий его применения: повышение урожайности, уменьшение дефицита питательных веществ в растении, ингибирование роста фитопатогенных грибов, ингибирование роста фитопатогенных бактерий и борьба с нематодами.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что дефицит питательных веществ является дефицитом фосфора.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что композиция дополнительно содержит по меньшей мере один адьювант, выбранный из фульвово́й кислоты, гуминовой кислоты или гумата.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что композиция дополнительно содержит питательные вещества для роста микроорганизмов.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что композиция дополнительно содержит продукты жизнедеятельности дрожжей, выбранные из группы, состоящей из ферментов, кислот, растворителей, спиртов, белков, витаминов, минералов, микроэлементов, аминокислот и био-ПАВ.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что композиция дополнительно содержит фермент фитазу.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что композиция дополнительно содержит носитель.

