



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **98109728/13, 18.05.1998**

(24) Дата начала действия патента: **18.05.1998**

(43) Дата публикации заявки: **27.03.2000**

(46) Опубликовано: **10.08.2002**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **КАРАСЕВА Т.А. Эффективность применения биостимуляторов и бактериальных препаратов для борьбы с болезнями заводской молоди семги, Сборник научных трудов "Заполяная марикультура". - Мурманск, 1994. СМИРНОВ В.В., РЕЗНИК С.Р. и др. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков и бактерий рода *Vacillus*, Микробиологический журнал. - Киев: Наукова Думка, 1993, № 4, т.55, с.92-107. RU 2035185 С1, 20.05.1995.**

Адрес для переписки:

**633159, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, пгт. Кольцово, ГНЦВБ "Вектор", патентный отдел, Ю.Н.Мистюрину**

(71) Заявитель(и):

**Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"**

(72) Автор(ы):

**Борисова М.Н.,  
Новоскольцева Т.М.,  
Иренков И.П.,  
Белявская В.А.,  
Ильичев А.А.**

(73) Патентообладатель(ли):

**Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"**

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЫБ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и ветеринарии. Предложен высокоэффективный способ лечения и профилактики заболеваний у рыб с использованием пробиотического препарата нового поколения субалина (ветосубалина). На тонну корма для рыб добавляют не менее 100 доз (700 млрд живых бактерий *Vacillus subtilis* ВКПМ В-4759

в споровой форме) пробиотика субалина (ветосубалина) и скармливают ежедневно в течение пяти дней. Способ позволяет улучшить кожный покров и состояние жаберного аппарата рыб, стабилизировать функции кишечника и восстановить естественный баланс между нормальной и потенциально патогенной микрофлорой кишечника. 2 табл.



RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 186 576** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **A 61 K 35/74, A 01 K 61/00**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **98109728/13, 18.05.1998**

(24) Effective date for property rights: **18.05.1998**

(43) Application published: **27.03.2000**

(46) Date of publication: **10.08.2002**

Mail address:

**633159, Novosibirskaja obl., Novosibirskij r-n, pgt. Kol'tsovo, GNTsVB "Vektor", patentnyj otdel, Ju.N.Mistjurinu**

(71) Applicant(s):

**Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii i biotekhnologii "Vektor"**

(72) Inventor(s):

**Borisova M.N.,  
Novoskol'tseva T.M.,  
Irenkov I.P.,  
Beljavskaja V.A.,  
Il'ichev A.A.**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii i biotekhnologii "Vektor"**

(54) **METHOD FOR TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF FISH DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, veterinary science.  
SUBSTANCE: it is suggested a new method for treatment and prophylaxis of fish diseases by using a new-generation probiotic preparation named subaline (vetosubaline). Per a ton of fish fodder it is added not less than 100 doses (700 billion alive *Bacillus subtilis* bacteria VKPM V-

4759 in a sporous form) of subaline probiotic (vetosubaline) and fed daily for 5 d. The method enables to improve skin and state of branchial apparatus in fish, stabilize intestinal functions and restore natural balance between normal and potentially pathogenic intestinal microflora.  
EFFECT: higher efficiency. 3 ex, 2 tbl

RU 2 1 8 6 5 7 6 C 2

RU 2 1 8 6 5 7 6 C 2

Изобретение относится к области биотехнологии и ветеринарии и может быть использовано в рыбоводстве для лечения и профилактики заболеваний рыб, в частности таких, как аэромоноз.

Аэромонады - возбудители бактериальной геморрагической септицемии у рыб, которые могут вызывать геморрагии у теплокровных, в том числе у человека. Иногда при вспышке аэромоноза выделяются вирулентные штаммы, вызывающие 100%-ю гибель рыбы в течение первых суток. Известно также, что вспышкам заболеваемости способствует снижение иммунитета, вызванное стрессовыми экологическими факторами.

Для лечения и профилактики этих заболеваний наиболее широко используются антибиотики левомецетин, биомицин, окситетрациклин, фуразолидон, а также комбикорма с кормогризином, биомицином, фуразолидоном. Общераспространенным является применение препаратов нитрофуранов. Курс лечения антибиотиками составляет не менее 10 дней и часто приводит к иммунодепрессивным состояниям у рыб, ухудшению эпизоотической ситуации, а также ухудшению потребительских качеств промысловой рыбы из-за наличия в ней антибиотиков [1].

Альтернативой применению антибиотиков является использование пробиотических препаратов из живых бактерий, обладающих антагонистическим действием в отношении возбудителей заболевания [2].

Наиболее близким к заявляемому способу является способ лечения и профилактики заболеваний рыб, заключающийся в скармливании рыбам лечебного корма, содержащего пробиотический препарат азогидин на основе *Azomonas agilis* и *Lactobacterium acidophilus*. Применение этого препарата позволило получить положительный результат на лососевом рыбозаводе и в тепловодном прудовом хозяйстве [3, прототип].

Однако недостатком способа-прототипа является ограниченность применения, так как бактерии, входящие в состав азогилина, осуществляют свою жизнедеятельность, проявляя антибактериальную активность лишь в тепловодных условиях, что ограничивает сферу его применения. Кроме того, препарат не обладает выраженными антивирусными и иммуномодулирующими свойствами.

Технической задачей изобретения является разработка способа лечения и профилактики заболеваний у рыб, позволяющего расширить сферу применения.

Поставленная задача решается путем использования для лечения и профилактики заболеваний у рыб пробиотика субалина.

Субалин (ветосубалин) является препаратом нового поколения, полученным генно-инженерными методами для целенаправленного улучшения лечебно-профилактических свойств пробиотика [4]. Бактерии *Bacillus subtilis* ВКПМ В-4759, входящие в состав указанного пробиотического препарата, помимо природных антагонистических свойств в отношении патогенной микрофлоры, обладают способностью синтезировать интерферон-альфа, обладающий антивирусным и иммуномоделирующим действием [5]. Субалин показал высокую эффективность в животноводстве [6].

Основанием для использования субалина в рыбоводстве служат следующие данные:

- бациллы могут осуществлять свою жизнедеятельность и при более низких температурах в организме пойкилотермных животных, к которым относят и рыб;
- интерфероны, хотя и являются видоспецифическими белками, однако частичная гомология позволяет проявлять, хотя и пониженную, специфическую активность у эволюционно далеко отстоящих видов животных.

Предлагаемый способ лечения и профилактики заболеваемости среди рыб, в частности аэромонозом, заключается в использовании лечебных кормов с добавлением субалина в количестве не менее 100 доз (700 млрд живых бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-4759 в споровой форме) на 1 тонну корма из расчета 5% лечебного корма к массе рыб. Корм дается ежедневно в течение не менее чем 5 дней.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Подавление субалином роста бактерий-возбудителей аэромонозов рыб при совместном культивировании *in vitro*.

Поскольку антагонистические свойства сенной палочки (*Bacillus subtilis*) проявляются на небогащенной питательной среде, испытания проводят на пептонной воде. В пробирки с пептонной водой вносят субалин по 0,04 дозы до конечной концентрации спор 0,008 дозы. После суточного культивирования отмечается помутнение пептонной воды. Во все 8 пробирок вносят взвеси культур аэромонад, патогенных для рыб штаммов, выращенных в течение суток на мясопептонном агаре и смытых физиологическим раствором, и разведенных до концентрации 1 млн кл./мл (всего около 100 тыс.кл.). Для контроля культуры аэромонад высевают в пептонную воду без субалина. Культивирование проводят при 20°C, при этом ежедневно проводят высевы на чашки со средой Эндо для подсчета жизнеспособных аэромонад. Результаты представлены в табл.1.

Результаты, представленные в табл.1, свидетельствуют о том, что бактерии субалина в дозе 0,008/мл активно подавляют рост аэромонад - возбудителей аэромоноза.

Пример 2. Профилактическое действие субалина при экспериментальном заражении рыб в аквариальных условиях.

Материалом для исследования служат сеголетки карпа средней штучной массой 22 грамма, доставленные в аквариальную лабораторную установку из ТХР "Шатурское". Рыб содержат в непроточных аквариумах (при работающих аэраторах) с температурой воды 19-20°C; кормят стандартным рационом. После адаптации (в течение 14 дней) рыб делят на 4 группы: три опытных и одну контрольную, по 20 особей в каждой группе. В опытных группах испытывают действие субалина в различных дозировках. Рыбы контрольной группы препарат не получают. Лечебный корм с субалином готовят перед употреблением следующим образом: ингредиенты корма увлажняют теплой кипяченой водой, тщательно перемешивают и добавляют по каплям водный раствор субалина в разведении 1:5. После перемешивания влажную мешанку скармливают карпам, находившимся в аквариумах.

Норму суточного кормления определяют из расчета 5% корма к массе рыб. Карпов кормят лечебным кормом два дня подряд, затем переходят на обычный рацион. Спустя сутки после двукратного скармливания субалина в смеси с кормом, сеголетков карпа подвергают внутрибрюшному заражению двухсуточной бульонной культурой *A. hydrophila* в дозе 0,2 мл на 1 рыбу, что соответствует 0,2 млрд микробных клеток. За подопытными рыбами наблюдают в течение 12 дней. Учитывают поведенческие реакции рыб, клинические признаки болезни. По окончании опыта проводят анатомическое вскрытие рыб. Поедаемость кормов с добавкой субалина была удовлетворительной; через 5 часов лечебный корм съедался рыбами полностью и не было замечено каких-либо отклонений в поведении рыб или нарушений физиологического статуса.

В контрольной группе первый случай гибели карпов констатировали на третьи сутки после заражения. В двух опытных группах первые случаи гибели рыб отмечены на 4-5 день после заражения аэромонадами. У больных рыб (контрольная группа) отмечали экзофтальмию, общее и локальное ерошение чешуи, выпячивание ануса, асцит, точечные кровоизлияния на поверхности тела и у основания грудных плавников. В опытных группах признаки болезни были выражены менее отчетливо. В третьей опытной группе, где рыбы получали наиболее высокую дозу субалина, гибель карпов отмечена на 9-10 день после заражения. Результаты опытов представлены в табл.2.

Пример 3. Лечебный эффект субалина при аэромонозе рыб.

Эксперименты проводили в нагульных прудах Бисеровского рыбокомбината во время вспышки аэромоноза. Перед производственными испытаниями был проведен клинический осмотр и ихтиопатологическое исследование 100 экземпляров карпа из нагульного пруда. У всех осмотренных рыб отмечена сухость кожного покрова (у зеркальных и чешуйчатых карпов), анемия жабр, гиперемия брюшка, точечные и пятнистые кровоизлияния, единичные язвы на поверхности тела (более чем у 60% осмотренных рыб), воспаления ануса (20% рыб). При анатомическом вскрытии отмечены анемия печени, увеличение объема и дряблость почек, на слизистой кишечника у всех подвергнутых вскрытию рыб очаги точечных и пятнистых кровоизлияний (передний и средний отделы), признаки воспаления плавательного пузыря (у 41% рыб), гиперемия магистральных сосудов

внутренних органов (печени, почек, наружных капилляров кишечника). На основании клинического осмотра и анализа результатов анатомического вскрытия был поставлен диагноз: аэромоноз карпов.

При лечении субалином препарат добавляли в корм, который готовили перед  
5 кормлением. Для разового кормления субалин в количестве 200 доз (700 млрд спор)  
добавляли к 1 тонне корма, предварительно растворив препарат в воде. Кормление  
лечебным кормом проводили в течение 5 дней из расчета 5% лечебного корма к массе  
10 рыб. Температура воды колебалась от 20° до 12,5°С, содержание кислорода составляло от  
2,5 до 3,0 мг/мл. На 12-е сутки после окончания лечебного курса проведен контрольный  
отлов рыбы. Наружным осмотром пролеченной субалином рыбы было установлено, что у  
всех особей поверхность тела равномерно покрыта блестящей, прозрачной слизью; жабры  
темно-вишневого цвета, соответствуют физиологической норме: количество рыб с  
внешними поражениями (язвы, покрытые эпителиальной тканью, гиперемия брюшка,  
выраженный сосудистый рисунок плавников) не превышает 1%. При применении субалина  
15 достигнуто заживление язв, ослизнение кожного покрова, улучшение состояния жаберного  
аппарата; стабилизация функций кишечника и улучшения его ферментативной активности;  
восстановление естественного баланса между нормальной и потенциально патогенной  
микрофлорой кишечника.

Таким образом, предложен высокоэффективный способ лечения и профилактики  
20 заболевания рыб с использованием пробиотического препарата субалина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Навашин С.М. Некоторые экологические аспекты современной химиотерапии: Материалы Всес. семинара "Колонизацион. резистентность и химиотерапевтические антибактериальные препараты". Москва, 28-29 июня 1988 г. - М., 1988.
- 25 2. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. и др. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков и бактерий рода *Bacillus*// Микробиол. журн. - 1993. - 55, 4. - С. 92-112.
3. Карасева Т. А. Эффективность применения биостимуляторов и бактериальных препаратов для борьбы с болезнями заводской молоди семги: Сб. научн. трудов  
30 "Заполярная марикультура". Мурманск, 1994 г.
4. Сорокулова И.Б., Белявская В.А., Масычева В.И., Смирнов В.В. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования для медицины и ветеринарии// Вестник РАМН, 1997, 3, с. 46-49.
5. Патент РФ 1839459, кл. 5 С 12 N 1/21, 1994 г.
- 35 6. Патент РФ 2035185, кл. 5 А 61 К 35/66, 1995 г.

#### Формула изобретения

Способ лечения и профилактики заболеваний рыб, заключающийся в скармливании  
40 рыбам лечебного корма, содержащего пробиотический препарат, отличающийся тем, что в  
качестве пробиотика используют субалин (ветосубалин) из расчета не менее 100 доз (700  
млрд живых бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-4759 в споровой форме) на тонну корма в  
течение пяти дней.

45

50

Т а б л и ц а 1

Подавление субалином роста аэромонад при совместном культивировании in vitro

Номер штамма аэромонад	Время наблюдения, сут							
	1		2		3		4	
	О	К	О	К	О	К	О	К
15	+	+	+	+	-	+	-	+
23	+	+	+	+	-	+	-	+
26	-	+	-	+	-	+	-	+
27	-	+	-	+	-	+	-	+
2ЦНА	+	+	+	+	+	+	-	+
3	+	+	-	+	-	+	-	+

Примечание:

1. О - опыт; К - контроль;

2. (+) - рост; (-) - отсутствие роста.

Т а б л и ц а 2

Эффективность субалина при аэромонозе рыб

Группа рыб	Количество экземпляров	
	выжило	пало
1	8	12
2	13	7
3	18	2
Контроль	3	17