



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/20 (2022.01); A61K 35/74 (2022.01)

(21)(22) Заявка: 2021114586, 24.05.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.05.2021

Дата регистрации:
23.03.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.05.2021

(45) Опубликовано: 23.03.2022 Бюл. № 9

Адрес для переписки:
125167, Москва, Ленинградский пр-кт, 37, корп.
9, оф. 738, ООО "Алтайская
биотехнологическая компания"

(72) Автор(ы):

Джавахи Вахтанг Витальевич (RU),
Глаголева Елена Викторовна (RU),
Овчинников Александр Игоревич (RU),
Карташов Максим Игоревич (RU),
Ревин Павел Игоревич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"Алтайская биотехнологическая компания"
(ООО "Алтбиотех") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2675934 C2, 25.12.2018. RU
2105562 C1, 27.02.1998. SHOAI BE HOSSAIN et
al, Probiotic Strains Used in Aquaculture,
Probiotic strains used in Aquaculture vol, 7 (2),
p.p. 043-055, October, 2018, DOI: [http://dx.doi.org/
10.14303/irjm.2018.023](http://dx.doi.org/10.14303/irjm.2018.023).

(54) КОМБИНИРОВАННЫЙ ПРОБИОТИК ДЛЯ АКВАКУЛЬТУРЫ НА ОСНОВЕ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* И СПОСОБ ЕГО ПРОИЗВОДСТВА

(57) Реферат:

Предложена группа изобретений, относящаяся к биотехнологии и рыбководству: комбинированный пробиотический препарат для использования в выращивании аквакультуры, в состав которого входят штаммы бактерий *Bacillus subtilis* ВКМ В-3154D, *Bacillus subtilis* ВКМ В-3171D, *Bacillus licheniformis* ВКМ-В-3172D, адаптированные к росту в условиях низких температур (температур обитания аквакультур) и одновременно имеющие очень высокую термостабильность; способ получения комбинированного пробиотического препарата. Предложенный препарат содержит смесь биомассы двух штаммов *Bacillus subtilis* и штамма *Bacillus licheniformis* в споровой форме и наполнитель-мальтодекстрин. Способ получения препарата включает раздельное культивирование указанных штаммов на жидкой питательной

среде, концентрирование культуральных жидкостей, сушку концентратов и их смешивание, введение наполнителя-мальтодекстрина в смесь сухих концентратов с получением в готовом препарате не менее 5×10^9 КОЕ/г жизнеспособных бактерий. Группа изобретений обеспечивает получение препарата, на основе штаммов, способных к росту в широком диапазоне температур в споровой форме, которые сохраняют жизнеспособность в неблагоприятных условиях среды, в том числе при высоких температурах, что важно при производстве препарата и обеспечении длительных сроков его хранения. Применение нового комбинированного пробиотика повышает эффективность профилактики и лечения аквакультур и конверсию кормов. 5 н. и 1 з.п. ф-лы, 5 табл., 6 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 768 281** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12N 1/20 (2022.01); A61K 35/74 (2022.01)

(21)(22) Application: **2021114586, 24.05.2021**

(24) Effective date for property rights:
24.05.2021

Registration date:
23.03.2022

Priority:

(22) Date of filing: **24.05.2021**

(45) Date of publication: **23.03.2022 Bull. № 9**

Mail address:

**125167, Moskva, Leningradskij pr-kt, 37, korp. 9,
of. 738, OOO "Altajskaya biotekhnologicheskaya
kompaniya"**

(72) Inventor(s):

**Dzhavakhiya Vakhtang Vitalevich (RU),
Glagoleva Elena Viktorovna (RU),
Ovchinnikov Aleksandr Igorevich (RU),
Kartashov Maksim Igorevich (RU),
Revin Pavel Igorevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"Altajskaya biotekhnologicheskaya kompaniya"
(OOO "Altbiotekh") (RU)**

(54) COMBINED PROBIOTIC FOR AQUACULTURE BASED ON SPORE-FORMING BACTERIA OF THE GENUS BACILLUS AND A METHOD FOR PRODUCTION THEREOF

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; fishing and fish farming.

SUBSTANCE: disclosed is a group of inventions related to biotechnology and fish farming: a combined probiotic preparation for use in aquaculture cultivation, which includes bacterial strains *Bacillus subtilis* VKM B-3154D, *Bacillus subtilis* VKM B-3171D, *Bacillus licheniformis* VKM-B-3172D, adapted to growth in conditions of low temperatures (temperatures of aquaculture habitation) and at the same time having very high thermal stability; method of producing a combined probiotic preparation. Proposed preparation contains a mixture of biomass of two *Bacillus subtilis* strains and *Bacillus licheniformis* strain in spore form and maltodextrin excipient. Method of preparing the preparation involves separate cultivation of said strains on a liquid nutrient medium, concentration of cultural

liquids, drying of concentrates and their mixing, introduction of maltodextrin excipient into a mixture of dry concentrates with obtaining in the finished preparation not less than 5×10^9 CFU/g of viable bacteria.

EFFECT: group of inventions provides a preparation based on strains capable of growth in a wide temperature range in a spore form, which retain viability in unfavorable environmental conditions, including at high temperatures, which is important when producing the preparation and ensuring its long storage life; use of the new combined probiotic increases efficiency of prevention and treatment of aquaculture and feed conversion.

6 cl, 5 tbl, 6 ex

RU 2 768 281 C1

RU 2 768 281 C1

Изобретение относится к биотехнологии и микробиологии, в частности, к технологии получения комбинированного пробиотического препарата на основе штаммов бактерий рода *Bacillus*, способных развиваться при низких температурах, для использования в составе кормов и премиксов при выращивании аквакультур.

5 Спектр патогенов, поражающих аквакультуры, достаточно широк и включает в себя вирусы, бактерии, грибы, а также одноклеточные простейшие и многоклеточные паразиты [1, 2]. Для борьбы с болезнями рыб применимы как профилактические, так и терапевтические меры. В последнем случае, как правило, применяются различные антибиотики; однако их использование несет риск контаминации водной среды,
10 накопления в тканях рыб, а также развития резистентности у патогенных бактерий [3]. Поэтому в последние годы растет интерес к альтернативным методам профилактики и лечения, способным заменить или снизить количество используемых противомикробных препаратов. Одним из таких методов является использование пробиотических бактерий, способных подавлять развитие патогенных микроорганизмов,
15 повышать иммунитет организмов культивируемых гидробионтов и служить источником питательных веществ и полезных ферментов [4, 5]. Пробиотики могут использоваться как в форме отдельных кормовых добавок, так и в составе промышленного корма. К настоящему времени, согласно Директиве Совета 70/524/ЕЕС, в качестве пробиотиков в сельском хозяйстве (в т.ч. для аквакультур) разрешено к применению несколько видов микроорганизмов: *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecium*,
20 *Lactobacillus casei*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Saccharomyces cerevisia*, *Streptococcus infantarius* [8]. Кроме того, постоянно ведется поиск новых потенциальных пробиотиков. Большинство обнаруженных штаммов с пробиотическими свойствами относятся к молочнокислым бактериям (*Lactobacillus*,
25 *Bifidobacterium* и *Carinobacterium*), а также к родам *Brevibacterium*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Roseobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium* и др. (6, 7, 8).

Однако при создании пробиотиков чаще всего используются спорообразующие бактерии, в основном представляющие род *Bacillus* [9]. Эти бактерии продуцируют в
30 кишечнике рыб биологически активные вещества, включая пептиды, обладающие антибактериальным и фунгицидным действием, а их способность к спорообразованию позволяет сохранять жизнеспособность в неблагоприятных условиях среды, в том числе при высоких температурах, что важно при производстве и хранении пробиотических препаратов.

35 В настоящее время существует несколько групп пробиотических препаратов. Наиболее широко применяются многокомпонентные пробиотики, состоящие из нескольких штаммов одного вида или рода или из штаммов микроорганизмов, относящихся к разным видам. Грамотный подбор компонентов позволяет добиться синергизма их действия, обеспечивая усиление или пролонгацию эффекта [10, 11].

40 Существует определенная специфика в создании пробиотиков, применяемых для выращивания аквакультур. Штаммы, входящие в состав пробиотиков должны хорошо расти и развиваться в условиях достаточно низких температур (14-18°C) и быть устойчивыми к воздействию высоких температур, используемых при их производстве (например, при распылительной сушке, гранулировании с комбикормами), хранении.

45 Однако, подавляющее большинство патентов описывают штаммы, температурные оптимумы роста которых лежат в диапазоне 30-37°C. Было выявлено только три патента, связанных со штаммами, лучше приспособленными к функционированию в условиях низких температур.

Так, патент CN 105132310 «Cold-water-fish probiotics Bacillus strain and application thereof» описывает штамм *Bacillus* sp. HZC58, выделенный из ЖКТ радужной форели и характеризующийся антивирусным и иммуномодулирующим действием в отношении холодноводных рыб; несмотря на температурный оптимум роста 30°C, упомянутый
5 штамм способен расти при 4°C и удовлетворительно функционировать в температурном диапазоне 14-18°C.

Второй патент тех же авторов, CN 105039221 «Cold water fish probiotics arthrobacter strain and application thereof» описывает штамм HZC10, относящийся к артробактериям и выделенный из ЖКТ дикой радужной форели. Психрофильный штамм характеризуется
10 иммуномодулирующими свойствами и обеспечивает хороший рост в температурном диапазоне 14-20°C; но, развитие штамма прекращается при температурах, превышающих 20°C.

Третий патент CN 107418905 «Cold-water fish probiotic Lactococcus lactis strain and uses there of», описывает штамм молочнокислой бактерии *L. lactis* HZC32 аналогичного
15 происхождения, обладающий сходными свойствами и адаптированный к температурам 4-18°C; как и в предыдущем случае, нормальный рост и развитие штамма прекращаются при температурах, превышающих 20°C. Следует отметить, что все вышеперечисленные препараты имеют узкий спектр действия, недостаточно высокую эффективность, и низкую термоустойчивость.

Наиболее близким по технической сущности является комплексный препарат на
20 основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* с титром не менее 5×10^9 спор/г (RU 2675934). Препарат характеризуется повышенной ферментативной и антагонистической активностью в отношении болезнетворных микроорганизмов, однако, в его состав входят живые микроорганизмы, имеющие оптимальную температуру роста 37°C, что
25 приводит к сужению сферы его применения не позволяя использовать его для выращивания аквакультур.

Задачей, стоявшей перед авторами, являлось создание нового комбинированного
30 препарата с повышенной эффективностью на основе симбиотических спорообразующих культур, обладающих пробиотическими и антимикробными свойствами, способных к росту при низких температурах, но устойчивых и к повышенным температурам.

Для решения поставленной задачи авторы использовали новые штаммы бактерий: *Bacillus subtilis* ВКМ В-3154D (полученный из коллекционного штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2984), *Bacillus subtilis* ВКМ В-3171D (полученный из коллекционного штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3121), *Bacillus licheniformis* ВКМ-В-3172D (полученный из
35 коллекционного штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ В-10956) способные к росту при низких температурах, обладающие ферментативной и антибактериальной активностью, высокой термостабильностью и депонированные во Всероссийской Коллекции Микроорганизмов (ВКМ) ФГБУН «ИБФМ РАН» Пущино

1. *Bacillus subtilis* (сенная палочка) является антагонистом патогенных и условно-
40 патогенных микроорганизмов, таких как сальмонелла, протей, стафилококки, стрептококки, дрожжевые грибки; продуцирует ферменты, удаляющие продукты гнилостного распада тканей, восстанавливает численность популяций лакто- и бифидобактерий, кишечной палочки и других микроорганизмов, составляющих
45 нормофлору желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и обеспечивающих его нормальное функционирование; синтезирует аминокислоты, витамины и иммуноактивные вещества. При создании нового комплексного препарата использовали штамм *Bacillus subtilis* с индексом АВ-15, обладающий протеолитической и антибактериальной активностью и полученный направленной селекцией на понижение температуры роста из

коллекционного штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2984.

2. Вторым штаммом для создания нового пробиотика выбран штамм *Bacillus subtilis* с индексом АВ-1750, обладающий амилалитической и антибактериальной активностью и полученный направленной селекцией на понижение температуры роста из

коллекционного штамма *Bacillus subtilis* ВКПМВ-3121.

3. *Bacillus licheniformis* продуцирует ряд белков, пептидов, ферментов и витаминов, способствует выработке организмом интерферона, которые уничтожают патогенные микробы и вирусы, приводя к нормализации микрофлоры кишечника, способствуют перевариванию пищи, снимают пищевые и химические отравления.

При создании нового пробиотика использовали штамм *Bacillus licheniformis* АВ-1751, полученный направленной селекцией на понижение температуры роста из коллекционного штамма *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-10956, обладающий всеми перечисленными выше свойствами и обладающий устойчивостью к действию антибиотика окситетрациклина, широко используемого в ветеринарии и при выращивании аквакультур.

Следующим этапом решения поставленной задачи было отдельное культивирование полученных штаммов в жидкой питательной среде с глюкозой и дрожжевым автолизатом при рН 6,8-8,5 и температуре 15-18°C и концентрирование культуральных жидкостей путем центрифугирования.

Затем проводили распылительную сушку полученных концентратов, смешивали полученные сухие биомассы штаммов между собой в соотношении 1:1:1 с последующей добавкой мальтодекстрина до 100% массы целевого продукта.

В результате получен комбинированный пробиотический препарат с общим содержанием жизнеспособных бактерий не менее 5×10^9 КОЕ/г.

Технический результат достигнут созданием группы изобретений включающий:

1. Новые спорообразующие штаммы *Bacillus subtilis* ВКМ В-3154D, *Bacillus subtilis* ВКМ В-3171D, *Bacillus licheniformis* ВКМ-В-3172D, способные расти при пониженной температуре и при этом обладающие высокой термостабильностью;

2. Комбинированный пробиотический препарат для использования в выращивании аквакультуры, содержащий смесь биомассы штаммов *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* в споровой форме и наполнитель-мальтодекстрин, отличающийся тем, что содержит смесь биомассы штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3154D, *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3171D, и *Bacillus licheniformis* ВКМ-В-3172D в соотношении 1:1:1 с общим количеством

жизнеспособных бактерий в готовом препарате не менее 5×10^9 КОЕ/г.

3. Способ получения целевого препарата включающий получение штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3154D, *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3171D, *Bacillus licheniformis* ВКМ-В-3172D, отдельное культивирование данных штаммов в жидкой питательной среде с глюкозой и дрожжевым автолизатом при рН 6,8-8,5, и температуре 15-18°C, концентрирование культуральных жидкостей путем центрифугирования, распылительную сушку полученных концентратов, смешивание полученной сухой биомассы штаммов между собой в соотношении 1:1:1 с последующей добавкой мальтодекстрина до 100% массы целевого продукта, приводящей к получению препарата с общим содержанием жизнеспособных бактерий не менее 5×10^9 КОЕ/г.

Отличительными свойствами нового комбинированного пробиотического препарата являются:

- широкий спектр действия по отношению к патогенным бактериям;
- устойчивость к действию антибиотика окситетрациклина, широко используемого

при выращивании аквакультуры.

- возможность бактерий входящих в его состав расти при пониженных температурах (15-18°C),

- высокая термостабильность (табл. 6);

5 - высокое качество при хранении (табл. 5);

Практическое применение.

В результате проведенных исследований по применению препарата в технологии выращивания мальков нильской тилляпии (*Oreochromis niloticus*), масса поголовья тилляпий увеличилась с 54,90 г до 272,30 г в контрольной группе (не содержащей пробиотик в корме), с 55,60 г до 300,90 г в опытной группе №1 (содержание пробиотика в корме 0,5 кг/г) и с 54,70 г до 347,57 в группе опытной №2 (содержание пробиотика в корме 1 кг/г).

В целом за опыт в 1 опытной группе оплата корма продукцией (приростом) составила 152,97±54,13 г, что на 19,45 г, или 14,57% выше по сравнению с аналогами из контрольной группы. 2 опытная группа превосходила по данному показателю сверстниц из контрольной группы на 25,57 г, или 19,15%. Экстерьерные показатели рыбы соответствовали общестатистическим значениям развития тилляпий в данном возрастном периоде. Коэффициент упитанности тилляпий составил от 2,3 до 2,7, что соответствует нормативным требованиям и может свидетельствовать об оптимальных параметрах функционирования организма рыб.

При исследовании эффективности препарата при кормлении сеголеток русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833) было установлено, что наилучшие показатели роста и выживаемости были характерны для группы рыб, потреблявшей корма с добавлением 1 г/кг пробиотика. В данных вариантах наблюдался высокий среднесуточный прирост массы и коэффициент массонакопления. Так, самый высокий показатель среднесуточной скорости роста русского осетра был 1,39%, что на 0,36% выше, чем в контрольной группе, потреблявшей комбикорм без пробиотика. Выживаемость в опытной группе с 1 г/кг пробиотика была 100%-ной. Также положительное влияние отразилось на кормовом коэффициенте, который уменьшился по сравнению с контролем на 0,3-0,2 ед.

Применение пробиотика в кормлении янтарной форели показало, что наилучшими показателями живой массы в конце опыта отличались рыбы опытной группы, потреблявшие корма с добавлением 1 г/кг пробиотика, они превосходили аналогов из контрольной группы по данному показателю на 6,21%. По абсолютному и относительному приросту живой массы, так же доминировали представители опытной группы. Янтарная форель опытной группы превосходила аналогов из контрольной группы на 8,74%.

Абсолютный прирост живой массы так же был выше в опытной группе и составил 370,7, что выше в сравнении с контрольной группой на 25,5. Наибольший интерес вызывают данные по выживаемости. В контрольной группе данный показатель оказался самым низким и составил 80,3%. Наибольшая выживаемость была отмечена опытной группой - 88,3%. Суммарная ихтиомасса в конце опыта по группам составила контрольная - 4,742 кг, опытная - 5,467 кг.

Впервые изучено влияние кормовой добавки на продуктивность австралийского красноклешневого рака, затраты кормов на единицу прироста массы раков, товарные качества продукции. Среднесуточный прирост в опытной группе был выше в сравнении с контрольной группой на 6,7%. В контрольной группе на 1 кг прироста живой массы было затрачено корма в сравнении с опытными группами больше на 8,9%.

Существенный вклад в снижении затрат корма в пересчете на конечную товарную продукцию оказала более высокая выживаемость раков в опытных группах.

Важнейшим показателем, определяющим экономическую целесообразность выращивания товарной продукции ракообразных в условиях замкнутого водообеспечения является эффективность использования площади бассейнов и технологического оборудования, т.к. затраты связанные с нагревом воды и водооборотом, в данных системах, могут составлять до 70% от всех затрат.

По результатам исследований производство продукции на 1 м² в опытной группе была выше чем контрольной на 27,7%.

Сущность заявляемой группы изобретений иллюстрируются, но не ограничивается следующими примерами.

Пример 1.

Получение штаммов: *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3154D, *Bacillus subtilis* ВКМ-В-317 ID, и *Bacillus licheniformis* ВКМ-В-3172D.

Для последовательной селекции и получения штаммов микроорганизмов, обладающих высокой биологической активностью и хорошей скоростью роста при температурах 15-18°C, были использованы исходные штаммы *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3121, *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-10956, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3679.

Питательные среды.

Для хранения микроорганизмов и последующей низкотемпературной селекции использовались следующие питательные среды:

№1 (ГРМ-агар), (г/л): панкреатический гидролизат рыбной муки - 12.0, пептон ферментативный - 12.0, натрия хлорид - 6.0, агар микробиологический 17.0. рН среды 7.1-7.5.

№2 (питательный агар), (г/л): пептический перевар животной ткани - 5.0, натрия хлорид - 5.0, мясной экстракт - 1.5, дрожжевой экстракт - 1.5, агар микробиологический - 17.0. рН среды 7.6-7.2.

Первый этап - получение бациллярных штаммов, обладающих активным ростом при температуре 24°C.

На первом этапе суспензию клеток штаммов в количестве 100 мкл, полученную последовательным разведением, рассеивали на чашки с питательной средой и помещали в термостат с температурой 24°C. Чашки с контрольным разведением помещали в термостат с температурой 37°C. В контрольных чашках появление моноколоний уже можно было наблюдать через 6-8 ч инкубации при температуре 37°C, и через 24 ч были получены моноколонии.

При температуре 24°C начальный рост первой генерации на чашках был отмечен через 22-24 ч, и через 48-50 ч наблюдался рост колоний аналогичный контролю.

Самые быстрорастущие крупные колонии, диаметр которых составлял 3-5 мм, были отобраны для последующего посева. Чашки Петри помещены в термостат с температурой 24°C. Через 2 суток был получен газон бациллярных культур, который был использован для получения моноспорового посева - 2 генерация. Указанная последовательность действий была повторена многократно до тех пор, пока не были получены микроорганизмы, дающие активный рост на чашках с питательной средой №2 через 26-28 ч культивирования. Результаты селекции представлены в таблице 1.

45

Таблица № 1.

Последовательность генераций	Время появления роста, ч	Общее время роста, ч
1-4	25-28	48-52
5-7	18-20	38-40
8-10	10-12	26-28

Полученным микроорганизмам, обладающим активным ростом при 24-26°C в течение 24 ч, были присвоены лабораторные номера *Bacillus subtilis* АВ-24/41, *Bacillus licheniformis* АВ-24/38, *Bacillus subtilis* АВ-24/43.

В ходе работы по получению бациллярных культур, устойчивых к низким температурам, мы столкнулись явлением диссоциации, т.е. расщеплением однородной популяции бактерий на варианты, различающиеся генетическими, физиолого-биохимическими и морфологическими свойствами, в том числе и по способности к синтезу практически ценных метаболитов. Полученные диссоцианты различались по морфологии колоний: R имели шероховатый тип колоний, S - гладкий тип колоний.

Гетероморфизм был обусловлен влиянием неблагоприятного фактора -низкой температурой.

Еще одним фактором, влияющим на диссоциацию культур, является состав питательных сред для культивирования.

При выращивании на агаризованных средах №1 и №2 процесс диссоциации культур был характерен при выращивании на питательном агаре (среда №2), тогда как на среде №1 наблюдался более быстрый рост колоний и моноколонии бациллярных культур по морфологическим признакам выглядели однородно. Поэтому работы по дальнейшей селекции и поддержанию полученных низкотемпературных штаммов вели на среде №1.

Цель следующего этапа - получение бациллярных штаммов, обладающих высокой скоростью роста при температуре 15°C. Для этого были взяты полученные на первом этапе штаммы бациллярных микроорганизмов.

Полученную последовательным разведением споровую суспензию в количестве 100 мкл рассеивали на чашки с питательной средой и помещали в термостат с температурой 15°C.

Первый рост колоний при данной температуре был зафиксирован на 90-94 ч роста штаммов, полноценный рост колоний при указанной температуре был отмечен через 142-144 ч.

Полученные при температуре 15°C моноколонии с максимальным диаметром 3-4 мм были рассеяны на чашки с питательной средой и инкубированы в термостате при 15°C в течение 6 суток.

Указанная процедура была повторена многократно. Через 8 поколений активный рост при 15°C наблюдался через 86-92 ч, а еще через 6 поколений активный рост на чашках фиксировался через 28-30 ч. Результаты селекции представлены в таблице 2.

Таблица № 2.

Последовательность generаций	Время появления роста, ч	Общее время роста, ч
1-4	88-94	135-144
5-8	48-52	86-92
9-14	13-15	28-30

Полученным штаммам, обладающим активным ростом при 15°C в течение 28-30 ч, были присвоены лабораторные номера *Bacillus subtilis* АВ-15, *Bacillus subtilis* АВ-1750.

Дополнительно, штамм *Bacillus licheniformis* подвергался ненаправленному УФ мутагенезу для придания ему устойчивости к антибиотику окситетрациклину, широко используемому для лечения аквакультур. Водную суспензию спор помещали на расстояние 40 см от УФ лампы (Mineralight, мощность 12,5 Вт с длиной волны 210 нм),

при этом интенсивность излучения лампы составляла 0,25 мВт/см². В полученной суспензии при помощи камеры Горяева - Тома подсчитывали концентрацию спор. При

необходимости суспензию разводили до концентрации (1,5-2)*10⁶ спор/см³. После

подсчета и разведения суспензия подвергалась облучению в открытой чашке Петри. Посев производили на предварительно подготовленные чашки Петри со средой БТН, с добавлением окситетрациклина состава, г/л: мясной пептон - 20; дрожжевой экстр. - 3;0 NaCl - 5;0, окситетрациклин - 30 мг/л, агар - 20. Чашки инкубировали при температуре 15°C в течение 2-3 суток.

Колонии с измененной морфологией визуально отбирали и пересевали на свежую агаризованную среду, содержащую сублетальную для исходного штамма дозу окситетрациклина (100 мг/л). Выросшие на такой среде наиболее крупные изолированные колонии отбирали для дальнейшего культивирования на среде, содержащей различные концентрации окситетрациклина. В результате был отобран штамм, устойчивый к антибиотику окситетрациклину в минимально ингибирующей концентрации >100 мг/л.

Полученному штамму, обладающему активным ростом при 15°C в течение 28-30 ч, и устойчивостью к окситетрациклину был присвоен лабораторный номер *Bacillus licheniformis* АВ-1751. Характерные признаки штамма *Bacillus subtilis* с индексом АВ-15.

I. Культурально-морфологические и микроскопические особенности штамма. Клетки палочки с закругленными концами, прямые и слегка изогнутые, расположены поодиночке и в цепочках. Споры овальные, гладкие. Грам-положительные. На 24 ч роста образует на среде На L-среде колонии округлой формы с волнистым краем, морщинистые, матовые, выпуклые, серовато-белого цвета.

II. Физиолого-биохимические. Факультативный аэроб, оптимальная температура культивирования 15-37°C, рН среды 6,8-7,0. Каталазо-положительный. Ферментирует глюкозу, сахарозу, мальтозу, маннит, лактозу. Синтезирует амилазу и эндогликоназу. Продуцирует высокоактивный комплекс протеолитических ферментов, в состав которого входит кazeиназа, эластаза, коллагеназа.

III. Данные молекулярно генетического анализа. К роду и виду отнесен на основании исследования морфологии, физиолого-биохимических свойств, секвенирования генов 16S РНК. Культура идентифицирована в лаборатории молекулярной диагностики

Института Биоинженерии РАН (ЦКП). По данным RDPClassifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier>), исследованный образец принадлежит к представителям рода *Bacillus* на уровне сходства нуклеотидных последовательностей генов 16SpРНК 95%.

5 Описание режима хранения штамма: Культуру поддерживают на среде LB среда, %: триптон - 1.0; дрожжевой экстракт - 0.1; NaCl - 1.0; агар-агар - 2.0; вода дистиллированная до 100, с пересевом не реже 1 раза в месяц, хранят на МПА и ГРМ. Культура хорошо хранится при замораживании (-70°C) в 40% глицерине, в лиофилизированном состоянии (защитная среда - обезжиренное молоко).

10 Отобранный штамм *Bacillus subtilis* с индексом АВ-15 депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Скрыбина РАН под номером ВКМ-В-3154D.

Характерные признаки штамма *Bacillus subtilis* с индексом АВ-1750.

I. Культурально-морфологические: Клетки палочки, расположенные одиночно, парами и цепочками. Споры овальные, не превышающие размер клетки, расположены центрально. Грамположительные. Колонии серовато-белого цвета, матовые.

15 II. Физиолого-биохимические: Факультативный аэроб, оптимальная температура культивирования 15-37°C, рН среды 6,8-8,5. Каталазо-положительный. Проявляет протеолитическую и амилолитическую активность - гидролизует крахмал до декстринов. Ферментирует глюкозу, сахарозу, мальтозу, маннит, лактозу.

20 III. Данные молекулярно генетического анализа: К роду и виду отнесен на основании исследования морфологии, физиолого-биохимических свойств (Bergey's manual, 1993), секвенирования генов 16S рРНК. Культура идентифицирована в лаборатории молекулярной диагностики Института Биоинженерии РАН (ЦКП). Уровень сходства с ближайшим типовым штаммом вида *Bacillus subtilis* DSM 10 - 95%.

25 Описание режима хранения штамма: Культуру поддерживают на среде LB среда, %: триптон - 1.0; дрожжевой экстракт - 0.1; NaCl - 1.0; агар-агар - 2.0; вода дистиллированная до 100, с пересевом не реже 1 раза в месяц, хранят на МПА и ГРМ. Культура хорошо хранится при замораживании (-70°C) в 40% глицерине, в лиофилизированном состоянии (защитная среда - обезжиренное молоко).

30 Отобранный штамм *Bacillus subtilis* с индексом АВ-1750 депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Скрыбина РАН под номером ВКМ-В-3171D.

Характерные признаки штамма *Bacillus licheniformis* с индексом АВ-1751.

35 I. Культурально-морфологические: Палочки размером 2-5 мкм. Грамположительен. Образует споры одиночные, центральные или овальные. На среде МПА образует колонии кремового цвета.

40 II. Физиолого-биохимические: Факультативный аэроб, оптимальная температура культивирования 15-37°C, рН среды 6,8-8,5. Используемые источники углерода при аэробном росте: глюкоза, мальтоза. Окисляемые неорганические субстраты: сера, тиосульфат, железо, аммоний, нитрит. Сбраживаемые источники углерода: глюкоза, мальтоза, сахароза. Отношение к рН: 5,0-8,0. Отношение к NaCl: рост до 7% NaCl.

45 III. Данные молекулярно -генетического анализа: К роду и виду отнесен на основании исследования морфологии, физиолого-биохимических свойств (Bergey's manual, 1993), секвенирования генов 16S рРНК. Культура идентифицирована в лаборатории молекулярной диагностики Института Биоинженерии РАН (ЦКП). Уровень сходства с ближайшим типовым штаммом вида *Bacillus licheniformis* DSM 13 - 95%.

Хранение штамма:

Культуру поддерживают на среде LB среда, %: триптон - 1.0; дрожжевой экстракт - 0.1; NaCl - 1.0; агар-агар - 2.0; вода дистиллированная до 100, с пересевом не реже 1

раза в месяц, хранят на МПА и ГРМ. Культура хорошо хранится при замораживании (-70°C) в 40% глицерине, в лиофилизированном состоянии (защитная среда - обезжиренное молоко).

5 Отобранный штамм *Bacillus licheniformis* с индексом АВ-1751 депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Скрябина РАН под номером ВКМ-В-3172D.

Пример 2

Получение сухой биомассы штаммов *B. subtilis* ВКМ В-3154D, *B. subtilis* ВКМ В-3171 и *B. licheniformis* ВКМ В-3172D

10 Посевной материал в колбах для штаммов *B. subtilis* ВКМ В-3154D, *B. subtilis* ВКМ В-3171 и *B. licheniformis* ВКМ В-3172D готовится на одинаковых средах, поэтому приведена общая схема приготовления посевного материала. Выращивание посевного материала для ферментера осуществляют в одну генерацию в колбах емкостью 1000 мл и 2000 мл.

15 Среда для выращивания посевного материала, г/л

	1. Пептон	3 г
	2. Дрожжевой экстракт	5 г
	3. Глюкоза	15 г
	4. NaH ₂ PO ₄	1,0 г
20	5. K ₂ HPO ₄	4,0 г
	6. MgSO ₄	0,25 г
	7. CaCl ₂	1,0 г
	8. NaCl	1,0 г
	9. MnSO ₄	0,03 г
25	10. FeSO ₄	0,01 г
	11. Вода дистиллированная	до 1 л

pH 7,0-7,2.

Для приготовления вегетативного посевного материала в колбах используют рабочую партию посевного материала в пробирках, в котором отсутствует посторонняя микрофлора, морфологически однороден, со сроком хранения не более 15 дней с момента приготовления. Засеянные колбы помещают на качалочную установку со скоростью перемешивания 220-250 об/мин, эксцентриситетом 5 см, и выращивают при температуре 18±1°C от 24 до 48 часов. В живом препарате должна быть масса подвижных и неподвижных палочек с закругленными краями без признаков дифференциации. В окрашенном препарате - масса палочек, протоплазма которых, окрашена нейтрально. Значение водородного показателя должно быть от 5,8 до 6,8 pH. Культивирование штаммов-продуцентов в 1.0 м³ ферментерах.

Среда для культивирования *B. subtilis* ВКМ В-3154D, *B. subtilis* ВКМ В-3171D г/л

40	1. Глюкоза	10 г
	2. Дрожжевой автолизат	15 г
	3. K ₂ HPO ₄	0,2 г
	4. MgSO ₄	0,2 г
	5. K ₂ SO ₄	0,1 г
45	6. MnSO ₄	0,05 г
	7. NH ₄ NO ₃	0,2 г
	8. NaCl	0,2 г
	9. пеногаситель	0,25 мл
	10. Вода водопроводная	до 1 л

Стерилизация среды в ферментере при $122 \pm 1^\circ\text{C}$ 45 ± 5 мин

pH перед посевом - 6,9-7,1

Среда для культивирования *Bacillus licheniformis*: ВКМ В-3172D г/ л

5	1. Глюкоза	15 г
	2. Дрожжевой автолизат	20 г
	3. K_2HPO_4	0,2 г
	4. MgSO_4	0,2 г
	5. K_2SO_4	0,1 г
	6. MnSO_4	0,05 г
10	7. NH_4NO_3	0,2 г
	8. NaCl	0,2 г
	9. пеногаситель	0,25 мл
	10. Вода водопроводная	до 1 л

Стерилизация среды в ферментере при $125 \pm 1^\circ\text{C}$ 45 ± 5 мин

15 pH перед посевом - 6,9-7,1

Ферментацию штаммов *B. subtilis* ВКМ В-3154D, *B. subtilis* ВКМ В-3171D и *B. licheniformis* ВКМ В- 3172 проводят на соответствующих средах при pH 6,8-8,5 и

20 температуре $18 \pm 1^\circ\text{C}$, расходе воздуха $(100-150)\text{дм}^3$ в минуту, скорости перемешивания 50-200 об/мин; pO_2 - 30-50% в фазе интенсивного роста культуры. В конце процесса заспоронность клеток составляет 93-95%.

Культуральная жидкость штаммов *B. subtilis* ВКМ В-3154D, *B. subtilis* ВКМ В-3171D должна отвечать следующим требованиям:

25 - Содержание в культуральной жидкости не менее 80% свободных от общего количества спор;

	Оптическая плотность КЖ	20 ± 2 ОП (600 нм, кювета 1=5 мм)
	Посторонняя микрофлора	Не допускается
	Значение pH	$8,5 \pm 0,2$
	содержание редуцирующих веществ	$(0,1 \pm 0,05)\%$
30	содержание жизнеспособных спор	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{10}$ КОЕ/мл

Культуральная жидкость штамма *B. licheniformis* ВКМ В- 3172 D должна отвечать следующим требованиям:

35 - Содержание в культуральной жидкости % свободных от общего

	количества спор;	не менее 80%
	Оптическая плотность КЖ	18 ± 2 ОП (600 нм, кювета 1=5 мм)
	Посторонняя микрофлора	Не допускается
	Значение pH	$8,5 \pm 0,2$
	содержание редуцирующих веществ	$(0,1 \pm 0,05)\%$
40	содержание жизнеспособных спор	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^{10}$ КОЕ/мл

По окончании культивирования штаммов *B. subtilis* ВКМ В-3154D, *B. subtilis* ВКМ В-3171D и *B. licheniformis* ВКМ В- 3172D культуральные жидкости концентрируют на высокоскоростной центрифуге с периодической выгрузкой концентрата.

45 Центрифугирование культуральной жидкости проводят при скорости вращения ротора - 15000 об/мин. Скорость подачи культуральной жидкости $130-150 \text{ л}^3/\text{ч}$. Содержание сухих веществ в полученном концентрате биомассы - 25-30%.

По окончании центрифугирования концентраты биомассы штаммов *B. subtilis* ВКМ

B-3154D, *B. subtilis* ВКМ В-3171D, и *B. licheniformis* ВКМ В-3172D подвергают распылительной сушке.

Режимы сушки: Температура на входе в сушильную камеру-130°C; Температура на выходе из сушильной камеры-75°C.

5 Высушенная биомасса содержит не более 5% влаги, выход в расчете на культуральную жидкость 65-66,5%. Содержание жизнеспособных бактерий *Bacillus subtilis* ВКМ В-3154D, *Bacillus subtilis* ВКМ В-3171D и *Bacillus licheniformis* ВКМ В-3172D - не менее $5,0 \times 10^{11}$ КОЕ/г.

Пример 3

10 Получение целевого продукта

Для получения целевого продукта используют смеситель периодического действия.

В смеситель загружают сухие биомассы штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ В-3154D, *Bacillus subtilis* ВКМ В-3171D *Bacillus licheniformis* ВКМ В-3172D, в количестве 335 ± 5 грамм каждого штамма, и перемешивают в течение 20 минут. После этого загружают 15 99 ± 0.1 кг мальтодекстрина, перемешивают еще 30 минут и получают 100 ± 0.2 кг целевого продукта с содержанием жизнеспособных бактерий на уровне 5×10^9 КОЕ/г.

Пример 4.

Изучение стабильности нового пробиотика.

20 Была изучена стабильность смеси штаммов и готовой формы пробиотика методом естественного хранения при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ во влагонепроницаемом бумажном пакете с полимерным покрытием.

Полученные результаты приведены в таблицах 3, 4.

Полученные результаты показывают, что после хранения смеси сухих штаммов, 25 составляющих основу нового пробиотика, при комнатной температуре на протяжении 24 мес. содержание жизнеспособных бактерий остается на высоком уровне. Активность этих смесей биомасс в составе препарата (т.е. в присутствии наполнителя) также изменяется очень незначительно.

Пример 5.

30 Изучение термостабильности нового пробиотика при приготовлении комбикормов.

Цель - определить сохранность жизнеспособных клеток микроорганизмов, входящих в состав пробиотика, при приготовлении комбикормов.

Для испытаний выбрали 3 варианта комбикорма.

Вариант 1 - комбикорм без пробиотической добавки.

35 Вариант 2 - комбикорм с внесением 0,5 кг/т пробиотической добавки.

Вариант 3 - комбикорм с внесением 1 кг/т пробиотической добавки.

Полученные результаты приведены в таблице 5.

40 Прогревание комбикорма в течение 20 минут при 85°C , 100°C , 120°C в сухом виде существенно не влияет на выживаемость микроорганизмов, входящих в состав нового комбинированного пробиотика. Препарат можно вводить в состав комбикормов для всех видов сельскохозяйственных животных, птицы и рыбы без потери жизнеспособности при гранулировании, экструдировании.

Пример 6.

45 Исследование острой пероральной и хронической токсичности пробиотика на лабораторных животных.

Для изучения параметров острой пероральной токсичности пробиотика были сформированы 2 опытные и 1 контрольная группы белых беспородных крыс-самцов массой 160-170 г. На крысах были испытаны дозы 9730 (1 опытная группа) и 8108 (2 опытная группа) мг/кг. Для удобства введения пробиотик в количестве 20,0 г разводили

в 25 мл 1% крахмального геля, тщательно перемешивали в фарфоровой чаше с пестиком. Затем данную суспензию вводили однократно с помощью внутрижелудочного зонда в дозах 1,8 и 1,5 мл на 100 г массы животного, что соответствует 9730 и 8108 мг/кг.

Животным контрольной группы вводили питьевую воду в дозе 1,8 мл на 100 г. В течение 14 суток после однократной дачи пробиотика проводили наблюдение за общим состоянием и поведением животных, возможной гибелью, а также проявлением симптомов интоксикации. Контроль массы тела животных опытных и контрольной групп проводили в день постановки опыта (до введения кормовой добавки), а также на 1, 3, 7, 9 и 14 сутки.

У крыс опытных групп не выявлено признаков интоксикации и гибели. Общее состояние животных было удовлетворительным, изменений в поведении не отмечали, аппетит и жажда не были изменены, судороги не наблюдались; координация движений не была нарушена; реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители была адекватной; целостность кожного покрова не была нарушена, эластичность сохранена, гиперемия отсутствовала; окраска видимых слизистых оболочек соответствовала норме; частота и глубина дыхательных движений, а так же ритм сердечных сокращений не были изменены. Животные, получившие пробиотик в дозах 9730 и 8108 мг/кг, равномерно набирали живую массу в течение опыта. В результате не выявлено достоверной разницы показателей процента прироста живой массы у крыс опытных групп по сравнению с контрольными особями.

Хроническую токсичность пробиотика изучали на 30 крысах-самцах исходной массой 210-240 г. Были сформированы 2 опытные и 1 контрольная группы по 10 голов в каждой. Пробиотик вводили внутрижелудочно 1 раз в сутки ежедневно в течение 180 дней. На крысах были испытаны дозы 1946 и 973 мг/кг (1/5 и 1/10 от максимально возможной для введения в желудок по результатам острого опыта). Для удобства введения пробиотик в количестве 10,0 г разводили в 24 мл 1% крахмального геля, тщательно перемешивали в фарфоровой чаше с пестиком. Затем данную суспензию вводили однократно с помощью внутрижелудочного зонда в дозах 0,58 и 0,29 мл на 100 г массы животного, что соответствует 1946 и 973 мг/кг. Животным контрольной группы вводили питьевую воду в дозе 0,6 мл на 100 г.

В течение всего периода применения пробиотика вели наблюдение за общим состоянием и поведением животных, реакцией на раздражители (звук, свет), проявлением симптомов интоксикации, возможной гибелью. На 0, 30, 60, 90, 120, 180, 181 и 191 сутки опыта регистрировали массу тела животных.

В результате клинического осмотра животных в течение эксперимента не были выявлены признаки интоксикации у животных опытных групп.

Общее состояние крыс оставалось удовлетворительным, изменений в поведении не отмечено, аппетит и жажда не были изменены, судороги не наблюдались; координация движений не была нарушена; тонус скелетных мышц соответствовал норме; реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители была адекватной; целостность кожного покрова не была нарушена, эластичность сохранена, гиперемия отсутствовала; окраска видимых слизистых оболочек соответствовала норме; частота и глубина дыхательных движений, а также ритм сердечных сокращений не были изменены. На 30 сутки опыта выявлено статистически достоверное увеличение живой массы опытных групп в сравнении с контрольным аналогом. Однако, в остальные периоды взвешивания масса тела животных, получавших дозы 1946 и 973 мг/кг, статистически достоверно не отличалась от аналогичных показателей контрольной группы.

Таким образом, установлено, что LD50 пробиотика при однократном пероральном введении крысам составляет более 9730 мг/кг массы животного. Согласно общепринятой гигиенической классификации исследуемый пробиотик относится к 4 классу опасности (ГОСТ 12.1.007-76) (вещества малоопасные).

5 В хроническом опыте на крысах установлено, что дозы 1946 и 973 мг/кг являются не действующими.

Приложение.

10 Таблица 3. Содержание жизнеспособных бактерий смеси высушенных штаммов в процессе хранения.

Смесь штаммов <i>Bacillus subtilis</i> ВКМ В-3154D, <i>Bacillus subtilis</i> ВКМ В-3171D и <i>Bacillus licheniformis</i> ВКМ В-3172D				
Содержание жизнеспособных бактерий КОЕ/г				
При изготовл.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
(7,3±0,5)×10 ¹¹ КОЕ/г	(6,9±0,5)×10 ¹¹ КОЕ/г	(6,5±0,5)×10 ¹¹ КОЕ/г	(6,0±0,5)×10 ¹¹ КОЕ/г	(5,7±0,5)×10 ¹¹ КОЕ/г

25 Таблица 4. Содержание жизнеспособных бактерий в готовой форме пробиотика в процессе хранения.

Готовая форма пробиотика				
Содержание жизнеспособных бактерий КОЕ/г				
При изготовлении	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
(5.8 ±0,5) ×10 ⁹ КОЕ/г	(5,8±0,5)×10 ⁹ КОЕ/г	(5.6±0,5) ×10 ⁹ КОЕ/г	(5,4±0,3) ×10 ⁹ КОЕ/г	(5.2±0,2) 10 ⁹ КОЕ/г

Таблица 5.Содержание жизнеспособных бактерий в комбикорме при прогревании в течение 20 минут при 85⁰С, 100⁰С, 120⁰С.

№		КОЕ/г без прогрева	Среднее значение	КОЕ/г при прогреве 85 ⁰ С 20 мин.	Среднее значение	КОЕ/г при прогреве 100 ⁰ С 20 мин.	Среднее значение	КОЕ/г при прогреве 120 ⁰ С 20 мин.	Среднее значение
1	0,5 кг/т	2,88 x10 ⁶	2,85 x10⁶ (100%)	2,84 x10 ⁶	2,83 x10⁶ (99%)	2,74 x10 ⁶	2,67 x10⁶ (93,7)	2,58 x10 ⁶	2,57 x10⁶ (90,3%)
2	0,5 кг/т	2,85 x10 ⁶		2,9 x10 ⁶		2,62 x10 ⁶		2,53 x10 ⁶	
3	0,5 кг/т	2,84 x10 ⁶		2,77 x10 ⁶		2,66 x10 ⁶		2,61 x10 ⁶	
4	1,0 кг/т	5,96 x10 ⁶	5,91 x10⁶ (100%)	5,81 x10 ⁶	5,81 x10⁶ (98,3%)	5,58 x10 ⁶	5,59 x10⁶ (94,5%)	5,22 x10 ⁶	5,34 x10⁶ (90,35%)
5	1,0 кг/т	5,85 x10 ⁶		5,80 x10 ⁶		5,52 x10 ⁶		5,36 x10 ⁶	
6	1,0 кг/т	5,92 x10 ⁶		5,82 x10 ⁶		5,67 x10 ⁶		5,44 x10 ⁶	

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Bondad-Reantaso M.G., Subasinghe R.P., Arthur J.R., Ogawa K., Chinabut S., Adlard R., Tan Z., Shariff M. Disease and health management in Asian aquaculture // *Veterinary Parasitology*. - 2005. - V. 132. - P. 249-272.
2. Owens L. Diseases / In: *Aquaculture: farming aquatic animals and plants*. Oxford: Fishing News Books, 2003. - P. 199-214.
3. Яворская Т.А., Серова Е.С. Важность и перспектива применения пробиотиков в аквакультуре // *Молодежный научный вестник* - 2017. - №12. - С. 111-117.
4. Newaj-Fyzul A., Austin B. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases // *Journal of Fish Diseases*. - 2015. - V. 38. - P. 937-955.
5. Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. - 2000. - V. 64. - P. 655-671.
6. Sharifuzzaman S.M., Austin B. Probiotics for disease control in aquaculture / In: *Diagnosis and control of diseases of fish and shellfish (1st ed.)*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017, p. 189-222.
7. Zorriehzahra M.J., Delshad S.T., Adel M., Tiwari R., Karthik K., Dhama K., Lazado C.C. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review // *Veterinary Quarterly*. - 2016. - V. 36(4). - P. 228-241.
8. Balcazar J.L., de Bias I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D., Muzquiz J.L. The role of probiotics in aquaculture // *Veterinary Microbiology*. - 2006. - V. 114. - P. 173-186.
9. Hai N.V., Fotedar R. A review of probiotics in shrimp aquaculture // *Journal of Applied Aquaculture*. - 2010. - V. 22. - P. 251-266.
10. Timmerman H.M., Koning C.J.M., Mulder L., Rombout F.M., Beynen A.C. Monospecies, multistrain and multispecies probiotics: a comparison of functionality and efficacy // *International Journal of Food Microbiology*. - 2004. - V. 96. - P. 219-233.
11. Aly S.M., Ahmed Y.A.G., Ghareeb A.A.A., Mohamed M.F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections // *Fish and Shellfish Immunology*. - 2008. - V. 25. - P. 128-136.

(57) Формула изобретения

1. Комбинированный пробиотический препарат для использования в выращивании

аквакультуры, содержащий смесь биомассы штаммов *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* в споровой форме и наполнитель-мальтодекстрин, отличающийся тем, что содержит смесь биомассы штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3154D, *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3171D и *Bacillus licheniformis* ВКМ-В-3172D в соотношении 1:1:1.

5 2. Комбинированный пробиотический препарат по п. 1, отличающийся тем, что общее количество жизнеспособных бактерий в готовом препарате не менее 5×10^9 КОЕ/г.

3. Способ получения пробиотического препарата по п. 1, включающий получение штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3154D, *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3171D и *Bacillus licheniformis* ВКМ-В-3172D, последующее раздельное культивирование штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3154D, *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3171D и *Bacillus licheniformis* ВКМ-В-3172D в жидкой питательной среде, содержащей глюкозу и дрожжевой автолизат при pH 6,8-8,5 и температуре 15-18°C, концентрирование культуральных жидкостей путем центрифугирования, распылительную сушку полученных концентратов, смешивание полученной сухой биомассы штаммов между собой в соотношении 1:1:1 с последующей добавкой мальтодекстрина до 100% массы целевого продукта, приводящей к получению препарата с общим содержанием жизнеспособных бактерий не менее 5×10^9 КОЕ/г.

4. Штамм *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3154D в споровой форме, используемый для получения пробиотика по п. 1, способный расти в условиях низких температур.

5. Штамм *Bacillus subtilis* ВКМ-В-3171D в споровой форме, используемый для получения пробиотика по п. 1, способный расти в условиях низких температур.

6. Штамм *Bacillus licheniformis* ВКМ-В-3172D в споровой форме, используемый для получения пробиотика по п. 1, способный расти в условиях низких температур.

25

30

35

40

45