



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A23K 50/80 (2023.05); A23K 10/16 (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2022134171, 23.12.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.12.2022

Дата регистрации:
22.08.2023

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 23.12.2022

(45) Опубликовано: 22.08.2023 Бюл. № 24

Адрес для переписки:
344003, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, 1,
ДГТУ, отдел интеллектуальной собственности,
Лобова Екатерина Викторовна

(72) Автор(ы):

Рудой Дмитрий Владимирович (RU),
Чикиндас Михаил Леонидович (RU),
Пахомов Виктор Иванович (RU),
Пономарева Елена Николаевна (RU),
Мальцева Татьяна Александровна (RU),
Мазанко Мария Сергеевна (RU),
Брень Анжелика Борисовна (RU),
Чистяков Владимир Анатольевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Донской государственный
технический университет" (ДГТУ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2652836C1, 03.05.2018. RU
2652833C1, 03.05.2018. RU 2742868C1, 11.02.2021.
KZ 24991A4, 15.12.2011.

(54) Кормовая добавка с пробиотической активностью для рыб

(57) Реферат:

Изобретение относится к аквакультуре, а именно к кормовым добавкам с пробиотической активностью для кормления рыб. Кормовая добавка содержит носитель и биомассу бактерий микроорганизмов. Кормовая добавка представляет собой высушенный ферментированный субстрат, состоящий из пробиотического компонента – носителя в виде

соевого шрота и колонизирующей его биомассы пробиотических бактерий штамма *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895arm ВКПМ В-14100 в форме спор с титром $2,0 \times 10^6$ - $3,0 \times 10^{11}$ КОЕ в 1 г кормовой добавки. Использование изобретения позволит улучшить качественную составляющую пробиотической кормовой добавки для рыб. 21 табл., 5 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A23K 50/80 (2016.01)
A23K 10/16 (2016.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A23K 50/80 (2023.05); A23K 10/16 (2023.05)

(21)(22) Application: **2022134171, 23.12.2022**

(24) Effective date for property rights:
23.12.2022

Registration date:
22.08.2023

Priority:

(22) Date of filing: **23.12.2022**

(45) Date of publication: **22.08.2023** Bull. № 24

Mail address:
**344003, g. Rostov-na-Donu, pl. Gagarina, 1, DGTU,
otdel intellektualnoj sobstvennosti, Lobova
Ekaterina Viktorovna**

(72) Inventor(s):

**Rudoj Dmitrij Vladimirovich (RU),
Chikindas Mikhail Leonidovich (RU),
Pakhomov Viktor Ivanovich (RU),
Ponomareva Elena Nikolaevna (RU),
Maltseva Tatyana Aleksandrovna (RU),
Mazanko Mariya Sergeevna (RU),
Bren Anzhelika Borisovna (RU),
Chistyakov Vladimir Anatolevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Donskoj gosudarstvennyj
tehnicheskij universitet" (DGTU) (RU)**

(54) **FEED ADDITIVE WITH PROBIOTIC ACTIVITY FOR FISH**

(57) Abstract:

FIELD: aquaculture.

SUBSTANCE: invention relates to feed additives with probiotic activity for feeding fish. The feed additive comprises a carrier and a biomass of microbial bacteria. The feed additive is a dried fermented substrate consisting of a probiotic component - a carrier in the form of soybean meal and a biomass of probiotic

bacteria of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895arm VKPM B-14100 colonizing it in the form of spores with a titre of 2.0×10^6 - 3.0×10^{11} CFU in 1 g of feed additive.

EFFECT: improved quality of the probiotic feed additive for fish.

1 cl, 21 tbl, 5 ex

RU 2 802 073 C 1

RU 2 802 073 C 1

Изобретение относится к аквакультуре, а именно к кормовым добавкам с пробиотической активностью для кормления рыб. Увеличение доли продукции из рыбы и гидробионтов в питании человека имеет благотворные последствия. По современным представлениям, в целях повышения качества и безопасности продукции для потребителя, а также улучшения рыбоводно-биологических показателей перспективно использование в технологиях аквакультуры кормовых добавок и пробиотических препаратов, обладающих потенциалом модулирования здоровья хозяина.

Известна кормовая пробиотическая добавка для рыб (см. пат. RU 2742868, A23K50/80, A23K10/16, опубл. 11.02.2021), состоящая из бакконцентрата, представляющего собой смесь, включающую лактобактерии и дрожжевые грибы, предварительно сублимированные до состояния лиофилизированного порошка, при этом кормовая добавка дополнительно содержит наполнители: сыворотку сухую молочную, сухое обезжиренное коровье молоко и фульвовую кислоту, при следующем соотношении компонентов, мас. %: – лиофилизированный порошок бакконцентрата – 0,4 – сыворотка молочная сухая – 9,0 – сухое обезжиренное коровье молоко – 1,1 – фульвовая кислота – 2,0 – вода – остальное; где бакконцентрат образован смесью, в которой присутствуют виды бактерий: – *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* в количестве 5×10^8 КОЕ/г; – взятые в равных долях *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* общим количеством 1×10^9 КОЕ/

14.12.2022, 06:40 ИЗ №2742868

https://fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet/9/9 г;

– взятые в равных долях *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis* общим количеством 2×10^7 КОЕ/г; – взятые в равных долях *Propionibacterium shermanii*, *Propionibacterium freudenreichii* – общим количеством 5×10^8 КОЕ/г; – взятые в равных долях смесь дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Torulopsis sphaerica*, *Torulaspora delbrueskii*, *Candida kefir*, *Candida holmii*, *Candida friedrichii*, *Kluveromyces lactis*, *Kluveromyces marxianus*, общим количеством 1×10^9 КОЕ/г.

Известна пробиотическая кормовая добавка, используемая при изготовлении комбикормов, содержащих пробиотики для сельскохозяйственных животных, птицы и рыб, и содержащая биомассу спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* В–2250 и/или *Bacillus licheniformis* В–2252, и носитель сорбент, содержащий аэросил гидрофильный марки А и гидрофобный марки АМ, а также влагоемкий наполнитель (см. патент RU № 2252956, С12N1/20, А23К1/165, А61К35/66, 27.05.2005 г.).

К недостаткам данной добавки относится отсутствие в ее составе пребиотического субстрата, обладающего физиологически значимым потенциалом.

Наиболее близким техническим решением является кормовая добавка с пробиотической активностью для сельскохозяйственных животных, птиц, лошадей и рыб, содержащая в своем составе биомассу комплекса бактерий *Enterococcus faecium* 1–35 с титром живых бактерий $3,8 \times 10^7$ – $2,2 \times 10^8$ КОЕ и бактерий *Bacillus megaterium* с титром живых бактерий $3,8 \times 10^7$ – $3,3 \times 10^8$ КОЕ, нанесенную на наполнитель, в качестве которого используют отруби или шрот подсолнечный, или диатомит, или трепел (см. патент RU 2652836, А23К10/16, 03.05.2018 г.).

Однако недостаточно высокое содержание титра живых бактерий и способ получения биомассы бактерий – жидкофазная ферментация, не обеспечивает формирование биопленки пробиотическими бактериями. Перспективным направлением является использование в рыбоводстве кормовых добавок с включением спорообразующих

пробиотических культур, а также пробиотических препаратов на основе спорообразующих бактерий. Штаммы р.*Bacillus* в стадии споры устойчивы к высокотемпературным воздействиям и переживают процессы экструдирования, гранулирования, экспандирования. Покоящаяся споровая стадия позволяет этим пробиотикам иметь более длительные сроки хранения, без опасности потери свойств. Штаммы вида *Bacillus subtilis* относятся к транзитной микрофлоре, а значит, не должны заселять пищеварительный тракт. Их функция – стабилизировать естественную микрофлору организма и самостоятельно элиминироваться в ЖКТ. Штаммы вида *Bacillus subtilis*, колонизирующие твердый субстрат, образуют особую биопленку, которая делает их более устойчивыми к действию различных стрессов и агрессивных агентов, в том числе антибиотиков. Пробиотики, выращенные в твердой фазе, более эффективно вытесняют патогенные микроорганизмы, продуцируя различные антагонистические соединения, включая антибиотикоподобные вещества; они успешнее конкурируют с патогенными бактериями за поверхность прикрепления и питательные вещества, изменяя окружающие их значения рН. Помимо прямого воздействия на патогены, пробиотики способны оказывать модулирующее влияние на здоровье хозяина, в частности, посредством взаимодействия с иммунной системой.

Технический результат – улучшение качественной составляющей пробиотической кормовой добавки.

Сущность изобретения заключается в том, что кормовая добавка с пробиотической активностью для рыб, содержащая в своем составе носитель и биомассу бактерий микроорганизмов представляет собой высушенный ферментированный субстрат, состоящий из пробиотического компонента – соевого шрота и колонизирующей его биомассы пробиотических бактерий штамма *Bacillus amyloliquefaciens* В–1895arm в форме спор с титром $2,0 \times 10^6$ – $3,0 \times 10^{11}$ в 1 г кормовой добавки.

Для получения кормовой добавки с пробиотической активностью для кормления рыб применяется биотехнологический метод твердофазной ферментации, исключая дорогостоящие стадии культивирования пробиотических бактерий в ферментерах на жидких питательных субстратах и последующее высушивание препаратов. Бактерии штамма *Bacillus amyloliquefaciens* В–1895arm (см. Биоресурсный Центр Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатковский институт» ГосНИИгенетика приняла на национальное патентное депонирование культуру *Bacillus amyloliquefaciens* В–1895arm. Дата депонирования 28 декабря 2021 года. Депозитор ФГБОУ ВО ДГТУ. Регистрационный номер ВКПМ: В–14100) выращиваются непосредственно на влажном субстрате, обладающем выраженными пребиотическими свойствами – соевом шроте. В этом случае твердые частицы субстрата служат основой для роста и источником питательных веществ для пробиотических бактерий, то есть он является пребиотическим. Соевый шрот является источником пластических и биологически-активных веществ: белков, полиненасыщенных и короткоцепочечных жирных кислот, олигосахаров, фитатов, флавоноидов. Использование соевого шрота может повысить уровень бифидобактерий и лактобацилл и изменить соотношение микробиоты в сторону сокращения популяций патогенных бактерий в кишечнике, тем самым снижая риск заболеваний и оказывая благотворное влияние на здоровье рыб.

Для получения кормовой добавки в качестве субстрата используется соевый шрот по ГОСТ Р 53799–2010. Получение кормовой добавки с пробиотической активностью для рыб – твердофазная ферментация. При таком методе ферментации бактерии штамма *Bacillus amyloliquefaciens* В–1895arm формируют биопленку. Бактериальные биопленки

устойчивы к действию различных стрессов и к действию агрессивных агентов, в том числе, антибиотиков. Показано, что в биопленке по-иному, в сравнении с чистыми планктонными культурами бактерий, происходят многочисленные физиологические процессы, в том числе более активно идет продукция метаболитов, биологически активных веществ, в том числе бактериоцинов. Организация пробиотических бактерий в биопленку обеспечивает ее физиологическую и функциональную стабильность и, следовательно, является залогом конкурентного выживания в занимаемой экологической нише, что обеспечивает большую эффективность производных препаратов и кормовых добавок.

Действие кормовой добавки способствует улучшению физиологического состояния рыбы, повышает ее продуктивные качества.

Кормовая добавка получается следующим образом:

Соевый шрот в количестве 1–2 кг взвешивают и стерилизуют в автоклаве при 120–128°C в течение 20–40 минут, затем шрот охлаждают до 50–62°C и вносят в него штамм *Bacillus amyloliquefaciens* В–1895arm (процесс инокуляции) с титром живых бактерий $1,0 \times 10^4$ – $3,0 \times 10^4$ КОЕ, тщательно перемешивают с помощью стерильной мешалки из пищевой нержавеющей стали. Стерилизацию мешалки осуществляют в автоклаве. Сосуды с инокулированным шротом помещают в термостат – инкубатор, где происходит процесс ферментации. Процесс длится в течение 20–28 часов при температуре 40–47°C. Ферментированный влажный субстрат измельчается.

Измельченный ферментированный субстрат высушивается до влажности 12–13%. Высушенный субстрат измельчают и получают готовую пробиотическую кормовую добавку для рыб.

Готовая пробиотическая кормовая добавка содержит титр живых пробиотических бактерий штамма *Bacillus amyloliquefaciens* В–1895arm в диапазоне $2,0 \times 10^6$ – $3,0 \times 10^{11}$ КОЕ. Кормовая добавка представляет собой сыпучий порошок коричневого цвета с характерным запахом.

Готовая пробиотическая кормовая добавка хранится в холодильнике при температуре (4±2)°C и внешней влажности среды хранения не более 40% в течение одного года, при комнатной температуре – в течение 6 месяцев.

Величина остаточной влаги (12–13%) в пробиотической добавке определяется регламентированной ГОСТом величиной остаточной влаги в корме, в который вносится добавка.

Пробиотическая кормовая добавка является безвредной, побочных явлений и осложнений при применении не наблюдается. Продукцию рыб, получавших добавку, разрешено использовать в пищевых целях без каких-либо ограничений.

Экспериментальные исследования по влиянию пробиотической добавки на рост и кишечную микрофлору рыб при использовании ее в составе рациона проводились в бассейнах при производственных плотностях посадки.

Выращивание и кормление осуществляли по существующей технологии (см. кн. Пономарева С.В. Технологии выращивания и кормления объектов аквакультуры юга России / С.В. Пономарев, Е.А. Гамыгин, С.И. Никоноров, Е.Н. Пономарева, Ю.Н. Грозеску, А.А. Бахарева. – Астрахань: Нова Плюс, 2002. – С. 44–48).

В качестве базового рецепта использовали стандартный производственный комбикорм РГМ–8В (см. Методические указания по кормлению рыб новыми комбикормами, выпускаемыми предприятиями МИНРЫБХОЗА СССР. – Москва: ВНИИПРХ, 1990. – С. 6–7).

Комбикорм изготавливали известным способом влажного прессования (см. кн. Пономарев С.В. Технологии выращивания и кормления объектов аквакультуры юга России / Пономарев С.В., Гамыгин Е.А., Никоноров С.И., Пономарева Е.Н., Грозеску Ю.Н., Бахарева А.А. – Астрахань: Изд-во «Новая Плюс», 2002. – С. 199–200). Все компоненты комбикорма смешивали в смесителе, далее отправляли в лабораторный пресс-гранулятор для последующего формирования гранул различного диаметра и длины при температуре не выше 60°C. Кормовая добавка на стерильном носителе добавляется в корма на этапе смешивания экструдированных и неэкструдированных компонентов. Норма введения пробиотической добавки в состав экструдированных кормов составила 0,13–0,18% от массы корма.

Примеры использования предлагаемой кормовой добавки с пробиотической активностью:

Опыты проводили на базе АО «Племенной форелеводческий завод «Адлер» и АНЦ «Донской».

Для получения кормовой добавки с пробиотической активностью для кормления рыб использовали бактерии штамма *Bacillus amyloliquefaciens* В–1895arm.

Предлагаемая пробиотическая кормовая добавка на носителе – соевом шроте содержит титр живых пробиотических бактерий штамма *Bacillus amyloliquefaciens*

В–1895arm в диапазоне $2,0 \times 10^6$ – $3,0 \times 10^{11}$ КОЕ в 1 г кормовой добавки.

Исследование состояния микробиоты радужной форели и карпа обыкновенного, которых кормили стандартным кормом и кормом с пробиотической добавкой в количестве 0,10–0,20% проводили следующим образом: Из каждой группы отбирали слепым методом по 10 рыб и доставляли в течение 1 сут. в лабораторию охлажденными на льду. Далее из каждой рыбы извлекали ЖКТ и извлекали содержимое кишки в стерильную ёмкость, как полостное, так и пристеночное скребком. Затем полученные пробы тщательно перемешивали и готовили ряд последовательных десятичных разведений. Определение количества микроорганизмов, содержащихся в образцах содержимого кишечника, производили методом поверхностного посева, в количестве 3 повторностей на каждую питательную среду для каждого исследуемого разведения (см. Методические рекомендации «Методы бактериологического исследования условно-патогенных микроорганизмов в клинической микробиологии». – Москва, 1991. – 36 с.).

Пример 1

Норма введения пробиотической добавки в состав экструдированных кормов составила 0,10% от массы корма. В таблице 1 представлены рыбоводно-биологические показатели выращивания радужной форели, в таблице 2 – обыкновенного карпа.

Таблица 1

Рыбоводно-биологические показатели выращивания радужной форели (при массовой доле кормовой добавки в корме 0,10%)

Показатели	Опыт	Контроль
Начальная масса, г	50,22±8,93	51,22±10,50
Конечная масса, г	95,78±7,54	91,47±3,50
Общий прирост, г	45,56	40,25
Среднесуточный прирост, г	1,30	1,15
Выращивание, сутки	35	35
Выживаемость, %	96	95
Кормовой коэффициент, ед.	1,15	1,15

Опыт – корм с пробиотической добавкой

Контроль – корм без пробиотической добавки

Результаты экспериментов показали, что введение пробиотической добавки в корм для радужной форели оказало положительный эффект на рост и выживаемость. В эксперименте масса рыбы увеличилась в 1,9 раза, в контроле в 1,8 раза при выживаемости 96% и 95%, соответственно.

Таблица 2

Рыбоводно–биологические показатели выращивания обыкновенного карпа (при массовой доле кормовой добавки в корме 0,10%)

Показатели	Опыт	Контроль
Начальная масса, г	725,74±11,89	727,33±13,68
Конечная масса, г	1030,55±11,25	1027,47±11,25
Общий прирост, г	304,81	300,14
Среднесуточный прирост, г	10,16	10,00
Выращивание, сутки	30	30
Выживаемость, %	96	95
Кормовой коэффициент, ед.	2,96	3,25

Опыт – корм с пробиотической добавкой

Контроль – корм без пробиотической добавки

Результаты экспериментов показали, что введение пробиотической добавки в корм для обыкновенного карпа оказало положительный эффект на рост и выживаемость. В эксперименте масса рыбы увеличилась в 1,42 раза, в контроле в 1,41 раза при выживаемости 96% и 95%, соответственно.

В таблице 3 показано содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника радужной форели, в таблице 4 – карпе обыкновенном.

Таблица 3

Содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника радужной форели, КОЕ

(при массовой доле кормовой добавки в корме 0,10%)

Группа микроорганизмов	Опыт	Контроль
<i>Lactobacillus</i>	2,9±0,2·10 ⁵	8,4±0,4·10 ⁵
<i>Enterococcus</i>	7,3±0,4·10 ³	1,6±0,2·10 ³
БГКП, из них		
<i>E.coli</i>	8,2±0,5·10 ²	3,3±0,2·10 ²
лактозо+	4,5±0,1·10 ³	4,7±0,3·10 ³
<i>Vibrio</i>	6,9±0,2·10 ⁴	2,5±0,2·10 ⁴
<i>Bacillus</i>	7,8±0,8·10 ⁴ *	5,0±0,4·10 ³

Таблица 4

Содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника обыкновенного карпа, КОЕ

(при массовой доле кормовой добавки в корме 0,10%)

Группа микроорганизмов	Опыт	Контроль
<i>Enterobacteriaceae</i>	6,9±0,3·10 ⁷	7,2±0,3·10 ⁷
<i>P. Pseudomonas</i>	1,8±0,4·10 ⁷	2,2±0,3·10 ⁷
<i>Bacillus subtilis</i>	3,9±0,3·10 ⁷	1,4±0,2·10 ⁷
<i>P. Staphylococcus</i>	0,9±0,2·10 ⁵	0,2±0,1·10 ⁶
<i>P. Aeromonas</i>	0,7±0,1·10 ⁷	0,3±0,1·10 ⁷

Полученные данные говорят о том, что пробиотические бактерии используемого штамма не оказывают негативного воздействия на микробиоту рыб.

Пример 2

Норма введения пробиотической добавки в состав экструдированных кормов составила 0,13% от массы корма. В таблице 5 представлены рыбоводно-биологические показатели выращивания радужной форели, в таблице 6 – обыкновенного карпа.

Таблица 5

Рыбоводно-биологические показатели выращивания радужной форели (при массовой доле кормовой добавки в корме 0,13%)

10

Показатели	Опыт	Контроль
Начальная масса, г	54,11±7,47	51,22±10,50
Конечная масса, г	108,23±8,36	91,47±3,50
Общий прирост, г	54,12	40,25
Среднесуточный прирост, г	1,55	1,15
Выращивание, сутки	35	35
Выживаемость, %	97	95
Кормовой коэффициент, ед.	1,1	1,15

15

Опыт – корм с пробиотической добавкой

Контроль – корм без пробиотической добавки.

20

Результаты экспериментов показали, что введение пробиотической добавки в корм для радужной форели оказало положительный эффект на рост и выживаемость. В эксперименте масса рыбы увеличилась в 2,0 раза, в контроле в 1,8 раза при выживаемости 97% и 95%, соответственно.

Таблица 6

25

Рыбоводно-биологические показатели выращивания обыкновенного карпа (при массовой доле кормовой добавки в корме 0,13%)

30

Показатели	Опыт	Контроль
Начальная масса, г	730,25±10,44	727,33±13,68
Конечная масса, г	1058,85±9,36	1027,47±11,25
Общий прирост, г	328,60	300,14
Среднесуточный прирост, г	10,95	10,00
Выращивание, сутки	30	30
Выживаемость, %	97	95
Кормовой коэффициент, ед.	2,89	3,25

35

Опыт – корм с пробиотической добавкой

Контроль – корм без пробиотической добавки

40

Результаты экспериментов показали, что введение пробиотической добавки в корм для обыкновенного карпа оказало положительный эффект на рост и выживаемость. В эксперименте масса рыбы увеличилась в 1,45 раза, в контроле в 1,41 раза при выживаемости 97% и 95%, соответственно.

В таблице 7 показано содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника радужной форели, в таблице 8 – карпе обыкновенном.

Таблица 7

45

Содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника радужной форели, КОЕ

(при массовой доле кормовой добавки в корме 0,13%)

Группа микроорганизмов	Опыт	Контроль
------------------------	------	----------

<i>Lactobacillus</i>	$3,2 \pm 0,4 \cdot 10^5$	$8,4 \pm 0,4 \cdot 10^5$
<i>Enterococcus</i>	$7,4 \pm 0,3 \cdot 10^3$	$1,6 \pm 0,2 \cdot 10^3$
БГКП, из них		
<i>E.coli</i>	$8,7 \pm 0,4 \cdot 10^2$	$3,3 \pm 0,2 \cdot 10^2$
лактозо+	$4,3 \pm 0,2 \cdot 10^3$	$4,7 \pm 0,3 \cdot 10^3$
<i>Vibrio</i>	$7,4 \pm 0,3 \cdot 10^4$	$2,5 \pm 0,2 \cdot 10^4$
<i>Bacillus</i>	$8,0 \pm 0,8 \cdot 10^4*$	$5,0 \pm 0,4 \cdot 10^3$

Таблица 8

Содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника обыкновенного карпа, КОЕ

(при массовой доле кормовой добавки в корме 0,13%)

Группа микроорганизмов	Опыт	Контроль
<i>Enterobacteriaceae</i>	$6,7 \pm 0,4 \cdot 10^7$	$7,2 \pm 0,3 \cdot 10^7$
<i>P. Pseudomonas</i>	$1,7 \pm 0,2 \cdot 10^7$	$2,2 \pm 0,3 \cdot 10^7$
<i>Bacillus subtilis</i>	$4,3 \pm 0,5 \cdot 10^7$	$1,4 \pm 0,2 \cdot 10^7$
<i>P. Staphylococcus</i>	$0,8 \pm 0,1 \cdot 10^5$	$0,2 \pm 0,1 \cdot 10^6$
<i>P. Aeromonas</i>	$0,8 \pm 0,1 \cdot 10^7$	$0,3 \pm 0,1 \cdot 10^7$

Полученные данные говорят о том, что пробиотические бактерии используемого штамма не оказывают негативного воздействия на микробиоту рыб.

Пример 3

Норма введения пробиотической добавки в состав экструдированных кормов для радужной форели и обыкновенного карпа составила 0,15% от массы корма. В таблице 9 представлены рыбоводно-биологические показатели выращивания радужной форели, в таблице 10 – обыкновенного карпа.

Таблица 9

Рыбоводно-биологические показатели выращивания радужной форели (при массовой доле кормовой добавки в корме 0,15%)

Показатели	Опыт	Контроль
Начальная масса, г	$51,36 \pm 10,62$	$51,22 \pm 10,50$
Конечная масса, г	$109,40 \pm 11,10$	$91,47 \pm 3,50$
Общий прирост, г	58,29	40,25
Среднесуточный прирост, г	1,66	1,15
Выращивание, сутки	35	35
Выживаемость, %	97	95
Кормовой коэффициент, ед.	1,1	1,15

Опыт – корм с пробиотической добавкой

Контроль – корм без пробиотической добавки

Из таблицы 9 видно положительное влияние предлагаемой кормовой добавки на рост и выживаемость радужной форели. В эксперименте масса рыбы увеличилась в 2,1 раза, в контроле в 1,8 раза при выживаемости 97% и 95%, соответственно.

Таблица 10

Рыбоводно-биологические показатели выращивания обыкновенного карпа (при массовой доле кормовой добавки в корме 0,15%)

Показатели	Опыт	Контроль
Начальная масса, г	$731,24 \pm 14,38$	$727,33 \pm 13,68$
Конечная масса, г	$1078,54 \pm 13,78$	$1027,47 \pm 11,25$

Общий прирост, г	347,30	300,14
Среднесуточный прирост, г	11,58	10,00
Выращивание, сутки	30	30
Выживаемость, %	98	95
Кормовой коэффициент, ед.	2,85	3,25

Опыт – корм с пробиотической добавкой

Контроль – корм без пробиотической добавки

Из таблицы 10 видно положительное влияние предлагаемой кормовой добавки на рост и выживаемость обыкновенного карпа. В эксперименте масса рыбы увеличилась в 1,47 раза, в контроле в 1,41 раза при выживаемости 98% и 95%, соответственно.

В таблице 11 показано содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника радужной форели, в таблице 12 – обыкновенного карпа.

Таблица 11

Содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника радужной форели, КОЕ

(при массовой доле кормовой добавки в корме 0,15%)

Группа микроорганизмов	Опыт	Контроль
<i>Lactobacillus</i>	$3,6 \pm 0,4 \cdot 10^5$	$8,4 \pm 0,4 \cdot 10^5$
<i>Enterococcus</i>	$7,9 \pm 0,3 \cdot 10^3$	$1,6 \pm 0,2 \cdot 10^3$
БГКП, из них		
<i>E.coli</i>	$9,0 \pm 0,2 \cdot 10^2$	$3,3 \pm 0,2 \cdot 10^2$
лактозо+	$4,2 \pm 0,6 \cdot 10^3$	$4,7 \pm 0,3 \cdot 10^3$
<i>Vibrio</i>	$7,8 \pm 0,1 \cdot 10^4$	$2,5 \pm 0,2 \cdot 10^4$
<i>Bacillus</i>	$8,4 \pm 0,8 \cdot 10^4*$	$5,0 \pm 0,4 \cdot 10^3$

Таблица 12

Содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника обыкновенного карпа, КОЕ

(при массовой доле кормовой добавки в корме 0,15%)

Группа микроорганизмов	Опыт	Контроль
<i>Enterobacteriaceae</i>	$6,4 \pm 0,4 \cdot 10^7$	$7,2 \pm 0,3 \cdot 10^7$
<i>P. Pseudomonas</i>	$1,4 \pm 0,2 \cdot 10^7$	$2,2 \pm 0,3 \cdot 10^7$
<i>Bacillus subtilis</i>	$4,8 \pm 0,4 \cdot 10^7$	$1,4 \pm 0,2 \cdot 10^7$
<i>P. Staphylococcus</i>	$0,7 \pm 0,4 \cdot 10^5$	$0,2 \pm 0,1 \cdot 10^6$
<i>P. Aeromonas</i>	$1,0 \pm 0,1 \cdot 10^7$	$0,3 \pm 0,1 \cdot 10^7$

Полученные данные говорят о том, что пробиотические бактерии используемого штамма не оказывают негативного воздействия на микробиоту рыб.

Пример 4.

Норма введения пробиотической добавки в состав экструдированных кормов составила 0,18% от массы корма. В таблице 13 представлены рыбоводно-биологические показатели выращивания радужной форели, в таблице 14 – обыкновенного карпа.

Таблица 13

Рыбоводно-биологические показатели выращивания радужной форели

(при массовой доле кормовой добавки в корме 0,18%)

Показатели	Опыт	Контроль
Начальная масса, г	$54,45 \pm 12,47$	$51,22 \pm 10,50$
Конечная масса, г	$114,30 \pm 9,73$	$91,47 \pm 3,50$

Общий прирост, г	59,85	40,25
Среднесуточный прирост, г	1,71	1,15
Выращивание, сутки	35	35
Выживаемость, %	97	95
Кормовой коэффициент, ед.	1,1	1,15

Опыт – корм с пробиотической добавкой

Контроль – корм без пробиотической добавки.

Из таблицы 13 видно положительное влияние предлагаемой кормовой добавки на рост и выживаемость радужной форели. В эксперименте масса рыбы увеличилась в 2,1 раза, в контроле в 1,8 раза при выживаемости 97% и 95%, соответственно.

Таблица 14

Рыбоводно-биологические показатели выращивания обыкновенного карпа (при массовой доле кормовой добавки в корме 0,18%)

Показатели	Опыт	Контроль
Начальная масса, г	725,34±10,25	727,33±13,68
Конечная масса, г	1087,93±13,78	1027,47±11,25
Общий прирост, г	362,59	300,14
Среднесуточный прирост, г	12,09	10,00
Выращивание, сутки	30	30
Выживаемость, %	98	95
Кормовой коэффициент, ед.	2,83	3,25

Опыт – корм с пробиотической добавкой

Контроль – корм без пробиотической добавки

Из таблицы 14 видно положительное влияние предлагаемой кормовой добавки на рост и выживаемость обыкновенного карпа. В эксперименте масса рыбы увеличилась в 1,50 раза, в контроле в 1,41 раза при выживаемости 98% и 95%, соответственно.

В таблице 15 показано содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника радужной форели, в таблице 16 – обыкновенного карпа.

Таблица 15

Содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника радужной форели, КОЕ

(при массовой доле кормовой добавки в корме 0,18%)

Группа микроорганизмов	Опыт	Контроль
<i>Lactobacillus</i>	3,5±0,3·10 ⁵	8,4±0,4·10 ⁵
<i>Enterococcus</i>	8,1±0,5·10 ³	1,6±0,2·10 ³
БГКП, из них		
<i>E.coli</i>	9,0±0,3·10 ²	3,3±0,2·10 ²
лактозо+	4,0±0,3·10 ³	4,7±0,3·10 ³
<i>Vibrio</i>	7,9±0,2·10 ⁴	2,5±0,2·10 ⁴
<i>Bacillus</i>	9,0±0,5·10 ⁴ *	5,0±0,4·10 ³

Таблица 16

Содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника обыкновенного карпа, КОЕ

(при массовой доле кормовой добавки в корме 0,18%)

Группа микроорганизмов	Опыт	Контроль
<i>Enterobacteriaceae</i>	6,1±0,2·10 ⁷	7,2±0,3·10 ⁷

<i>P. Pseudomonas</i>	1,2±0,4·10 ⁷	2,2±0,3·10 ⁷
<i>Bacillus subtilis</i>	5,0±0,5·10 ⁷	1,4±0,2·10 ⁷
<i>P. Staphylococcus</i>	0,6±0,2·10 ⁵	0,2±0,1·10 ⁶
<i>P. Aeromonas</i>	1,1±0,3·10 ⁷	0,3±0,1·10 ⁷

5

Полученные данные говорят о том, что пробиотические бактерии используемого штамма не оказывают негативного воздействия на микробиоту рыб.

Пример 5.

10

Норма введения пробиотической добавки в состав экструдированных кормов составила 0,20% от массы корма. В таблице 17 представлены рыбоводно-биологические показатели выращивания радужной форели, в таблице 18 – обыкновенного карпа.

Таблица 17

Рыбоводно-биологические показатели выращивания радужной форели (при массовой доле кормовой добавки в корме 0,20%)

15

Показатели	Опыт	Контроль
Начальная масса, г	50,78±9,36	51,22±10,50
Конечная масса, г	111,80±10,47	91,47±3,50
Общий прирост, г	61,02	40,25
Среднесуточный прирост, г	1,74	1,15
Выращивание, сутки	35	35
Выживаемость, %	97	95
Кормовой коэффициент, ед.	1,1	1,15

20

Опыт – корм с пробиотической добавкой

Контроль – корм без пробиотической добавки.

25

Результаты экспериментов показали, что введение пробиотической добавки в корм для радужной форели оказало положительный эффект на рост и выживаемость. В эксперименте масса рыбы увеличилась в 2,2 раза, в контроле в 1,8 раза при выживаемости 97% и 95%, соответственно.

Таблица 18

30

Рыбоводно-биологические показатели выращивания обыкновенного карпа (при массовой доле кормовой добавки в корме 0,20%)

Показатели	Опыт	Контроль
Начальная масса, г	729,95±10,17	727,33±13,68
Конечная масса, г	1102,22±12,35	1027,47±11,25
Общий прирост, г	372,27	300,14
Среднесуточный прирост, г	12,41	10,00
Выращивание, сутки	30	30
Выживаемость, %	98	95
Кормовой коэффициент, ед.	2,82	3,25

35

Опыт – корм с пробиотической добавкой

Контроль – корм без пробиотической добавки.

40

Из таблицы 18 видно положительное влияние предлагаемой кормовой добавки на рост и выживаемость обыкновенного карпа. В эксперименте масса рыбы увеличилась в 1,51 раза, в контроле в 1,41 раза при выживаемости 98% и 95%, соответственно.

45

В таблице 19 показано содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника радужной форели, в таблице 20 – обыкновенного карпа.

Таблица 19

Содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника радужной форели, КОЕ

(при массовой доле кормовой добавки в корме 0,20%)

Группа микроорганизмов	Опыт	Контроль
<i>Lactobacillus</i>	$3,5 \pm 0,2 \cdot 10^5$	$8,4 \pm 0,4 \cdot 10^5$
<i>Enterococcus</i>	$8,4 \pm 0,1 \cdot 10^3$	$1,6 \pm 0,2 \cdot 10^3$
БГКП, из них		
<i>E.coli</i>	$9,2 \pm 0,3 \cdot 10^2$	$3,3 \pm 0,2 \cdot 10^2$
лактозо+	$3,9 \pm 0,6 \cdot 10^3$	$4,7 \pm 0,3 \cdot 10^3$
<i>Vibrio</i>	$8,1 \pm 0,1 \cdot 10^4$	$2,5 \pm 0,2 \cdot 10^4$
<i>Bacillus</i>	$9,5 \pm 0,5 \cdot 10^4$ *	$5,0 \pm 0,4 \cdot 10^3$

Таблица 20

Содержание различных групп микроорганизмов в содержимом кишечника обыкновенного карпа, КОЕ

(при массовой доле кормовой добавки в корме 0,20%)

Группа микроорганизмов	Опыт	Контроль
<i>Enterobacteriaceae</i>	$6,2 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$7,2 \pm 0,3 \cdot 10^7$
<i>P. Pseudomonas</i>	$1,1 \pm 0,4 \cdot 10^7$	$2,2 \pm 0,3 \cdot 10^7$
<i>Bacillus subtilis</i>	$5,1 \pm 0,5 \cdot 10^7$	$1,4 \pm 0,2 \cdot 10^7$
<i>P. Staphylococcus</i>	$0,5 \pm 0,2 \cdot 10^5$	$0,2 \pm 0,1 \cdot 10^6$
<i>P. Aeromonas</i>	$1,4 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$0,3 \pm 0,1 \cdot 10^7$

Полученные данные говорят о том, что пробиотические бактерии используемого штамма не оказывают негативного воздействия на микробиоту рыб.

Результаты исследований показали, что при использовании пробиотической добавки в комбикормах в количестве 0,13–0,20% (примеры 1–3) наблюдается повышение выживаемости до 97% у радужной форели, и до 98% у обыкновенного карпа в сравнении с контрольным образцом 95%, снижение кормового коэффициента на – 0,05 ед. у радужной форели. При использовании пробиотической добавки в составе комбикорма масса рыбы увеличилась в 2,1 раза при содержании добавки в количестве 0,15%, в 1,9 раз при 0,10% и в 2,2 раза при 0,20%. В контроле масса рыбы увеличилась в 1,8 раз.

Существенных отличий между микробиотой опытной и контрольной групп обнаружено не было, за исключением количества бактерий *Bacillus*. Содержание пробиотической добавки в кормах в количестве 0,13–0,20% улучшает рыбоводно-биологические показатели выращивания рыб в сравнении с контрольным образцом и образцом, содержащим пробиотическую добавку в количестве 0,10%. Сравнение опытных групп с содержанием кормовой добавки 0,13–0,18 и 0,20% не показало явных отличий, в результате чего целесообразнее и экономически выгоднее применять пробиотическую добавку в кормах в количестве 0,18%.

Предлагаемая пробиотическая кормовая добавка позволяет улучшить физиологическое состояние рыб, увеличить ее прирост.

Результаты исследований сведены в таблицу 21.

Таблица 21

Рыбоводно-биологические показатели выращивания радужной форели и обыкновенного карпа при различном содержании кормовой добавки

№ примера	Общий прирост	Среднесуточный прирост	Выживаемость, %	Кормовой коэффициент, ед.
Показатели радужной форели (при содержании добавки в корме, %)				
1 (0,10%)	45,56	1,30	96	1,15

	2 (0,13 %)	54,12	1,55	97	1,1
	3 (0,15%)	58,29	1,66	97	1,1
	4 (0,18%)	59,85	1,71	97	1,1
	5 (0,20%)	61,02	1,74	97	1,1
	Показатели обыкновенного карпа (при содержании добавки в корме, %)				
5	1 (0,10%)	304,81	10,16	96	2,96
	2 (0,13 %)	328,60	10,95	97	2,89
	3 (0,15%)	347,30	11,58	98	2,85
	4 (0,18%)	362,59	12,09	98	2,83
	5 (0,20%)	372,95	12,41	98	2,82

10

(57) Формула изобретения

Кормовая добавка с пробиотической активностью для рыб, содержащая в своем составе носитель и биомассу бактерий микроорганизмов, отличающаяся тем, что представляет собой высушенный ферментированный субстрат, состоящий из

15 пробиотического компонента – носителя в виде соевого шрота и колонизирующей его биомассы пробиотических бактерий штамма *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895arm ВКПМ В-14100 в форме спор с титром $2,0 \times 10^6$ - $3,0 \times 10^{11}$ КОЕ в 1 г кормовой добавки.

20

25

30

35

40

45