



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A23K 50/80 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2024108529, 01.04.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.04.2024

Дата регистрации:
25.06.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 01.04.2024

(45) Опубликовано: 25.06.2024 Бюл. № 18

Адрес для переписки:

460018, г. Оренбург, пр-кт Победы, 13, ОГУ,
патентный отдел 170415, ФГБОУ ВО ОГУ,
Быков Артем Владимирович

(72) Автор(ы):

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

(73) Патентообладатель(и):

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

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: АРИНЖАНОВА М.С. и др.
"Биологическое действие ультрадисперсных
частиц SiO₂, пробиотического препарата
Бифидобиом и комплекса микроэлементов на
организм карпа", Животноводство и
кормопроизводство, 2023 г. N 106 (1), стр. 48-
56. RU 2569002 C1, 20.11.2015. RU 2785408 C1,
07.12.2022. WO 2009114810 A3, 17.09.2009.

(54) Кормовая добавка для рыб, обеспечивающая коррекцию кишечной микробиоты

(57) Реферат:

Изобретение относится к рыбоводству и может быть использовано для кормления рыб. Кормовая добавка включает пробиотический препарат «Бифидобиом» в количестве 0,7 мг/кг корма с содержанием не менее 1×10^{10} КОЕ/г *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis* и ультрадисперсные частицы SiO₂ размером 126,5±9,7 нм, в количестве 200 мг/кг корма. Препарат «Бифидобиом»

предварительно растворяют в дистиллированной воде, а ультрадисперсные частицы SiO₂ предварительно обрабатывают ультразвуком в дистиллированной воде в течение 30 мин с частотой 35 кГц. Изобретение обеспечивает повышение продуктивности рыбы, подавляет патогенную и условно-патогенную микрофлору и увеличивает относительную численность потенциально полезных видов бактерий в кишечнике. 7 ил., 1 табл.

RU 2 821 578 C1

RU 2 821 578 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A23K 50/80 (2024.01)

(21)(22) Application: **2024108529, 01.04.2024**

(24) Effective date for property rights:
01.04.2024

Registration date:
25.06.2024

Priority:

(22) Date of filing: **01.04.2024**

(45) Date of publication: **25.06.2024** Bull. № 18

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

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

(73) Proprietor(s):

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

(54) **FODDER ADDITIVE FOR FISH, PROVIDING CORRECTION OF INTESTINAL MICROBIOTA**

(57) Abstract:

FIELD: fish farming.

SUBSTANCE: invention relates to fish farming and can be used for feeding fish. Fodder additive includes a probiotic preparation "Bifidobiom" in amount of 0.7 mg/kg of fodder with a content of not less than 1×10^{10} CFU/g Bifidobacterium longum, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium adolescentis and ultrafine particles of SiO₂ with size of 126.5 ± 9.7 nm, in amount

of 200 mg/kg of fodder. Preparation "Bifidobiom" is preliminarily dissolved in distilled water, and ultrafine particles of SiO₂ are pretreated with ultrasound in distilled water for 30 minutes with frequency of 35 kHz.

EFFECT: invention provides higher fish productivity, inhibits pathogenic and opportunistic microflora and increases relative number of potentially useful types of bacteria in the intestine.

1 cl, 7 dwg, 1 tbl

RU 2 821 578 C1

RU 2 821 578 C1

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

Установлено, что ультрадисперсные частицы (УДЧ) металлов могут проявлять способность к коррекции кишечной микробиоты за счет подавления плотностно-зависимой коммуникации у бактерий через подавление синтеза автоиндукторов (АИ), внеклеточное связывание АИ и блокирование комплекса «сигнальная молекула-рецепторный белок» (Sadekuzzaman M., Yang S., Mizan M.F.R., Ha S.D. Current and recent advanced strategies for combating biofilms // Compr Rev Food Sci Food Saf. - 2015. - Vol.14(4). - P.491-509. doi:10.1111/1541-4337.12144; Hayat S., Muzammil S., Shabana, Aslam B., Siddique M.H., Saqalein M., Nisar M.A. Quorum quenching: role of nanoparticles as signal jammers in Gram-negative bacteria // Future Microbiol. - 2019. - Vol.14. - P.61-72. doi:10.2217/fmb-2018-0257).

Одним из перспективных способов коррекции кишечной микробиоты является использование УДЧ SiO₂, активность которых обусловлена образованием активных форм кислорода (Chu Z., Huang Y., Li L., Tao Q., Li Q. Physiological pathway of human cell damage induced by genotoxic crystalline silicananoparticles // Biomaterials. - 2012. - Vol.33(30). - P.7540-7546. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.073). УДЧ SiO₂ способны перехватывать сигнальные молекулы (АГЛ) и в итоге вести к тушению биолюминесценции *V. fischeri* (Miller K.P., Wang L., Chen Y.P., Pellechia P.J., Benicewicz B.C., Decho A.W. Engineering nanoparticles to silence bacterial communication // Front Microbiol. - 2015. - Vol.6. - P.189. doi:10.3389/fmicb.2015.00189; Miller E.L., Kjos M., Abrudan M.I., Roberts I.S., Veening J.W., Rozen D.E. Eavesdropping and crosstalk between secreted quorum sensing peptide signals that regulate bacteriocin production in *Streptococcus pneumoniae* // ISME J. - 2018. Vol.12(10). P.2363-2375. doi:10.1038/s41396-018-0178-x). Высокая биосовместимость УДЧ SiO₂ открывает возможность повышения эффективности коррекции кишечной микробиоты с помощью сочетанного применения с пробиотическими штаммами бактерий, способных активно подавлять рост патогенных микроорганизмов.

Наиболее близким к предлагаемому по технической сущности является использование фитосоединений природного происхождения и пробиотических штаммов бактерий.

Известен способ подавления плотностно-зависимой коммуникации бактерий (WO 2009114810, А61К 31/357, А61Р 31/12, 2009 г.) с использованием компонентов лекарственных растений - эллагитанинов (вескалагина и касталагина).

Недостатком данного способа является трудоемкость процесса получения эллагитанинов из растений *Conocarpus erectus L. (Combretaceae)*.

Известна кормовая добавка из бактерий штамма *Bacillus subtilis III* с титром 2·10⁶-6·10⁹ КОЕ/г. и наполнителя (диатомит в виде обожженной крошки), подавляющая развитие патогенных микроорганизмов и способствующая формированию полезной микрофлоры в пищеварительном тракте (RU 2569002, А23К 1/16, А23К 1/175, 2015 г.).

Известна композиция на основе фитоэкстрактов, подавляющая чувство кворума у бактерий (RU 2542464, А61К 36/61, А61К 36/185, А61К 36/49, А61Р 31/04, 2015 г.), состоящая из высушенных водных или спиртовых экстракта коры дуба (*Quercus cortex*), почек березы (*Betulae gemmae*), листьев эвкалипта (*Eucalyptus folia*).

Известен способ модуляции кишечной микробиоты (RU 2738265, А61К 38/00, А61К 38/16, С07К 14/47, А23L 33/00, 2020 г.), который предусматривает пероральное введение α- и/или β-дефензинов млекопитающих.

Известен способ для ингибирования различных систем «кворум сенсинга» lux/luxr типа у бактерий (RU 2744456, А61К 31/37, А61Р 31/04, 2021 г.) с помощью кумарина.

Недостатком данных способов является её ограниченная область применения, так как используется для сельскохозяйственных животных и птицы.

Известен способ применения хвойно-энергетической добавки в кормлении рыб (RU 2676727, А23К 50/80, 2019 г.).

5 Недостатком данного способа является необходимость непосредственно перед кормлением, вымачивать корм в течение 3-х минут в хвойно-энергетической добавке, что может привести к изменению физических свойств корма и снижению усвояемости некоторых питательных веществ.

Известен способ коррекции микробиома кишечника рыб (RU 2785408, А23К 50/80, 10 2022 г.), который предусматривает введение в основной рацион пробиотического препарата «Соя-бифидум», в количестве 0,7 мл/кг корма.

Недостатком данного способа является низкая продуктивность рыб.

Известна кормовая добавка (RU 2794794, А23К 50/10, А23К 10/30, 2023), состоящая из трех высушенных водных экстракта - коры дуба, листьев березы и травы зверобоя, 15 для профилактики заболеваний и регулирования пищеварительных процессов в желудочно-кишечном тракте - увеличить грамположительные бактерии *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* и снизить грамотрицательные бактерии класса *Negativicutes*.

Недостатком добавки является её ограниченная область применения, так как используется только для жвачных животных.

20 Задачей изобретения является коррекция кишечной микробиоты кишечника рыб, с целью повышения продуктивности рыб.

Поставленная задача решается путем скармливания комбикорма, тонкий слой которого опрыскивают пробиотическим препаратом «Бифидобиом» (с содержанием не менее 1×10^{10} КОЕ/г *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*), в количестве 0,7 мг/кг корма предварительно растворенный в 25 дистиллированной воде и ультрадисперсными частицами SiO₂ полученными методом плазмохимического синтеза, размером 126,5±9,7 нм, в дозе 200 мг/кг корма, предварительно обработанные ультразвуком в дистиллированной воде в течение 30 мин с частотой 35 кГц.

30 Для осуществления способа проведены экспериментальные исследования в условиях кафедры биотехнологии животного сырья и аквакультуры Оренбургского государственного университета, в рамках которого методом пар-аналогов было сформированы 2 группы (n=30) молоди карпа. Контрольная группа (контроль) получала основной рацион (ОР), а опытная группа (опытная) - ОР + пробиотический препарат 35 «Бифидобиом» (доза 0,7 мг/кг) + УДЧ SiO₂ (доза 200 мг/кг).

В качестве ОР использовался сбалансированный по основным питательным веществам корм для карповых рыб КРК-110-1 производства ОАО «Оренбургский комбикормовый завод» (г. Оренбург). Пробиотический препарат «Бифидобиом» 40 производства ООО «Провита-Лактис» (г. Бугуруслан). УДЧ SiO₂ получены методом плазмохимического синтеза (ООО «Плазмотерм», г. Москва), размером 126,5±9,7 нм, Z-потенциал - 29±0,1 мВ.

Биологическое разнообразие микробиома кишечника рыб проводили по средству выделения ДНК с использованием набор реагентов QIAamp® DNA Mini Kit. Были 45 отобраны по три образца с каждой группы содержимого кишечника. Секвенирование образцов выполнено в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (г. Оренбург). Результаты исследований обработаны с применением общепринятых методик при помощи приложения «Excel

2010» и «Statistica 10.0».

В результате экспериментальных исследований зафиксирован ростостимулирующий эффект от включения в рацион рыб пробиотического препарата «Бифидобиом» и УДЧ SiO₂ (табл. 1). Установлено достоверное повышение живой массы карпа опытной группы на 8 - 9,8 % относительно контроля, начиная с 3 недели эксперимента.

Группа	Неделя эксперимента							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Контроль	54,1 ± 3,1	59,4 ± 3,2	62,0 ± 6,3	64,1 ± 5,7	75,2 ± 7,5	85,5 ± 9,5	96,8 ± 10,6	107,3 ± 11,5
Опытная	55,7 ± 3,0	59,9 ± 3,6	66,9 ± 4,2*	70,4 ± 4,0*	81,2 ± 5,9*	92,4 ± 6,6*	104,8 ± 9,6*	116,9 ± 10,1*

Примечание: * P ≤ 0,05

По данным высокопроизводительного секвенирования тотальной ДНК, выделенной из кишечника рыб, в опытной группе установлено увеличение индексов разнообразия кишечной микробиоты по сравнению с контролем: индекса Шеннона (фиг. 1) и индекса Симпсона (фиг. 2). На 3D диаграмме ординации точки, соответствующие образцам кишечной микробиоты отмечены отдельные изолированные кластеры (фиг. 3).

Анализ микробиома кишечника подопытных рыб установил существенные изменения соотношений бактериальных таксонов в микробиоте кишечника карпа опытной группы на всех таксономических уровнях относительно контрольных значений. В частности, наблюдалось существенное увеличение доли фил *Actinobacteria* до 24,3 %, *Firmicutes* до 23,4 %, и значительное снижение доли филы *Spirochaetes* до 29,3 % (фиг. 4).

На уровне классов значительно возростала доля *Actinobacteria* до 23,7 %, *Bacilli* до 20,6 %, *Cyanobacteria* до 1,9 %; существенно снижалась доля облигатно анаэробных бактерий классов *Fusobacteriia* до 11,3 % и *Spirochaetia* до 29,3 % (фиг. 5).

На уровне семейств существенно снижалась доля *Aeromonadaceae* до 10,2 %, *Brevinemataceae* до 29,3 %; полностью исчезло семейство *Azospirillaceae*; существенно возросли доли *Micrococcaceae* до 5,2 %, *Pseudomonadaceae* до 9,6 % (фиг. 6).

На уровне родов значительно снижались доли *Aeromonas* до 10,2 %, *Brevinema* до 29,3 %, *Cetobacterium* до 11,3 %; полностью исчез род *Niveispirillum*; возросли доли родов *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* (фиг. 7).

Анализируя полученные данные, можно сделать следующие выводы:

- Кормовая добавка для рыб состоящего из пробиотического препарата «Бифидобиом» (в количестве 0,7 мг/кг корма) и ультрадисперсных частиц SiO₂ (в количестве 200 мг/кг корма) обеспечивает коррекцию кишечной микробиоты, а именно снижает численность патогенной и условно-патогенной микрофлоры и увеличивает относительную численность потенциально полезных видов бактерий, и как следствие повышает продуктивность рыб;

- заявленное изобретение соответствует условию «промышленная применимость».

(57) Формула изобретения

Кормовая добавка для рыб, обеспечивающая коррекцию кишечной микробиоты, включающая пробиотический препарат «Бифидобиом» в количестве 0,7 мг/кг корма с содержанием не менее 1×10^{10} КОЕ/г *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis* и ультрадисперсные частицы SiO₂ размером 126,5 ± 9,7 нм, в количестве 200 мг/кг корма, причем препарат «Бифидобиом» предварительно растворяют в дистиллированной воде, а ультрадисперсные частицы SiO₂ предварительно обрабатывают ультразвуком в дистиллированной воде в течение 30 мин с частотой 35

кГц.

5

10

15

20

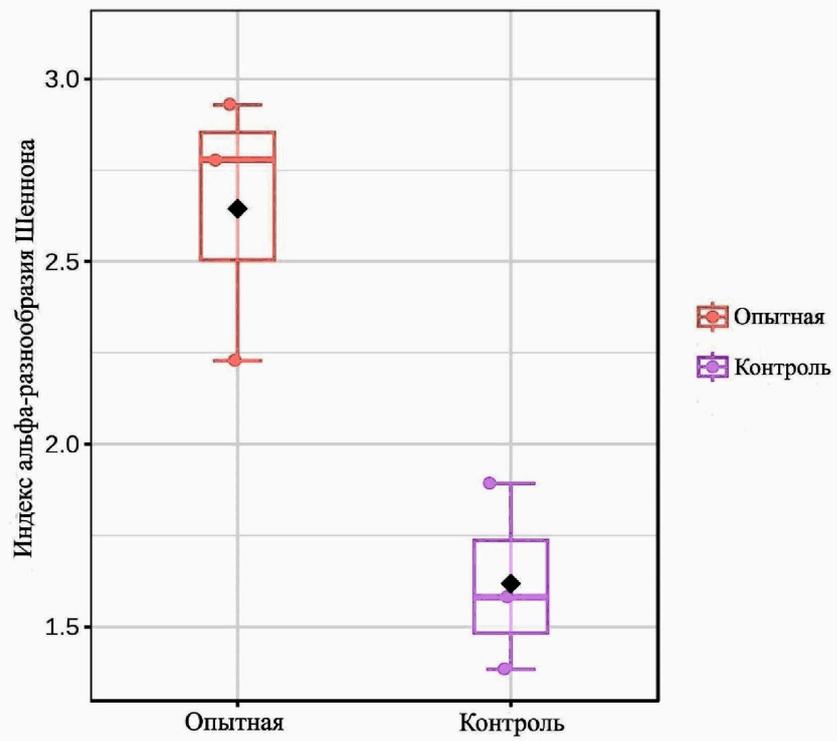
25

30

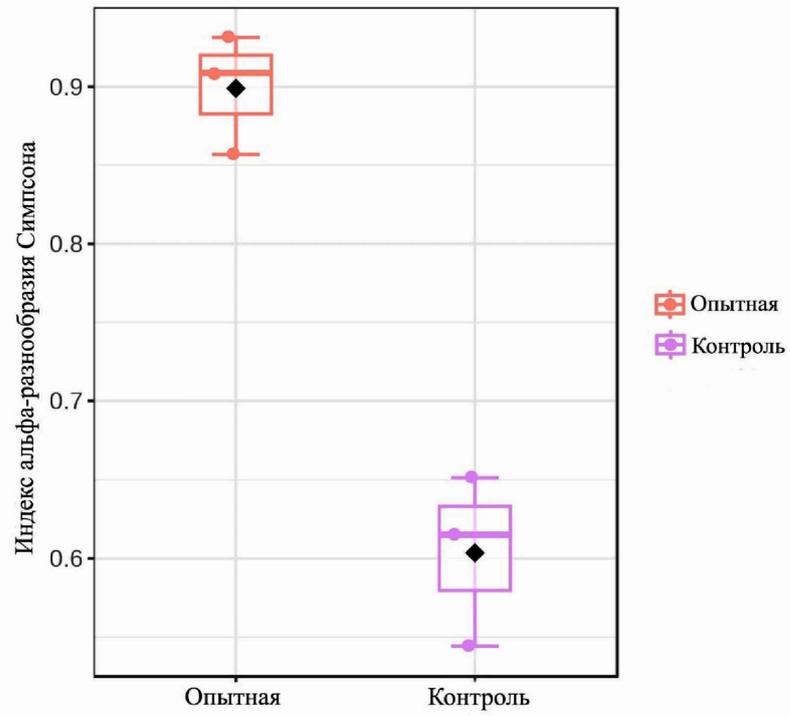
35

40

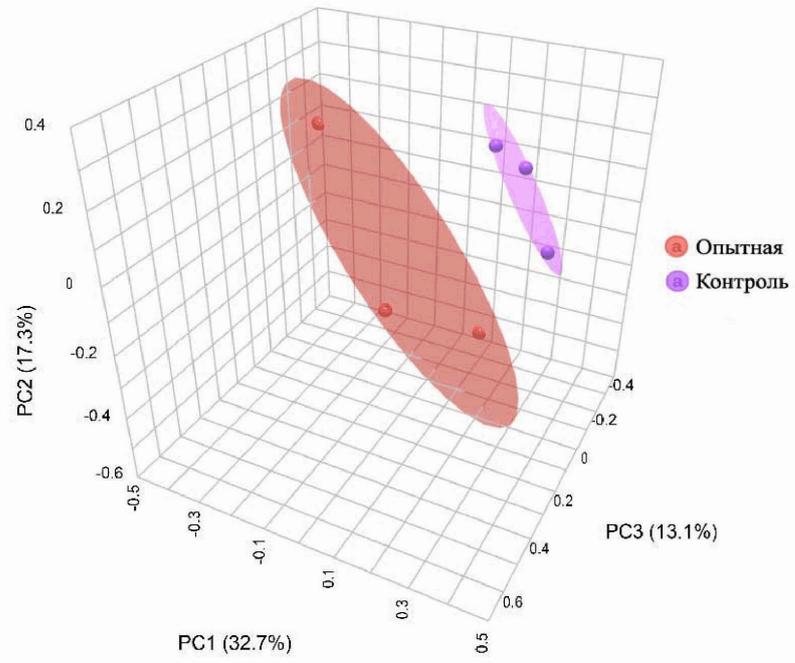
45



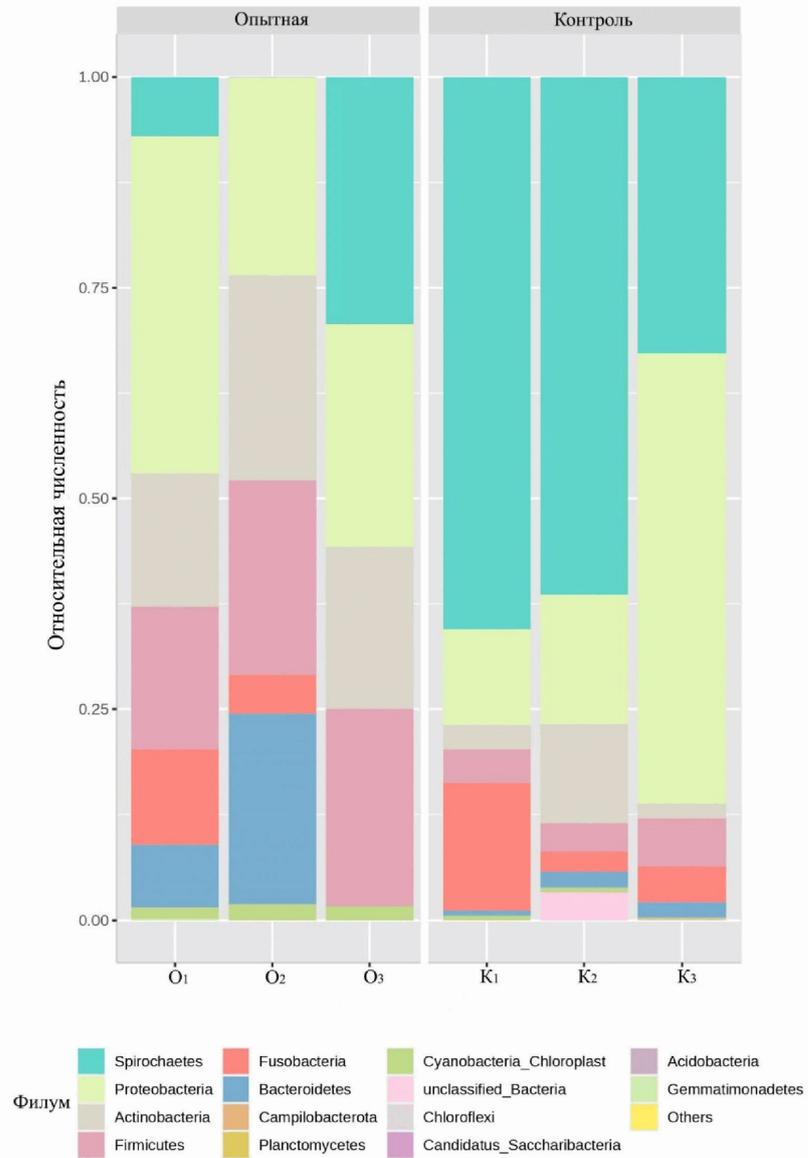
Фиг. 1



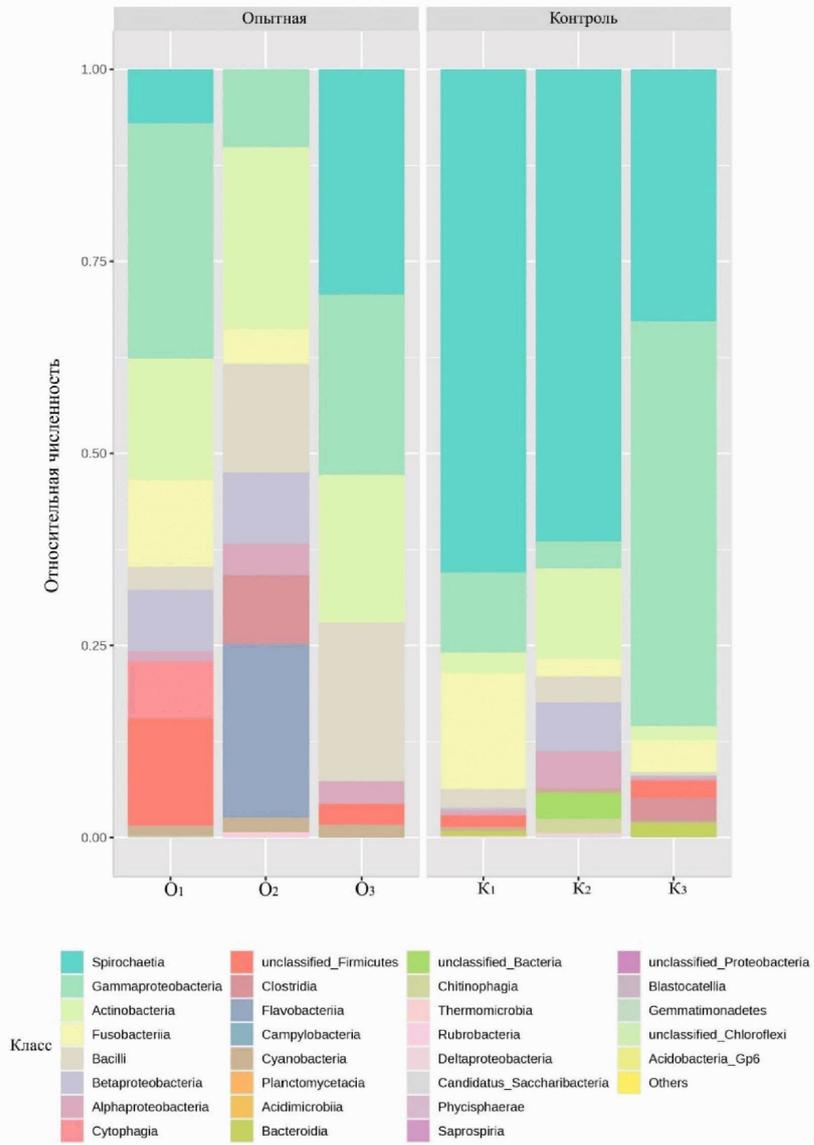
Фиг. 2



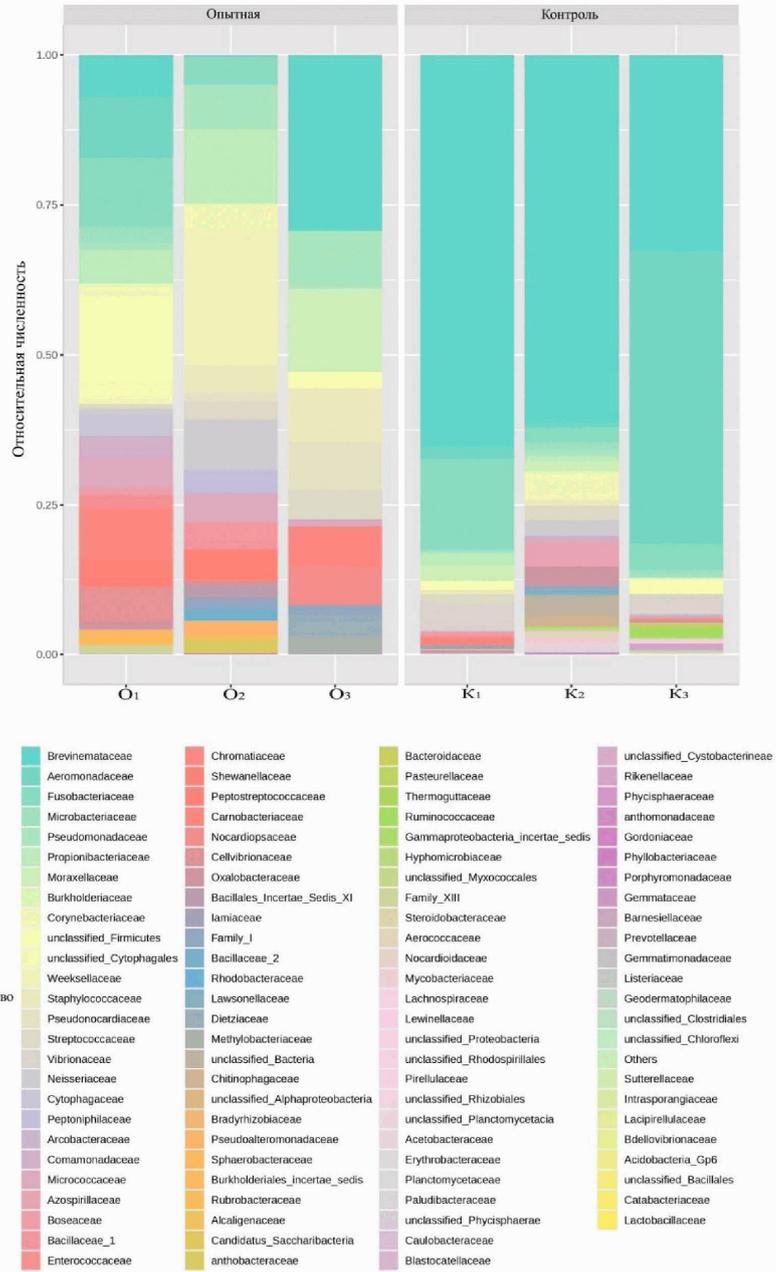
Фиг. 3



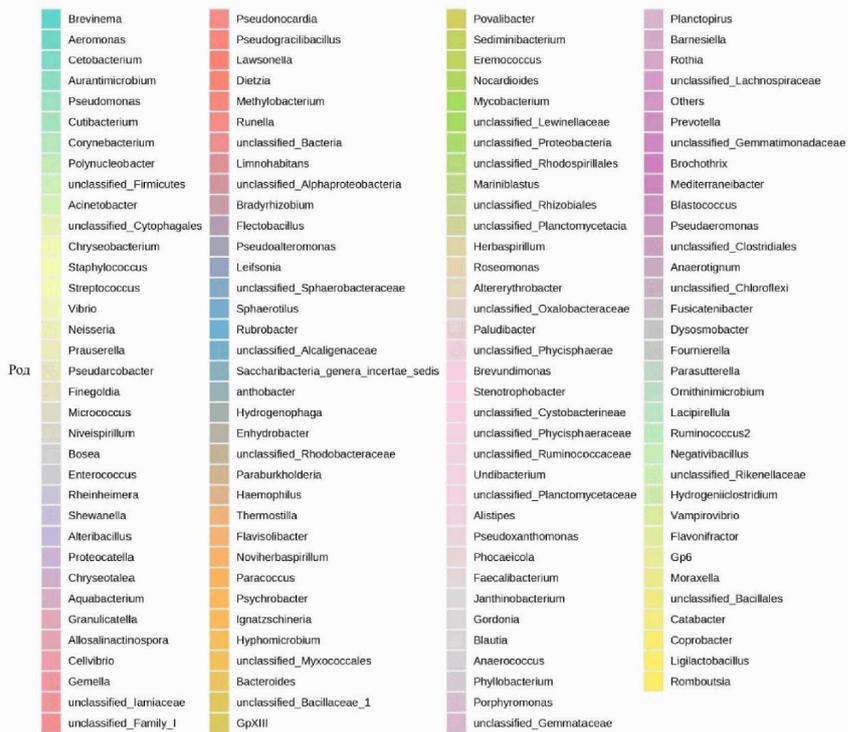
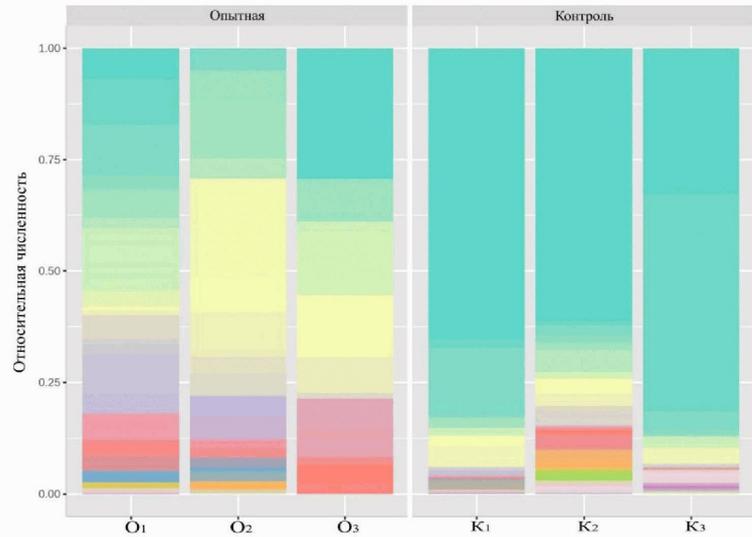
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7