



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A23K 50/80 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022126844, 17.10.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.10.2022

Дата регистрации:
07.12.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.10.2022

(45) Опубликовано: 07.12.2022 Бюл. № 34

Адрес для переписки:
460018, г. Оренбург, пр-кт Победы, 13, ОГУ,
патентный отдел 170415, Быков Артем
Владимирович

(72) Автор(ы):

Аринжанов Азамат Ерсайнович (RU),
Мирошникова Елена Петровна (RU),
Килякова Юлия Владимировна (RU),
Аринжанова Мария Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Оренбургский
государственный университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2755817 C1, 21.09.2021. RU
2652833 C1, 03.05.2018. RU 2298945 C2,
20.05.2007. US 9889181 B2, 13.02.2018.

(54) Способ коррекции микробиома кишечника для повышения резистентности организма рыб

(57) Реферат:

Изобретение может быть использовано при
выращивании рыбы. Способ включает
скармливание комбикорма, тонкий слой которого
опрыскивают пробиотическим препаратом «Соя-

бифидум» в количестве 0,7 мл/кг корма.
Изобретение позволяет нормализовать
микробиоценоз кишечника рыб. 3 табл.

RU 2 785 408 C1

RU 2 785 408 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A23K 50/80 (2022.08)

(21)(22) Application: **2022126844, 17.10.2022**

(24) Effective date for property rights:
17.10.2022

Registration date:
07.12.2022

Priority:

(22) Date of filing: **17.10.2022**

(45) Date of publication: **07.12.2022** Bull. № 34

Mail address:

**460018, g. Orenburg, pr-kt Pobedy, 13, OGU,
patentnyj otdel 170415, Bykov Artem
Vladimirovich**

(72) Inventor(s):

**Arinzhanov Azamat Ersainovich (RU),
Miroshnikova Elena Petrovna (RU),
Kiliakova Iuliia Vladimirovna (RU),
Arinzhanova Mariia Sergeevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia «Orenburgskii gosudarstvennyi
universitet» (RU)**

(54) **METHOD FOR CORRECTING THE INTESTINAL MICROBIOME TO INCREASE THE RESISTANCE OF THE FISH ORGANISM**

(57) Abstract:

FIELD: fish farming.

SUBSTANCE: the method involves feeding with mixed feed a thin layer of which is sprayed with Soy-Bifidum probiotic product in an amount of 0,7 ml per

1 kg of feed.

EFFECT: normalization of fish intestinal micro-biocenosis.

1 cl, 3 tbl

RU 2 785 408 C 1

RU 2 785 408 C 1

Изобретение относится к сельскому хозяйству, а именно к рыбоводству и может быть использовано для кормления рыб.

Известен питательный рацион (RU 2298945, А23К 1/165, 2007 г.), коррегирующий микробиоценоз желудочно-кишечного тракта, в который вводят биологически активную добавку к корму - пребиотическая добавка. Исходным сырьем для носителя микробных тел в добавке являются отруби зерновых культур. Они обработаны таким образом, что они представляют собой остатки цитоскелета клеточных мембран зерновых культур, образованных от их дезинтеграции. В качестве микробных тел взята биомасса *Saccharomyces vini*, остальное составляют биотрансформированные неорганические вещества.

Недостатком данного способа является ее ограниченная область применения, так как используется для сельскохозяйственных, пушных и домашних животных.

Известен способ снижения грамположительной микрофлоры в кишечнике (RU 2755817, А61К 31/60, А61К 31/365, А23К 20/00, 2021 г.), который предусматривает совместное использование 4-гидрокси-3-метоксибензойной кислоты 97% в дозировке 0,13 г/кг живой массы и гаммаокталактона в дозировке 0,1 мл/кг живой массы.

Недостатком данного способа является ее ограниченная область применения, так как используется только для птицы.

Известен корм с пробиотической кормовой добавкой для рыб (RU 2652833, А23К 50/80, 2018 г.), содержащий штамм бактерий *Enterococcus faecium* 1-35 с титром живых бактерий $1,3 \times 10^8$ - $1,8 \times 10^8$ КОЕ и штамм бактерий *Bacillus megaterium* В-4801 с титром живых бактерий $1,0 \times 10^8$ - $3,3 \times 10^8$ КОЕ, нанесенные в смеси в равных количествах на наполнитель.

Недостатком данной кормовой добавки является ее ограниченная область применения, так как используется только для холодолюбивых рыб.

Известна кормовая добавка «Лакто-плюс», включающая смесь бактерий *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus salivarius*, *Leuconostoc citrovorum*, *Leuconostoc dextranicum*, и смесь дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Torulopsis sphaerica*, *Torulasporea delbrueskii*, *Candida kefir*, *Candida holmii*, *Candida friedrichii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*.

Недостаток добавки является ее ограниченная область применения, так как используется только для кормления сельскохозяйственных животных.

Настоящее изобретение направлено на ингибирование развития патогенных бактерий в кишечнике рыб, в частности филума Firmicutes и бактерий рода *Aeromonas*.

Поставленная задача решается способом коррекции микробиома кишечника, для повышения резистентности организма рыб, включающий скармливание комбикорма. В корм путем опрыскивания тонкого слоя в количестве 0,7 мл/кг корма вводят пробиотический препарат «Соя-бифидум», содержащий штамм живых бактерий *Bifidobacterium longum*.

Для осуществления способа проведен эксперимент в условиях кафедры биотехнологии животного сырья и аквакультуры Оренбургского государственного университета, в рамках которого было сформировано 3 группы молоди карпа (n=30): контрольная группа получала основной рацион (ОР), I опытная - ОР + пробиотический препарат «Соя-бифидум» в количестве 0,7 мл/кг корма, II опытная - ОР + антибиотик ципрофлоксацин гидрохлорид в количестве 100 мг/кг корма. Продолжительность опыта 56 суток.

В качестве ОР использовался сбалансированный по основным питательным веществам корм для карповых рыб КРК-110-1 (ОАО «Оренбургский комбикормовый завод», г. Оренбург), содержащий 26,0% протеина.

Пробиотический препарат «Соя-бифидум» представляет собой штамм бактерий *Bifidobacterium longum* с титром живых бактерий не менее 1×10^9 КОЕ (ООО «НПФ «Экобиос», г. Оренбург).

Экспериментальные исследования и обслуживание рыб выполнены в соответствии с инструкциями Russian Regulations, 1987 (Order No.755 on 12.08.1977 the USSR Ministry of Health) и «The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D.C. 1966)». При выполнении исследований были приняты усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшения количества используемых образцов.

Суточная норма кормления определялась еженедельно с учетом массы рыбы, температуры воды и концентрации растворенного в воде кислорода (Пономарев С.В. Индустриальное рыбоводство: учебник / С.В. Пономарев, Ю.Н. Грозеску, А.А. Бахарева. - Санкт-Петербург: Лань, 2013. - 448 с.).

На 56 сутки эксперимента для оценки микробиома рыб были отобраны образцы содержимого кишечника, которые использовали для выделения очищенных препаратов ДНК. Концентрация ДНК измерялась трехкратно: после выделения ДНК, после первой полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфичными 16S прокариотическими праймерами и после второй ПЦР с адаптерами и индексами протоколов Nextera XT. Анализ микрофлоры осуществлялся методом метагеномного секвенирования (Illumina MiSeq, «Illumina», США) с набором реагентов MiSeq® Reagent Kit v3 (600 cycle). Для биоинформатической обработки результатов использована программа PEAR (Pair-End AssembleR, PEAR v0.9.8). Результаты секвенирования были обработаны с использованием пакета программ Microsoft Excel. Проверка соответствия полученных данных нормальному закону распределения определялась при помощи критерия согласия Колмогорова. Значение с $P \leq 0,05$ считалось статистически значимым. В результатах учитывались таксоны, численность которых более 1%.

Исследование микробного разнообразия кишечника рыб показало, что включение в основной рацион пробиотического препарата «Соя-бифидум» сопряжено с наращиванием филума Actinobacteria до 5,2% (табл. 1), микроорганизмов обеспечивающих защиту от кишечных патогенов и модуляцию локального иммунного ответа. При этом филум Actinobacteria не был зафиксирован как в контрольной группе, так и во II опытной группе.

Таблица 1 - Филумы кишечника подопытных рыб, %

Наименование филума	Контроль	I опытная	II опытная
Fusobacteria	34,42 ± 1,32	30,27 ± 1,23	31,28 ± 1,36
Verrucomicrobia	30,7 ± 1,12	30,6 ± 1,34	28,34 ± 1,4
Proteobacteria	24,45 ± 0,88	22,56 ± 1,14	28,32 ± 1,39*
Firmicutes	7,08 ± 0,51	4,08 ± 0,41*	4,11 ± 0,38*
Actinobacteria	-	5,20 ± 0,45	-

Анализ данных показал снижение в I опытной группе грамположительных бактерий филума Firmicutes на 3% ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 2). Кроме того, в I опытной группе обнаружены представители семейства Vifidobacteriaceae (5,02%), в частности род Vifidobacterium, который является микроорганизмом, положительно влияющим на состав и численность микрофлоры в кишечнике животных, за счет продукции антибиотических веществ, препятствующих росту численности патогенов

(Liu H., Li J., Guo X., Liang Y., & Wang W. (2018). Yeast culture dietary supplementation modulates gut microbiota, growth and biochemical parameters of grass carp. *Microbial biotechnology*, 11(3), 551-565). Этим объясняется снижение в кишечнике рыб условных патогенов: филума Firmicutes и бактерий рода *Aeromonas*, численность последнего была менее 1%.

5

10

15

20

25

30

Группа	Филум Fusobacteria		
	Класс	Семейство	Род
Контроль	Fusobacteria 34,42 ± 1,32	Fusobacteriaceae 34,98 ± 1,34	Cetobacterium 33,87 ± 1,16
I опытная	Fusobacteria 30,01 ± 1,13	Fusobacteriaceae 30,01 ± 1,13	Cetobacterium 29,96 ± 1,04
II опытная	Fusobacteria 30,22 ± 1,29	Fusobacteriaceae 28,47 ± 1,25	Cetobacterium 25,98 ± 1,27
	Филум Verrucomicrobia		
	Класс	Семейство	Род
Контроль	Verrucomicrobiae (30,7 ± 1,12%)	Verrucomicrobiaceae (29,76 ± 1,04%)	Luteolibacter (24,98 ± 1,0%)
			Rubritalea (2,36 ± 0,16%)
I опытная	Verrucomicrobiae (30,6 ± 1,34%)	Verrucomicrobiaceae (28,98 ± 1,21%)	Luteolibacter (23,67 ± 1,11%)
			Rubritalea (2,45 ± 2,45%)
II опытная	Verrucomicrobiae (28,34 ± 1,4%)	Verrucomicrobiaceae (27,54 ± 1,28%)	Luteolibacter (23,63 ± 1,04%)
	Филум Firmicutes		
	Класс	Семейство	Род
Контроль	Bacilli (5,99 ± 0,41%)	Streptococcaceae (6,1 ± 0,47%)	Lactococcus (5,15 ± 0,38%)
I опытная	Bacilli (3,99 ± 0,37%)	Streptococcaceae (3,21 ± 0,32%)	Lactococcus (3,09 ± 0,28%)
		Bifidobacteriaceae (5,02 ± 0,53%)	Bifidobacterium (4,87 ± 0,44%)
II опытная	Bacilli (3,97 ± 0,36%)	Streptococcaceae (2,1 ± 0,23%)	Lactococcus (1,21 ± 0,13%)

Примечание: * Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

При добавлении в рацион карпам антибиотика установлено увеличение численности Proteobacteria на 3,9% ($P \leq 0,05$) и входящего в его состав класса Gammaproteobacteria на 4,3% ($P \leq 0,05$), относительно контрольных значений, в частности бактерий рода *Aeromonas* и *Pseudomonas*, что свидетельствует о нарушении нормальной микрофлоры кишечника рыб и увеличении санитарно-неблагополучных микроорганизмов под действием антибиотика, что может привести к эпизоотиям.

40

45

Наименование	Класс	Семейство	Род
Контроль	Alphaproteobacteria (19,52 ± 0,83%)	Xanthobacteraceae (6,17 ± 0,45%)	Devosia (2,52 ± 0,18%)
		Hyphomicrobiaceae (2,05 ± 0,14%)	Azorhizobium (2,65 ± 0,21%)
		Gammaproteobacteria (4,38 ± 0,36%)	Aeromonadaceae (5,23 ± 0,39%)
I опытная	Alphaproteobacteria (18,46 ± 1,04%)	Xanthobacteraceae (3,25 ± 0,35%)	Devosia (2,31 ± 0,21%)
		Hyphomicrobiaceae (2,13 ± 0,18%)	Azorhizobium (2,10 ± 0,17%)
II опытная	Alphaproteobacteria (18,33 ± 1,17%)	Xanthobacteraceae (5,20 ± 0,51%)	Devosia (1,52 ± 0,23%)

		Hyphomicrobiaceae (2,21± 0,37%)	Azorhizobium (2,09 ± 0,28%)
	Gammaproteobacteria (8,67 ± 0,89%)*	Aeromonadaceae (5,23 ± 0,47%)	Aeromonas (3,48 ± 0,31%)
		Pseudomonadaceae (3,3 ± 0,29%)	Pseudomonas (3,22 ± 0,25%)

5

Примечание: * Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Анализируя полученные данные, можно сделать следующие выводы:

- включение в основной рацион пробиотического препарата «Соя-бифидум» в количестве 0,7 мл/кг корма нормализует микробиом кишечника рыб, способствует увеличению филума Actinobacteria, а также численности бактерий рода Vifidobacterium,
- способ коррекции микробиома кишечника для повышения резистентности организма рыб путем включения в рацион пробиотического препарата «Соя-бифидум» в количестве 0,7 мл/кг корма подтвержден возможностью его осуществления с помощью описанных в заявке средств и методов,
- заявленное изобретение соответствует условию «промышленная применимость».

15

(57) Формула изобретения

Способ коррекции микробиома кишечника, для повышения резистентности организма рыб, включающий скармливание комбикорма, отличающийся тем, что тонкий слой корма опрыскивают пробиотическим препаратом «Соя-бифидум» в количестве 0,7 мл/кг корма.

20

25

30

35

40

45