

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A61K 35/742 (2023.05); C12N 1/20 (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2022108049, 25.03.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
25.03.2022Дата регистрации:  
06.07.2023Приоритет(ы):  
(22) Дата подачи заявки: 25.03.2022

(45) Опубликовано: 06.07.2023 Бюл. № 19

Адрес для переписки:  
656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО  
"Алтайский государственный университет",  
ЦРТПТТУИС(72) Автор(ы):  
Евдокимов Иван Юрьевич (RU),  
Ширманов Максим Вячеславович (RU),  
Малкова Ангелина Владимировна (RU),  
Ирkitова Алена Николаевна (RU),  
Дудник Дина Евгеньевна (RU),  
Дементьев Дмитрий Викторович (RU)(73) Патентообладатель(и):  
федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Алтайский государственный  
университет" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2675934 C2, 25.12.2018. RU  
2694522 C1, 16.07.2019. RU 2693439 C1,  
02.07.2019. ГРЕБЕНЩИКОВА А.В., Изучение  
антагонистической активности бактериальных  
консорциумов на основе штаммов *Bacillus*  
*subtilis*, Труды молодых ученых Алтайского  
Государственного Университета. //Материалы  
V региональной молодежной конференции  
"Мой выбор - наука", XIV научной (см.  
прод.)

(54) Новый пробиотический препарат на основе консорциума спорообразующих бактерий для аквакультуры и животных и способ его получения

(57) Реферат:

Изобретение относится к микробиологии и биотехнологии, а именно к пробиотическому препарату для аквакультуры. Пробиотический препарат для аквакультуры, а именно для цист рачка артемии и креветок, который в своем составе содержит лиофильно высушенную биомассу штаммов *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249 и *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250 и наполнитель мальтодекстрин в следующем соотношении, мас. %: *Bacillus toyonensis* - 5, *Bacillus pumilus* - 15, мальтодекстрин - 80, количество жизнеспособных бактерий не менее  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/г. Способ получения

пробиотического препарата для аквакультуры, а именно для цист рачка артемии и креветок, включающий раздельное культивирование штаммов *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249 и *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250 на мелассно-кукурузной среде в ферментационных установках при pH 6,8-7,0 и температуре 37°C, расходе воздуха 100-150 л/мин, скорости перемешивания 250-500 об/мин; pO<sub>2</sub> - 30-50% в фазе интенсивного роста культуры, продолжительность ферментации 18-24 ч до концентрации клеток в споровой форме 93-95%; концентрирование культуральной жидкости на проточной центрифуге при скорости

15000 об/мин со скоростью подачи культуральной жидкости 100-120 л/ч; смешивание концентратов штаммов с криопротекторной средой; замораживание и лиофильную сушку; тщательное смешивание в течение 30-60 минут полученной сухой биомассы бактерий в соотношении 1:3 с последующей добавкой наполнителя мальтодекстрина до 100% массы препарата.

Вышеописанная группа изобретений обеспечивает получение препарата, который обладает высоким титром, антагонистической активностью в отношении патогенных, условно-патогенных микроорганизмов, долгим сроком хранения и эффективностью при инкубации цист рачка артемии и креветок Розенберга. 2 н.п. ф-лы, 2 ил., 3 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

конференции студентов, магистрантов, аспирантов и учащихся лицейных классов, 1-28 апреля 2018, вып. 15, с. 6-8. ОРЛОВА Т.Н. и др., Антагонистическая активность *Bacillus subtilis*, Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2018, N 5 (163), с. 141-145.

R U  
2 7 9 9 5 5 4  
C 1

R U  
2 7 9 9 5 5 4  
C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 35/742* (2015.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12R 1/07* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 35/742 (2023.05); C12N 1/20 (2023.05)*(21)(22) Application: **2022108049, 25.03.2022**(24) Effective date for property rights:  
**25.03.2022**Registration date:  
**06.07.2023**

Priority:

(22) Date of filing: **25.03.2022**(45) Date of publication: **06.07.2023** Bull. № 19

Mail address:

**656049, g. Barnaul, pr. Lenina, 61, FGBOU VO  
"Altajskij gosudarstvennyj universitet",  
TSRTPTTUIS**

(72) Inventor(s):

**Evdokimov Ivan Yurevich (RU),  
Shirmanov Maksim Vyacheslavovich (RU),  
Malkova Angelina Vladimirovna (RU),  
Irkutova Alena Nikolaevna (RU),  
Dudnik Dina Evgenevna (RU),  
Dementev Dmitrij Viktorovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj  
universitet" (RU)**(54) **NEW PROBIOTIC BASED ON A CONSORTIUM OF SPORE-FORMING BACTERIA FOR AQUACULTURE AND ANIMALS AND A METHOD OF ITS PRODUCTION**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology; biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to a probiotic for aquaculture. Probiotic for aquaculture, namely for brine shrimp and brine shrimp cysts which contains freeze-dried biomass of *Bacillus toyonensis* VKPM B-13249 and *Bacillus pumilus* VKPM B-13250 strains and maltodextrin filler in the following ratio, wt. %: *Bacillus toyonensis* — 5, *Bacillus pumilus* — 15, maltodextrin — 80, the number of viable bacteria is at least  $1 \times 10^{10}$  CFU/g. A method of producing a probiotic preparation for aquaculture, namely for cysts of *Artemia* crustacean and shrimp, including separate cultivation of strains of *Bacillus toyonensis* VKPM B-13249 and *Bacillus pumilus* VKPM B-13250 on molasses-corn medium in fermentation plants at pH 6.8–7.0 and temperature 37°C, air flow 100–150 l/min, mixing speed 250–500 rpm; pO<sub>2</sub> — 30–50% in the phase of intensive growth of

culture, the duration of fermentation 18–24 h until the concentration of cells in the spore form of 93–95%; concentration of the culture fluid in a flow centrifuge at a speed of 15,000 rpm with a culture fluid feed rate of 100–120 l/h; mixing concentrates of strains with cryoprotective medium; freezing and freeze drying; thorough mixing for 30–60 minutes of the resulting dry biomass of bacteria in a ratio of 1:3, followed by the addition of maltodextrin filler to 100% of the mass of the product.

EFFECT: group of inventions described above provides for obtaining a product that has a high titer, antagonistic activity against pathogenic, opportunistic microorganisms, a long shelf life and efficiency in the incubation of *Artemia* crustacean cysts and Rosenberg shrimp.

3 cl, 2 dwg, 3 tbl, 4 ex

Изобретение относится к микробиологии и биотехнологии, в частности, к технологии получения пробиотических препаратов для использования в аквакультуре.

Аквакультура - это один из самых быстрорастущих секторов производства продуктов питания в мире. Различные заболевания водных животных и ухудшение состояния окружающей среды часто приводят к серьезным экономическим потерям. В качестве борьбы и профилактики с инфекционными заболеваниями очень часто применяются антибиотики, но их использование приводит к развитию резистентности патогенных микроорганизмов и подавлению иммунитета организма. В связи с этим, а также с растущим спросом на аквакультуру, в настоящее время широкое признание получает применение пробиотиков в качестве усиливающего иммунитет средства. Пробиотики характеризуются отсутствием патогенности, беспрепятственной пролиферацией *in vitro*, быстрым ростом в организме [1]. В дополнение к этому, их активность не должна ингибироваться кормовыми ингредиентами и для удобства они должны легко смешиваться с кормом. В аквакультуре пробиотики также добавляют в рыбный корм или, дополнительно, в воду.

К настоящему времени известно большое количество пробиотиков, получаемых с использованием различных видов и групп микроорганизмов: *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *Lactobacillus sporogenes*, *L. rhamnosus*, *L. arcasei*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *Saccharomyces boulardii*, *Enterococcus faecium* и др. Пробиотики являются эффективным средством в борьбе с патогенными бактериями, которые вызывают заболевания, способствуют пролиферации кишечной микрофлоры, продуцируют молочную или уксусную кислоту, различные витамины, белки, ферменты и другие полезные вещества. Таким образом, оздоравливающие свойства пробиотиков заключаются в антагонистической активности против патогенных микробов и их метаболитов, в создании благоприятных условий для микрофлоры желудочно-кишечного тракта и снабжении организма животных биологически активными веществами, повышающими конвертируемость корма, улучшающими процессы жизнедеятельности и иммунный статус [2].

Известна кормовая добавка «Субтиспорин», с содержанием вегетативных клеток бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2150 в количестве  $5 \times 10^9$  КОЕ/мл.

Известен пробиотик «Моноспорин» как в жидком, так и сухом виде. В основе препарата - споровая форма штамма *B. subtilis* 945 (В-5225) с титром не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл. В состав препарата так же входят меласса свекловичная, соевый гидролизат, вода.

Известен пробиотический препарат для обогащения *Artemia franciscana*, содержащий в своем составе *S. boulardii*. В литературе показано, что дрожжи усиливают резистентность и устойчивость артемий к возбудителю *Vibrio harveyi* при внесении дрожжей в концентрации в  $1 \times 10^4$  КОЕ/мл [3].

Было проведено исследование на обогащение пробиотиком с *B. subtilis* *A. franciscana* с последующим ее скармливанием декоративным рыбам *Poecilia latipinna*. Результаты показали, что культивирование артемий с добавлением *B. subtilis* в концентрации  $1 \times 10^5$  КОЕ улучшает репродуктивные параметры, кишечную микрофлору и устойчивость к патогенным бактериям у рыб [4].

Известен препарат с пробиотическим штаммом *L. rhamnosus* IMC 501®, обладающий ингибирующим эффектом против таких патогенных микроорганизмов как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Clostridium perfringens* и *Streptococcus mutans*.

Проведено исследование на влияние этого штамма на обогащение *Artemia* sp. с последующим ее скармливанием различным видам рыб. Было показано улучшение в развитии личинок рыб *Amphiprion ocellaris* [5]. Испанскими учеными [6] проведен эксперимент по введению пробиотика на основе *L. rhamnosus* в среду к *A. metanauplii*, чтобы проанализировать эффект от применения пробиотика в качестве средства борьбы с потенциально патогенными представителями микроорганизмов семейства *Vibrionaceae*. В результате ими доказано позитивное влияние на рачков *L. rhamnosus* и снижение уровня болезнетворных организмов на целый порядок по сравнению с контролем.

Индийскими учеными [7] проведены исследования по обогащению науплиусов *A. parthenogenetica* разными микроорганизмами: *L. rhamnosus*, *V. coagulans*. В ходе эксперимента изучалась нагрузка и время задерживания пробиотических добавок в кишечнике науплиусов артемий. В результате было выявлено, что науплиусы артемий, обогащенные *L. rhamnosus*, достигали наполненного состояния кишечника через  $39 \pm 1,41$  мин, а обогащенные науплиусы *V. coagulans* - через  $39,5 \pm 0,71$  мин. Нагрузка на кишечник и время задерживания в кишечнике варьировали в экспериментальных группах.

Из вышеприведенных данных видно, что в составе пробиотических препаратов чаще всего выступают хорошо изученные микроорганизмы родов *Lactobacillus* и *Bacillus*. Однако, для устойчивого развития аквакультуры необходимо увеличить пул микроорганизмов, используемых в качестве пробиотиков для гидробионтов, а также расширить линейку препаратов, базирующихся на консорциуме микробов, а не монокультурах. Кроме того, титр микроорганизмов в большинстве пробиотиков, как правило, не превышает  $5 \times 10^9$  КОЕ/г. При этом экспериментально установлено, что чем выше численность микроорганизмов в биопрепарате, тем он эффективнее [8].

Наиболее близким, по технической сущности или аналогом, к заявляемому изобретению, является способ получения комбинированного пробиотического препарата для животноводства на основе спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* ВКМ-В-2998D и *Bacillus licheniformis* ВКМ-В-2999D. В качестве вспомогательных веществ или добавок - *Bacillus subtilis* (natto) ВКМ В-3057D, глюконат кальция, ферментный препарат «Кемзайм плюс» и наполнитель молочная сыворотка. Титр готового препарата - не менее  $5 \times 10^9$  КОЕ/г [9].

Задачей, стоявшей перед авторами данного изобретения, являлось создание нового комбинированного пробиотического сухого препарата с повышенной эффективностью, высоким титром живых пробиотических микроорганизмов и длительным сроком хранения на основе уникальных штаммов *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250, выделенных из ризосферы растений *Helianthus annuus* L. и *Cichorium intybus* L. соответственно.

Технический результат, получаемый при осуществлении изобретения, заключается в возможности получения пробиотика для аквакультуры и животных, с высоким значением титра за счет включения в состав уникальных штаммов микроорганизмов, обладающих широким спектром антагонистической активности по отношению к патогенным, условно-патогенным микроорганизмам и дрожжеподобным грибкам.

Технический результат достигается следующим образом: пробиотический препарат для использования в аквакультуре и животных в своем составе содержит лиофильно высушенную биомассу штаммов *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249 и *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250, и наполнитель мальтодекстрин в следующем соотношении (%) по массе: *Bacillus toyonensis* - 5, *Bacillus pumilus* - 15, мальтодекстрин - 80, и представляет собой сыпучий порошок белого цвета с коричневыми вкраплениями. Количество

жизнеспособных бактерий не менее  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/г.

Способ получения пробиотического препарата включает последовательное, раздельное культивирование штаммов *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249 и *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250 на меласно-кукурузной среде в ферментационных установках при рН 6,8-7,0, концентрирование культуральной жидкости на проточной центрифуге, сублимационную сушку концентратов, смешивание полученной сухой биомассы бактерий в соотношении 1:3 с последующей добавкой наполнителя мальто декстрина до 100% массы препарата, приводящей к получению пробиотика с содержанием жизнеспособных бактерий не менее  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/г.

#### 1. Штаммы и питательные среды для культивирования.

В качестве действующего компонента нового пробиотика использовался консорциум на основе штаммов *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249 и *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250. Оба штамма бактерий были запатентованы в 2019 году [10, 11] как антагонисты по отношению к таким патогенным микроорганизмам, как *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*.

В колбах и чашках Петри штаммы культивировались на L-среде, содержащей 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl и 15 г пептона на 1 л дистиллированной воды. Для получения твердой питательной среды добавлялся агар из расчета 15 г/л.

Питательная среда для ферментации имела следующий состав на 1 л водопроводной воды: 25 г мелассы, 12,5 г кукурузного экстракта, 1 г дрожжевого экстракта, 0,5 г триптона, 0,25 г  $MgSO_4$ , 0,03 г  $MnSO_4$ , 0,046 г  $CoCl_2$ , 1 г  $CaCl_2$ , 0,001 г  $FeSO_4$ , 0,001 г  $CuSO_4$  и 2 мл лапрола.

#### 2. Антагонистическая активность концентратов и готового биопрепарата.

Лиофилизированные концентраты каждого из штаммов, а также их композиции и готовый пробиотик проявляют антагонистический эффект по отношению к штаммам *E. coli*. За счет явления синергизма между штаммами, выражающегося в максимальном антагонистическом эффекте, выбранное соотношение бактерий *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249 и *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250 в готовом препарате - 1:3.

#### 3. Технологическая схема производства препарата и его готовый вид.

Штаммы *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249 и *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250 культивируются раздельно в ферментере с меласно-кукурузной средой следующего состава (г/л): 25 г мелассы, 12,5 г кукурузного экстракта, 1 г дрожжевого экстракта, 0,5 г триптона, 0,25 г  $MgSO_4$ , 0,03 г  $MnSO_4$ , 0,046 г  $CoCl_2$ , 1 г  $CaCl_2$ , 0,001 г  $FeSO_4$ , 0,001 г  $CuSO_4$  и 2 мл лапрола. Ферментацию проводят при рН 6,8-7,0 и температуре 37°C, расходе воздуха 100-150 л/мин, скорости перемешивания 250-500 об/мин;  $pO_2$  - 30-50% в фазе интенсивного роста культуры. Продолжительность процесса ферментации 18-24 часа. Процесс считается законченным, если концентрация клеток в споровой форме составляет 93-95%. По окончании культивирования штаммов *B. toyonensis* ВКПМ В-13249 и *B. pumilus* ВКПМ В-13250 культуральную жидкость концентрируют на высокоскоростной центрифуге с периодической выгрузкой концентрата. Центрифугирование культуральной жидкости проводят при скорости вращения ротора - 15000 об/мин. Скорость подачи культуральной жидкости 100-120 л/ч. По окончании центрифугирования концентраты штаммов *B. toyonensis* и *B. pumilus* смешивают с криопротекторной средой, замораживают при -25-40°C в морозильном шкафу и затем, подвергают лиофильной сушке. На выходе получается сыпучий порошок от светло-

кремового до темно-бурого цвета, сладко-горького вкуса, с легким специфическим запахом.

Для получения целевого продукта с общим содержанием жизнеспособных клеток бактерий не менее  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/г используют смеситель периодического действия по типу «Пьяная бочка» и наполнитель мальтодекстрин - углевод, представляющий собой промежуточный продукт ферментного расщепления растительного крахмала, в результате чего молекулы крахмала делятся на фрагменты - декстрины, при этом образуются молекулы глюкозы (декстрозы), мальтозы, мальтотриозы. В смеситель вносят 48 кг мальтодекстрина и 2 кг концентратов *V. toyonensis* и *V. pumilus* в соотношении 1:3. Затем, содержимое тщательно перемешивается в течение 30-60 мин. (время смешивания выбрано экспериментальным путем, т.к. за такой промежуток времени концентрат бактерий равномерно распределяется по всему объему мальтодекстрина). После перемешивания содержимое смесителя сыпается в полиэтиленовые мешки, соблюдая точный вес на весах, отбирается средняя проба для анализа. Мешки упаковываются в трехслойные kraft-мешки, зашиваются и отправляются в складское помещение на карантин, до получения результатов анализа на чистоту и содержание микроорганизмов. Общая схема получения готового пробиотического препарата для аквакультуры представлена на блок-схеме (Фиг. 1).

Весь процесс изготовления опытно-промышленных партий готового продукта происходил в лаборатории ИЦ «Промбиотех» АлтГУ на имеющемся оборудовании центра. Таким образом полученный препарат представляет из себя порошок белого цвета с коричневыми вкраплениями бактериального концентрата. Специфический запах бацилл фактически не идентифицируется.

4. Эффективность препарата при проращивании цист артемий и выращивании креветок.

Новый пробиотический препарат, содержащий консорциум штаммов *V. toyonensis* В-13249 и *V. pumilus* В-13250 оказывает положительный эффект на процент выклева цист и выход биомассы артемий. Рекомендуемая доза биопрепарата - 0,1 г на 2 г цист.

Новый пробиотик на основе спорных бактерий способствует более раннему выходу из личиночной стадии креветки *M. rosenbergii* по сравнению с контролем (на 18-й день).

Изобретение иллюстрируется следующими примерами:

Пример 1. Определение антагонистической активности концентратов штаммов *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249 и *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250 и препарата на их основе

Антагонизм концентратов и бактериального препарата устанавливался по отношению к двум штаммам *E. coli* из коллекции ИЦ «Промбиотех». Для этого использовали метод совместного культивирования антагонистов и тест культур в соотношении 1:1 в жидких питательных средах в течение 14-и суток при комнатной температуре. В контрольных колбах штаммы *E. coli* выращивали без присутствия бацилл. На 2-е, 7-е и 14-е сутки осуществляли посев из всех колб на среду Эндо для установления индекса блокирования роста (далее ИБР). ИБР - отношение числа колониеобразующих единиц (КОЕ), выросших с контрольной колбы, к числу КОЕ, выросших с опытной колбы. Результат принимали за положительный при  $\text{ИБР} < 1$ . В таблице 1 представлены результаты антагонистической активности лиофилизированных концентратов бацилл. Из них были составлены следующие комбинации: I - только штамм *V. toyonensis*, II - только штамм *V. pumilus*, III - штаммы *V. toyonensis* и *V. pumilus* в соотношении 1:1, IV - штаммы *V. toyonensis* и *V. pumilus* в соотношении 1:3.

Таблица 1. Антагонистическая активность концентратов бацилл в отношении *E. coli* при совместном культивировании в жидкой среде

Проба	<i>E. coli</i> №1			<i>E. coli</i> №2		
	ИБР по суткам					
	2-е	7-е	14-е	2-е	7-е	14-е
I	1,00	0,67	0,73	>1,00	0,15	0,20
II	1,00	0,50	0,59	>1,00	0,45	0,75
III	0,07	0,60	0,66	0,17	0,01	0,03
IV	0,10	0,17	0,41	0,10	0,05	0,25

В соответствии с полученными результатами через двое суток концентраты отдельных штаммов бацилл еще не оказывают антагонистическое действие в отношении обеих тест-культур, а пробы с бактериальными консорциумами уже снижают численность *E. coli* в пределах порядка с контролем.

К 7-м суткам эксперимента пробы I и II начинают подавлять кишечную палочку, а консорциумы из штаммов *B. toyonensis* и *B. pumilus* и вовсе способствуют сокращению численности *E. coli* №2 на целый порядок, именно на этом сроке достигается наилучший антагонистический эффект. Через две недели антагонистическое действие бацилл снижается у всех проб, поэтому до 3-й недели эксперимент не продолжали.

*E. coli* №1 бациллы лучше подавляют, находясь в соотношении 1:3, а *E. coli* №2 - в соотношении 1:1, хотя разница не столь велика. На основании выше указанных данных для создания биопрепарата целесообразно использовать консорциум *B. pumilus* и *B. toyonensis* в соотношении 3:1.

Данные по антагонистическому действию готового бактериального препарата с мальтодекстрином, установленные при длительном культивировании на жидкой питательной среде его с тест-культурами, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Антагонистическая активность готового пробиотика при длительном культивировании на жидкой питательной среде

Тест-культуры	ИБР, сутки		
	2-е	7-е	14-е
<i>E. coli</i> №1	0,37	0,28	0,20
<i>E. coli</i> №2	0,27	0,40	0,20

Согласно установленным результатам пробиотик подавляет рост обеих штаммов кишечной палочки в пределах порядка уже на 2-е сутки, как и консорциумы концентратов бацилл. По штамму *E. coli* №1 можно заметить, что пробиотик с каждой контрольной точкой эксперимента все сильнее действует на условно-патогенный микроорганизм. При действии биопрепарата на штамм *E. coli* №2 зафиксирована особенность - снижение его антагонистической активности через неделю и достижение наилучшего значения ИБР к 14-м суткам эксперимента. Отличие в ИБР между концентратами и готовым препаратом можно объяснить тем, что численность бацилл в готовом пробиотике на порядок ниже, чем в концентрированных культурах *B. toyonensis* и *B. pumilus*.

Важно отметить, что в рамках этого опыта дополнительная доза пробиотического препарата не вносилась в питательную среду с кишечной палочкой, а антагонистическое действие бактериального препарата сохранялось на высоком уровне и даже улучшалось со временем. Это важно учитывать при промышленных испытаниях готового продукта, чтобы установить наиболее оптимальный план кормления креветок биопрепаратом и срок достижения максимального положительного эффекта от пробиотикотерапии, который может наступить после завершения профилактического курса приема пробиотической добавки.



### Пример 2. Влияние пробиотика при инкубации цист артемий

Проведены исследования по эффективности пробиотика при инкубации цист рачка артемий при содействии промышленного партнера - ООО «Ареал» (г. Яровое, Алтайский край). В эксперименте использовались цисты жаброногого рачка артемий *A. franciscana* двух партий: Z29.04 (озеро Большое Яровое) и С9 (озеро Кучукское) по 4 варианта для каждой из партий в 24-х повторностях. Инкубацию проводили, используя следующие дозы пробиотика (г): 0 (контроль), 0,05, 0,1, 0,2. Пробиотик непосредственно вносился в конус с инкубационным раствором одновременно с началом процесса инкубации. По истечении 48 часов инкубации в каждом конусе подсчитывали количество рачков или науплиусов (N), цист (C) и эмбрионов (U). После чего рассчитывали процент выклева (HR), применяя стандартный метод [12] и коэффициент биомассы [13]. Результаты по обеим партиям цист представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты 48 ч инкубации цист обеих партий

Варианты, навеска пробиотика (г)	HR, (%)		Выход биомассы, (Av, г)		Коэффициент биомассы	
	Z29.04	С9	Z29.04	С9	Z29.04	С9
Конус 1, 0 г (контроль)	95,19	79,23	5,30	4,60	2,65	2,30
Конус 2, 0,05 г	94,61	79,85	6,80	6,43	3,40	3,20
<b>Конус 3, 0,10 г</b>	<b>96,53</b>	<b>88,76</b>	<b>7,40</b>	<b>6,80</b>	<b>3,70</b>	<b>3,40</b>
Конус 4, 0,20 г	93,01	83,69	7,10	5,10	3,55	2,55

Из таблицы видно, что лучшие результаты с обеих партий получены при добавлении 0,1 г пробиотика на 2 г сухих цист. Стоит заметить, что % выклева в партии Z29.04 меняется по сравнению с контролем на 1,4%, что хоть и не значительно, но в лучшую сторону. При добавлении биопрепарата к партии С9 отмечается прирост HR на 9,5%. Положительное влияние пробиотика сказывается и на выходе биомассы относительно контроля на 2,1 и 2,2 г в партиях Z29.04 и С9 соответственно.

Пример 3. Установление эффективности биопрепарата при выращивании креветок

Исследование проводилось на частной ферме в Республики Казахстан, в окрестностях г. Караганда. Объектом исследования явилась креветка Розенберга (*Macrobrachium rosenbergii*), разделенная на 2 группы: контрольная (в кормлении использовалась *Artemia franciscana* L., инкубированная без добавления пробиотика) и опытная (в кормлении использовалась артемия, инкубированная с добавлением пробиотика, т.н. «обогащенная» артемия) по 200 личинок в каждой, которые выращивались в одинаковых аквариумных системах по 600 литров каждая. Пробиотик вносили на 20 час инкубации цист артемий в количестве 1 г на 100 сухих цист при общей продолжительности инкубации 24 ч. При кормлении креветки на более поздней стадии развития (примерно 15 суток) использовались науплиусы 48 часов инкубации. Стоит отметить, что в ходе кормления на ранних стадиях развития креветки требовательны к подвижности корма. В связи с этим, при кормлении предличинок добавляли суспензию живой спирулины (5 мл на бассейн/сутки) для увеличения подвижности науплиусов. Известно, что вылупившаяся личинка креветки Розенберга проходит 11 различных личиночных стадий, чтобы достичь постличинкой. Этот процесс занимает приблизительно от 22 до 45 дней. Фиксирование линек креветок осуществляли визуально, чтобы не травмировать животных. При обнаружении в общей массе хотя бы одной креветки прошедшей линьку, считали, что вся группа прошла очередную линьку, так как начав, вся группа заканчивает линьку в течение суток. Согласно полученным результатам, в опытной группе наблюдался

более ранний выход из личиночной стадии - на 18 день. В контрольной группе - на 28 день. Таким образом сказывается положительный эффект влияния пробиотика на сроки метаморфоза личинок *M. rosenbergii*.

Пример 4. Установление срока годности

5 Для установления срока годности готового препарата на протяжении времени хранения при 5°C проверяли изменение титра бацилл, а также наличие, либо отсутствие, посторонней микрофлоры (Фиг. 2).

Как показывают полученные результаты, после хранения препарата на протяжении 12 месяцев, содержание живых микробных клеток остается на высоком уровне, а также  
10 отсутствует посторонняя микрофлора.

Литература

1. Левахин В.И., Ласыгина Ю.А., Харламов А.В., Ворошилова Л.Н. Пробиотики в животноводстве // Животноводство и кормопроизводство, 2013. - Т. 1. - №79. - С. 7-10.

2. Соколенко Г.Г., Лазарев Б.П., Миньченко С.В. Пробиотики в рациональном  
15 кормлении животных // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК - продукты здорового питания, 2015. - №1. - С.72-78.

3. Patra S.K., Mohamed K.S. Enrichment of *Artemia nauplii* with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio* // *Aquaculture International*, 2003. - Vol. 11(5). - P. 505-514.

4. Ahmadifard N., Aminloo R., V., Tukmechi A., Agh N. Evaluation of the Impacts of Long-Term Enriched *Artemia* with *Bacillus subtilis* on Growth Performance, Reproduction, Intestinal Microflora, and Resistance to *Aeromonas hydrophila* of Ornamental Fish *Poecilia latipinna* // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019. - Vol. 11(3). - P. 957-965.

5. Avella M.A., Olivotto I., Silvi S., Place A.R., Carnevali O. Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a  
25 marine fish // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2010. - Vol. 298(2). - P. 359-371.

6. Ofelio C, Planas M, Pintado J. Administration of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 as a strategy for the control of *Vibrio* bacteria in the brine shrimp *Artemia* // *Lett. Appl. Microbiol.*, 2021. - Vol. 73(3). - P. 336-342.

7. Isamma A., Divya Kan. R., Ramasubramanian V., Arunjith Th., Sureshkumar S. Standardization of the bioencapsulation of probiotics and oil emulsion in *Artemia parthenogenetica* // *Int. J. Res. Fish. Aquae*, 2014. - Vol. 4(3). - P. 122-125.

8. Amoah K., Huang, Q.C, Tan B.P, Zhang S., Chi S. Y., Yang Q. H., Dong X.H. Dietary supplementation of probiotic bacteria, *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth  
35 performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* // *Fish and Shellfish Immunology*, 2019. - Vol. 87. - P. 796-808.

9. Джавахия В.В., Глаголева Е.В., Воинова Т.М., Карташов М.И., Овчинников А.И. Комбинированный пробиотический препарат на основе спорообразующих бактерий  
40 рода *Bacillus* (варианты) для использования в животноводстве, способ его производства (варианты) и штамм *Bacillus subtilis* (natto), используемый в качестве добавки к препарату // Патент РФ №2675934, заявлено 10.04.2017, опублик. 25.12.2018.

10. Иркитова А.Н., Гребенщикова А.В. Штамм бактерий *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к микроорганизмам  
45 *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* // Патент РФ №2693439, заявка 25.12.2018, опублик. 02.07.2019 Бюл. №19.

11. Иркитова А. Н., Гребенщикова А. В. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* ВКПМ

В-13250, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к микроорганизмам *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis* // Патент РФ №2694522, заявка 25.12.2018, опубл. 16.07.2019. Бюл. №20.

5 12. Lavens P., Sorgeloos. P. Manual on the production and use of live food for aquaculture. - Rome, FAO, 1996. - 295 p.

13. Baert P., Bosteels T., Sorgeloos P. Pond production // Manual on the production and use of live food for aquaculture, 1996. - P. 196-251.

(57) Формула изобретения

10 1. Пробиотический препарат для аквакультуры, а именно для цист рачка артемии и креветок, отличающийся тем, что в своем составе содержит лиофильно высушенную биомассу штаммов *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249 и *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250 и наполнитель мальтодекстрин в следующем соотношении, мас. %: *Bacillus toyonensis* - 5, *Bacillus pumilus* - 15, мальтодекстрин - 80, количество жизнеспособных бактерий не  
15 менее  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/г.

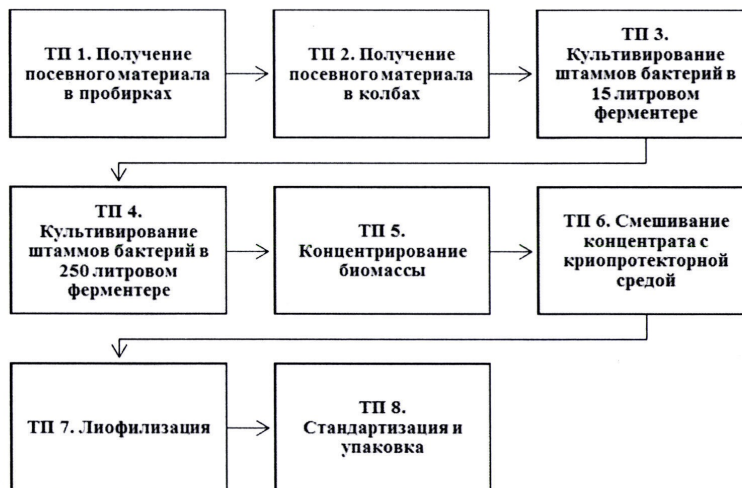
2. Способ получения пробиотического препарата по п. 1 для аквакультуры, а именно для цист рачка артемии и креветок, включающий раздельное культивирование штаммов *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249 и *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250 на меласно-  
20 кукурузной среде в ферментационных установках при рН 6,8-7,0 и температуре 37°C, расходе воздуха 100-150 л/мин, скорости перемешивания 250-500 об/мин; рО<sub>2</sub> - 30-50% в фазе интенсивного роста культуры, продолжительность ферментации 18-24 ч до концентрации клеток в споровой форме 93-95%; концентрирование культуральной жидкости на проточной центрифуге при скорости 15000 об/мин со скоростью подачи культуральной жидкости 100-120 л/ч; смешивание концентратов штаммов с  
25 криопротекторной средой; замораживание и лиофильную сушку; тщательное смешивание в течение 30-60 минут полученной сухой биомассы бактерий в соотношении 1:3 с последующей добавкой наполнителя мальтодекстрина до 100% массы препарата.

30

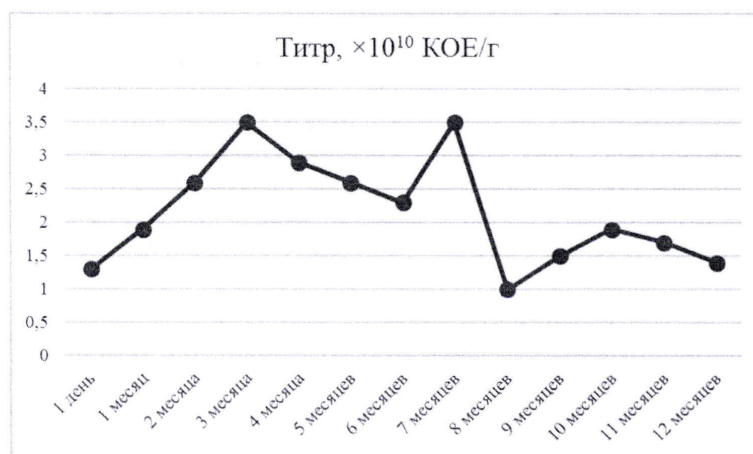
35

40

45



Фиг. 1. Основные стадии технологического процесса (ТП)



Фиг. 2. Изменение численности бацилл в готовом биопрепарате в ходе хранения