

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035502**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

<p>(45) Дата публикации и выдачи патента 2020.06.25</p> <p>(21) Номер заявки 201791985</p> <p>(22) Дата подачи заявки 2016.03.16</p>	<p>(51) Int. Cl. <i>A23K 20/10</i> (2016.01) <i>A23K 10/18</i> (2016.01) <i>A23K 50/80</i> (2016.01) <i>A23K 50/70</i> (2016.01) <i>A23K 50/10</i> (2016.01) <i>A23K 50/20</i> (2016.01) <i>A61K 35/741</i> (2015.01)</p>
--	--

(54) АРХЕБАКТЕРИИ В СОСТАВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ, СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ

<p>(31) 15159277.1</p> <p>(32) 2015.03.16</p> <p>(33) EP</p> <p>(43) 2018.03.30</p> <p>(86) PCT/IB2016/051473</p> <p>(87) WO 2016/147121 2016.09.22</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец: ЭКОЛЬ ПОЛИТЕКНИК ФЕДЕРАЛЬ ДЕ ЛОЗАННА (ЭПФЛ) (CH)</p> <p>(72) Изобретатель: Сазерленд Дункан-Брюс (CH), Цайсс Марио Майкл (DE)</p> <p>(74) Представитель: Нилова М.И. (RU)</p>	<p>(56) CA-A1-2893265 US-B1-6328959 EP-A1-2251017 R. KRAJMALNIK-BROWN ET AL.: "Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation", NUTRITION IN CLINICAL PRACTICE, vol. 27, no. 2, 24 February 2012 (2012-02-24), pages 201-214, XP055246633, US, ISSN: 0884-5336, DOI: 10.1177/0884533611436116, abstract, page 12, paragraph 1 US-A1-2014328803</p>
--	---

(57) В изобретении предложена пищевая добавка, содержащая архебактерии или состоящая из архебактерий, в частности метаногенных архебактерий, для применения в качестве пробиотического вспомогательного средства в кормлении животных. Добавкой могут быть обеспечены, например, сельскохозяйственные животные в дополнение к стандартному корму или в качестве пищевой композиции. Такая добавка особенно полезна для аквакультуры и демонстрирует способность повышать темпы роста животных, снижать восприимчивость животных к паразитарным инфекциям и/или улучшать влияние фекальных отходов животных на окружающую среду. Также изобретение охватывает способы получения композиции, содержащей биологически активную пищевую добавку, а также ее применения.

B1

035502

035502

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к области кормовых (пищевых) добавок для животных, в частности к новой кормовой композиции, содержащей архебактерии, и к ее применению.

Уровень техники

С появлением промышленного разведения рыбы в начале 80-х годов индустрия аквакультуры превратилась в отрасль производства, имеющую большое значение во всем мире, предполагается, что указанная отрасль обгонит промышленное рыболовство по количеству добываемой пищи. Сообщали, что объем производства в 2006 г. составил 51,7 млн тонн со стоимостью 78,8 млрд долларов США, а ежегодные темпы роста составляют почти 7%. Согласно прогнозам ФАО предполагают, что для поддержания существующего уровня потребления на душу населения мировое производство аквакультуры к 2050 г. должно достигнуть 80 млн тонн.

Вследствие продолжающегося роста индустрии аквакультуры в указанной отрасли возникло множество новых проблем. Проблемы охраны окружающей среды, здоровья и качества, связанные с влиянием растущей индустрии аквакультуры, остались нерешенными, несмотря на затрачиваемые значительные усилия. Экологически устойчивая индустрия аквакультуры, которая минимизирует риски для морской среды и применение антибиотиков, является необходимым условием для долгосрочного роста и развития данной отрасли.

Животноводство, особенно разведение рыбы и домашней птицы, чревато проблемами, связанными с инфекционными заболеваниями. Указанные проблемы включают частые массовые потери, связанные с выбракованными животными из-за инфекционной передачи патогенов, а также из-за сильной зависимости от токсичных лекарственных средств, относящихся к типу антибиотиков. Рыбе, домашним птицам и другим сельскохозяйственным животным обычно вводят лекарственные средства, относящиеся к типу антибиотиков, для увеличения выхода продукции, несмотря на то, что чрезмерное применение антибиотиков у сельскохозяйственных животных нежелательно или не является полезным для потребителей. В индустрии аквакультуры часто происходят вспышки инфекционных заболеваний, и передача заболевания происходит быстро из-за высокой плотности животных в хозяйствах. Рыбоводы применяют антибиотики и другие противомикробные лекарственные средства в качестве способа ограничения передачи заболевания. Указанный способ повышает резистентность рыб к антибиотикам и лекарственным средствам (к чрезмерной зависимости), и, следовательно, рыбоводы вынуждены увеличивать дозы с течением времени. Более того, массовое применение противомикробных препаратов повышает избирательное давление на микробов и способствует естественному возникновению устойчивости к антибиотикам. Поэтому зачастую даже большие дозы антибиотиков не могут предотвратить крупномасштабную смертность в рыбоводческих хозяйствах. Вследствие вышеизложенного очевидно, что упор должен быть сделан на профилактике, которая на самом деле более экономична, чем лечение. Противомикробные средства, дезинфицирующие средства и пестициды в основном лечат симптомы проблемы, но не её причину. Более того, отходы производства от животноводческих хозяйств также сильно влияют на окружающую среду - например, рыбоводческие хозяйства загрязняют водные системы путём выработки избыточных нитратов. Разработка устойчивой технологии животноводства, которая увеличивает выход продукции, например темпы роста животного, например, за счет повышенного получения энергии из пищи, качество, и которая также может снизить влияние на окружающую среду, представляет собой одну из основных глобальных задач, и, вероятно, приведет к более экологически безопасной практике.

Кишечная микробиота относится к популяциям микробов, заселяющих кишечник людей и животных (Eckburg et al., *Science* 308: 1635-1638, 2005). Кишечная микробиота содержит десятки триллионов микроорганизмов, включая по меньшей мере 1000 различных видов известных бактерий с более чем 3 млн генов (в 150 раз больше чем генов человека), и общая масса кишечной микробиоты у человека может составлять до 2 кг. То, что роль кишечной микробиоты у животных имеет важное значение, и что она влияет на многие физиологические функции, которые оказывают непосредственное влияние на здоровье, было освещено в последних научных публикациях (Chervonsky, *Immunological reviews* 245: 7-12, 2012; Geuking et al., *Gut microbes* 5: 411-418, 2014; Hooper et al., *Science* 336: 1268-1273, 2012). Такие преимущества включают, среди прочего, содействие в переваривании определенных питательных веществ, содействие в предотвращении инфицирования патогенными микроорганизмами или выполнение важной роли в развитии и поддержании иммунной системы.

Принимая во внимание влияние кишечной микробиоты на показатели роста и здоровья, был введен новый подход к изменению состава кишечной микробиоты у рыб для более хорошего роста и повышенной устойчивости к инфекциям в индустрии аквакультуры (Nayak, *Fish & shellfish immunology* 29: 2-14, 2010). Общепринятое применение антибиотиков широкого спектра действия в животноводческом хозяйстве, в то же время необходимое во многих случаях, может нарушать резидентную кишечную микробиоту, что делает животных более чувствительными к патогенам, резистентным к антибиотикам. У млекопитающих в кишечной микробиоте преобладают два типа бактерий, Bacteroidetes и Firmicutes, которые вместе составляют 90% всех филогенетических типов (филотипов). Археи также представлены в кишечной микробиоте, наиболее выражены представлены метаногенные Euryarchaeote, Methanobrevibacter smithii, которые составляют вплоть до 10% от всех анаэробных микроорганизмов в толстой кишке здоро-

вых взрослых людей (Eckburg et al., 2005; Miller et al., Applied and Environmental microbiology 51: 201-202, 1986), в то время как *Methanospiraeta stadtmanae* представляют собой менее доминирующие и второстепенные элементы (Rieu-Lesme et al. Current Microbiology 51: 317-321, 2005). Археи представляют собой одноклеточные микроорганизмы, способные стимулировать метаболическую активность здоровой кишечной микробиоты, которая способствует пищеварению (Dridi et al., PloS one 4: e70632009; Samuel et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 10643-10648, 2007).

На сегодняшний день основными биологически активными компонентами, используемыми в производстве кормовых гранул для рыб, являются ПНЖК (полиненасыщенные жирные кислоты), масла, фосфолипиды, белки и пептиды, волокна, углеводы, хитозаны, витамины и минералы, фукоксантин, полифенолы, фитостеролы и таурин. Было показано, что указанные компоненты повышают устойчивость к гипертонии, окислительному стрессу, воспалению, сердечно-сосудистым заболеваниям, раковым заболеваниям и другим заболеваниям. Однако с начала 80-х годов применение пробиотиков было предложено в качестве источника пищи, а также в качестве средства биологической защиты. Пробиотик представляет собой живую микробную кормовую добавку, которая при введении в надлежащих количествах приносит пользу для здоровья хозяина. Указанная концепция была внедрена в первой половине прошлого века за счет утверждения, что зависимость кишечных микробов от пищи позволяет принимать меры по изменению флоры в организмах животных и замене вредных микробов полезными микробами. Обычно заявленные преимущества пробиотиков включают уменьшение потенциально патогенных желудочно-кишечных микроорганизмов, снижение желудочно-кишечного дискомфорта, укрепление иммунной системы, улучшение функции кожи, улучшение регулярного ритма кишечника, усиление устойчивости к аллергенам кедровой пыльцы, уменьшение патогенов в организме, снижение метеоризма и вздутия живота, защиту ДНК, защиту белков и липидов от окислительного повреждения и поддержание индивидуальной кишечной микробиоты у субъектов, которых лечат антибиотиками.

Более подробно пробиотики определяют как микроорганизмы, которые благотворно влияют на животное-хозяина путем изменения микробного сообщества, ассоциированного с хозяином или относящегося к окружающей среде, путем обеспечения улучшенного применения корма или путем повышения питания хозяина, путем усиления ответной реакции хозяина на заболевание или путем улучшения качества окружающей среды. Указанное определение особенно уместно по отношению к аквакультуре. На самом деле, в отличие от наземной среды, где кишечник представляет собой влажную среду обитания в мире с ограниченным содержанием воды, в водной среде хозяев и микроорганизмы обитают в экосистеме совместно. Поэтому в случае водных животных окружающая среда оказывает гораздо большее влияние на микробиоту, чем в случае наземных животных, и бактерии в водной среде оказывают сильное влияние на состав кишечной микробиоты хозяина. Водные животные окружены средой, поддерживающей их патогены независимо от животного-хозяина, поэтому условно-патогенные микроорганизмы могут достигать высокой плотности вокруг рыбы, таким образом, рыбы обычно поглощают указанные патогены вместе с кормом или через питье. Более того, в противоположность наземным животным, которые обладают колонизирующими бактериями, унаследованными от матери, водные животные в значительной степени зарождаются в форме аксенической икры. Окружающие бактерии колонизируют поверхность икры, и молодые личинки часто не имеют развитого кишечника (например, креветки) и/или микробного сообщества в кишечнике, жабрах или коже. Как следствие, поскольку свойства бактерий в окружающей воде очень важны, улучшение окружающей среды имеет решающее значение для здоровья разводимых животных.

Многие документы из уровня техники сообщают о применении микробных вспомогательных средств в корме для животных. В документе CN103783267 предложен способ получения рыбной муки с применением пробиотиков путем добавления отдельных штаммов *Vacillus*, *Lactobacillus*, дрожжей, актиномицетов и фотосинтетических бактерий в одной или большем количестве комбинаций. Аналогично, документ CN103875977 раскрывает смешанный корм для аквакультуры, содержащий основу и составные бактерии в корме, причем количество составных бактерий составляет 1~10% от массы продукта. Корм для водных животных был бы полезен для регулирования кишечных колоний водного биологического равновесия, предотвращения желудочно-кишечных заболеваний, содействия в пищеварении и всасывании и повышения иммунитета, и устойчивости к заболеваниям, что таким образом позволяет избежать применения антибиотиков и лекарственных средств. Составной бактериальный компонент корма для животных может включать массовые палочки, молочнокислые бактерии и *Clostridium* в массовом соотношении от 5 до 7:2 ~ 3:1 ~ 2.

В документе WO 2012/138477 раскрыт способ снижения смертности у рыб вследствие заболевания, вызванного бактерией, включающий введение указанной рыбе любого из двух штаммов С6-6, который был обозначен как образец № В-50481, и С6-8, который был обозначен как образец № В-50482, или обоих указанных штаммов совместно, в количестве, эффективном для снижения смертности вследствие заболевания, вызванного бактерией. Также раскрыт корм для рыб, содержащий любой из двух или оба вместе бактериальных штамма С6-6 и С6-8. Указанные два штамма *Enterobacter* можно применять отдельно или в сочетании друг с другом, или с одним или большим количеством других бактериальных штаммов, в качестве пробиотика для лечения и профилактики или предотвращения инфекционных забо-

леваний, таких как холодноводная болезнь у лососевых. Документ CN102132788 относится к применению пробиотических бактерий, в частности штамма *Mucosoccus fulvus*, для ограничения роста патогенных микроорганизмов в аквакультуре, повышения эффективности применения корма у рыб и снижения уровня смертности.

В документе WO2012105804 раскрыты пробиотики для биологического контроля против *Vibrio* sp. и, в частности, раскрыт недавно выделенный штамм палочек, который обеспечивает деградацию сигнальных молекул, отвечающих за ощущение кворума у патогенных бактерий *Vibrio* sp., и замедляет образование биопленки. Объектами изобретения также заявлены пробиотическая композиция, кормовая добавка, антимикробное средство или средство, улучшающее качество воды, включающие указанный штамм.

В документе WO 2003/038109 раскрыт способ замедления роста метаногенных архей, а также способ повышения эффективности корма у жвачного животного.

Несмотря на большой объем разработок в области пробиотиков и кормовых добавок для животных для улучшения и усовершенствования состояния сельскохозяйственных животных, в настоящее время существует потребность в данной области техники, особенно в области аквакультуры, в альтернативных композициях как для предотвращения патологий, вызываемых паразитами, так и для повышения усвоения энергии из пищи, и для улучшения качества фекальных отходов.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано по меньшей мере частично на открытии того факта, что организмы, принадлежащие к царству архей, особенно метаногенные археобактерии, могут быть применены в качестве натуральной биологически активной добавки для кормов для животных, в частности для сельскохозяйственных животных. Согласно одному аспекту изобретения указанные микроорганизмы могут быть, например, собраны из желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота, такого как жвачные животные, и включены в состав кормовых композиций для животных в качестве пробиотического вспомогательного вещества с целью использования и усиления встречающихся в природе биологических путей, что улучшает усвоение энергии из пищи и минимизируют заболевание, тем самым снижая зависимость от лечения антибиотиками широкого спектра действия, а также снижая влияние на окружающую среду, вызванное загрязнением от фекалий животных. С помощью применения стандартных модельных животных авторы настоящего изобретения проверили и подтвердили, что обогащение корма для животных метаногенными археями обладает потенциалом для увеличения темпов роста и усиления иммунного ответа на паразитарную инфекцию у сельскохозяйственных животных. При введении мышам кормовая добавка повышает темпы роста и барьерную функцию слизистой оболочки кишечника у модельных животных, которые более устойчивы к инфицированию прототипом кишечного паразита *N. polygygus*. У водных животных, таких как рыбы или ракообразные, в дополнение к упомянутым преимуществам, могут быть явно показаны более высокие темпы роста, усиленное пищеварение/поглощение корма и более высокий коэффициент конверсии корма, а также уменьшенное количество загрязняющих веществ в воде в ёмкости для содержания. Таким образом, было доказано, такое биологически активное вспомогательное вещество способно (i) улучшать использование энергии, что приводит к более высоким темпам роста, (ii) повышать устойчивость к инфекциям за счет снижения потребности в лечении антибиотиками широкого спектра действия и (iii) улучшать качество сточных вод, что приводит к меньшему влиянию на окружающую среду.

Соответственно задачей настоящего изобретения является обеспечение биологически активной пищевой добавки для применения в корме для животноводства, характеризующейся тем, что указанная добавка содержит по меньшей мере одну популяцию по меньшей мере одного вида археобактерий.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения по меньшей мере один вид археобактерий указанной биологически активной пищевой добавки представляет собой метаногенный вид археобактерий. В более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения метаногенный вид археобактерий представляет собой вид *Methanosphaera stadtmanae* или вид *Methanobrevibacter smithii*.

В одном варианте реализации настоящего изобретения биологически активная пищевая добавка дополнительно характеризуется тем, что по сравнению со стандартными условиями сельского хозяйства указанная добавка повышает темпы роста животных и/или снижает восприимчивость животных к паразитарным инфекциям и/или улучшает влияние фекальных отходов от животных на окружающую среду.

В одном варианте реализации настоящего изобретения биологически активная пищевая добавка дополнительно характеризуется тем, что указанная добавка по существу обогащена видами археобактерий. Дополнительно настоящее изобретение относится к обеспечению композиции, содержащей биологически активную пищевую добавку, как описано выше. В одном варианте реализации изобретения указанная выше композиция характеризуется тем, что она находится в твердой форме. В одном варианте реализации изобретения указанная композиция характеризуется тем, что она содержит от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^8 клеток археобактерий на 1 г композиции. Дополнительно настоящее изобретение относится к способу получения композиции, содержащей биологически активную пищевую добавку, как определено ранее, характеризующийся тем, что он включает в себя следующие стадии:

получение по меньшей мере одной популяции по меньшей мере одного вида археобактерий и

смешивание указанной по меньшей мере одной популяции по меньшей мере одного вида археобактерий с носителем.

В одном варианте реализации указанного способа носитель содержит или состоит из водного раствора, масла, среды для культивирования археобактерий и/или сока рубца.

В конкретном варианте реализации настоящего изобретения способ характеризуется тем, что носитель является жидким носителем и указанный способ дополнительно содержит следующие стадии:

добавление от 1 до 10% мас./об. загустителя к жидкому составу, содержащему жидкий носитель и по меньшей мере одну популяцию по меньшей мере одного вида археобактерий;

смешивание жидкого состава композиции с получением загустевшего раствора и

сушка загустевшего раствора с получением твердой композиции.

В другом варианте реализации настоящего изобретения загуститель представляет собой сахар, крахмал и/или желатин. В конкретном варианте реализации изобретения по меньшей мере одну популяцию по меньшей мере одного вида археобактерий получают путем выделения из экстракта рубца.

Дополнительно настоящее изобретение относится к композиции для применения в корме для животноводства, полученной посредством описанного выше способа.

Дополнительно настоящее изобретение относится к способу повышения темпов роста сельскохозяйственных животных, способу снижения восприимчивости к паразитарным инфекциям у сельскохозяйственных животных и способу улучшения влияния фекальных отходов сельскохозяйственных животных на окружающую среду, каждый из указанных способов включает стадию обеспечения (предоставления) сельскохозяйственным животным биологически активной пищевой добавки или композиции, как описано выше. Дополнительно настоящее изобретение относится к популяции метаногенных видов археобактерий для применения при получении биологически активной пищевой добавки для применения в корме для животноводства.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения сельскохозяйственные животные, на которых сделана ссылка в описанных выше биологически активной пищевой добавке, композиции, способах и популяции, представляют собой птиц, млекопитающих или водных животных.

Как упоминалось, пищевая добавка согласно настоящему изобретению может быть преимущественно применена в животноводстве. Настоящее изобретение, однако, не ограничено указанным применением. Указанная пищевая добавка также может быть введена домашним животным, животным, содержащимся в неволе, или людям.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано, что биологически активная пищевая добавка способствует увеличению массы тела у мышей дикого типа, не использовавшихся ранее в опытах. Свободных от патогенной микрофлоры (СПФ), заселенных в клетки самок мышей C57BL/6 (n = 6) в возрасте 6 недель кормили зерновым кормом, содержащим биологически активную пищевую добавку, или необработанным контрольным кормом в течение 7 недель, и измеряли массу тела. Масса тела не была достоверно различной между группами в начале эксперимента. Масса тела была достоверно повышена у мышей после 4 недель приема биологически активной пищевой добавки по сравнению с мышами, получавшими необработанный корм. Масса тела мышей, получавших добавку к корму, оставалась повышенной в течение оставшейся части эксперимента.

На фиг. 2 показано, что биологически активная пищевая добавка поддерживает размер пейеровой бляшки у мышей дикого типа, не использовавшихся ранее в опытах. СПФ, заселенных в клетки самок мышей C57BL/6 (n = 6) в возрасте 6 недель, кормили зерновым кормом, содержащим биологически активную пищевую добавку, или необработанным контрольным кормом в течение 7 недель, и затем мышам препараты, и пейеровы бляшки кишечника оценивали по размеру. У мышей, получавших корм, содержащий биологически активную пищевую добавку, были явно более крупные пейеровы бляшки.

На фиг. 3 показано, что биологически активная пищевая добавка повышает устойчивость к кишечному паразиту *N. polygugus*. СПФ, помещенных в клетки самок мышей C57BL/6 (n = 6,4), в возрасте 6 недель кормили зерновым кормом, содержащим биологически активную пищевую добавку, или необработанным контрольным кормом. Мышей затем инфицировали через желудочный зонд 200 инфекционными единицами *N. polygugus*, и инфекционность определяли между 2-6 неделями после инфицирования, измеряя число яиц паразита в фекалиях. Мыши, получавшие биологически активную пищевую добавку в своем рационе, имели достоверно уменьшенное число яиц паразита на 1 г фекалий по сравнению с контрольной группой.

На фиг. 4 показано, что биологически активная пищевая добавка снижает массу паразита в кишечнике мышей. СПФ, помещенных в клетки самок мышей C57BL/6, (n = 4-6), в возрасте 6 недель кормили зерновым кормом, содержащим биологически активную пищевую добавку, или необработанным контрольным кормом. Мышей затем инфицировали через желудочный зонд 200 инфекционными единицами *N. polygugus*, и зрелую массу паразитов определяли через 6 недель после инфицирования путем препарирования мышей и проведения визуальных подсчетов паразитов в просвете кишечника. Паразитарная нагрузка была явно снижена у мышей, получавших биологически активную пищевую добавку, по сравнению с контрольной группой.

На фиг. 5 показан анализ *in vitro* для определения увеличения ингибирующего действия архей на три различных вида патогенных вибрионов. Кадр a: *V. harveyi* BB120 на морском агаре; кадр b: *V. campbellii* LMG21363 на морском агаре; кадр c: *V. parahaemolyticus* PV1 на морском агаре; кадр d: *V. harveyi* BB120 на агаре с девятью солями; кадр e: *V. campbellii* LMG21363 на агаре с девятью солями; кадр f: *V. parahaemolyticus* PV1 на агаре с девятью солями.

На фиг. 6 показаны результаты теста на *in vivo* для оценки влияния археобактерий на выживаемость (%) *Artemia nauplii*, подвергнутых патогенному *Vibrio harveyi* BB120 в течение 48 ч. Значения представляют собой среднее \pm стандартную ошибку среднего значения ($n = 5$). Столбцы, обозначенные разными буквами, достоверно отличаются (однофакторный дисперсионный анализ, $p \leq 0,05$).

На фиг. 7 показана кривая увеличения массы в течение четырех месяцев и двух недель для трех экспериментальных групп: контрольной, группы, получавшей корм с низкой дозой добавки, и группы, получавшей корм с высокой дозой добавки. Точки данных соответствуют средней массе ряда особей каждой группы со столбцом, показывающим ошибку стандартного отклонения.

На фиг. 8 показан анализ загрязняющих веществ в выделениях рыб в воде в трех экспериментальных группах. А) Средняя концентрация фосфата для 3 повторений. Представленные значения фосфата были получены после вычитания концентрации, измеренной в воде до эксперимента, и приведены в виде фосфатов в мг/л и на 1 мг от общей массы рыбы в емкости. В) Средняя концентрация нитритов для 3 повторений. Представленные значения приведены в виде нитритов в мг/л и на мг от общей массы рыбы в емкости.

Описание вариантов реализации настоящего изобретения

Настоящее изобретение может быть более легко понято со ссылкой на следующее подробное описание, представленное вместе с прилагаемыми чертежами, которые составляют часть настоящего изобретения. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными условиями или параметрами, описанными и/или показанными в настоящей заявке, и что применяемая в настоящей заявке терминология предназначена для описания конкретных вариантов реализации изобретения только в качестве примера и не предназначена для ограничения заявленного изобретения.

Так, например, ссылка на "композицию" включает в себя множество композиций, и ссылка на "пробиотик" включает ссылку на по меньшей мере один пробиотик, и так далее.

Кроме того, применение "или" означает "и/или", если не указано иное. Аналогично термины "содержать", "содержит", "содержащий", "включать", "включает" и "включающий" являются взаимозаменяемыми и не предназначены для ограничения. Следует также понимать, что, когда в описаниях различных вариантов реализации изобретения применяют термин "содержащий", специалистам в данной области техники будет понятно, что в некоторых конкретных случаях вариант реализации изобретения может быть альтернативно описан с использованием формулировок "состоящий по существу из" или "состоящий из". В рамках настоящего изобретения "биологически активная пищевая добавка", в дальнейшем также называемая иногда как просто "добавка", представляет собой любой тип пищевой добавки, содержащий активное вещество. Выражение "активное вещество", а также "биологически активное соединение" обозначает любой химический или биологический объект, который биологически активен, т.е. оказывает влияние на живой организм, ткань или клетку. Указанное выражение применяют в настоящей заявке для обозначения любого соединения, которое изменяет, ингибирует, активирует или иным образом воздействует на биологические или химические события. В частности, активное вещество или биологически активное соединение согласно настоящему изобретению действует по существу как пробиотик, т.е. благотворно влияет на животное-хозяин путем изменения микробного сообщества, ассоциированного с хозяином или относящегося к окружающей среде, путем обеспечения улучшенного применения корма или путем повышения его питания, путем повышения ответной реакции хозяина на заболевание или путем улучшения качества окружающей среды. Более конкретно, в рамках настоящего изобретения биологически активное соединение, характеризующее биологически активную пищевую добавку, содержит по меньшей мере одну популяцию по меньшей мере одного вида археобактерий.

В контексте настоящего документа термин "популяция" обозначает группу отдельных организмов того же вида, определенных во времени и пространстве. Однако указанный термин может быть также подразумевать сообщество, т.е. группу организмов, населяющих определенную экологическую нишу, которая могла бы включать любое количество видов. В контексте настоящего документа термин "популяция" также обозначает "смешанную популяцию". Как будет очевидно специалисту в соответствующей области техники, популяция видов археобактерий для включения в биологически активную пищевую добавку может быть получена, если коммерчески доступный вариант не предусмотрен, посредством любого общего метода выделения, включая метод серийного разбавления, метод штриховой плиты, чашечный/поверхностный метод, метод культивирования в обогачительной среде, методы, использующие селективные питательные среды, методы, использующие дифференциальные среды, и т.д.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения активное вещество биологически активной пищевой добавки представляет собой метаногенные виды археобактерий, то есть виды археобактерий, которые продуцируют метан в качестве побочного продукта метаболизма в бескислородных условиях. Метаногены представляют собой разнообразную группу облигатных анаэробов,

которые широко распространены в природе и могут быть найдены во множестве постоянно бескислородных местах обитания, таких как затопленные почвы, осадочные отложения, дигесторы для сточных вод или пищеварительный тракт некоторых животных. Все известные метаногены относятся к археям и чрезвычайно чувствительны к кислороду. Отличительной особенностью метаногенов является восстановление соединений C-1 (например, CO₂, метилового спирта, формиата или N-метильных групп) до метана (CH₄). Метаногены играют жизненно важную экологическую роль в анаэробных средах для удаления избыточного водорода и продуктов ферментации, которые были получены посредством анаэробного дыхания других форм. Метаногенные археи также играют ключевую роль в экосистемах с организмами, которые получают энергию от окисления метана, многие из которых являются бактериями, поскольку метаногенные археи часто являются основным источником метана в таких средах и могут выступать в качестве первичных продуцентов. Метаногены также играют важную роль в углеродном цикле, разлагая органический углерод до метана, который также является основным парниковым газом. Метаногенез также встречается в кишечнике людей и других животных, в особенности жвачных животных. В рубце жвачного животного анаэробные организмы, включая метаногенов, переваривают целлюлозу в формы, используемые животным. Без этих микроорганизмов животные, такие как крупный рогатый скот, не смогли бы потреблять траву. В кишечнике поглощаются полезные продукты метаногенеза, в то время как животное выделяет метан. Список метаногенных видов архей включает *Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium formicum*, *Methanobrevibacter arboriphilicus*, *Methanobrevibacter gottschalkii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanococcus chunghsingensis*, *Methanococcus burtonii*, *Methanococcus aeolicus*, *Methanococcus deltae*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanococcus vanniellii*, *Methanocorpusculum labreanum*, *Methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus marisnigri*, *Methanoflorens stordalenmirensis*, *Methanofollis liminatans*, *Methanogenium cariaci*, *Methanogenium frigidum*, *Methanogenium organophilum*, *Methanogenium wolfei*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanopyrus kandleri*, *Methanoregula boonei*, *Methanosaeta concilii*, *Methanosaeta thermophila*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanothermobacter defluvii*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanothermobacter thermoflexus*, *Methanothermobacter wolfei* and *Methanothermobacter soehngenii*. В одном варианте реализации настоящего изобретения виды археобактерий, применяемые в качестве активного вещества для биологически активной пищевой добавки согласно настоящему изобретению, представляют собой виды *Methanosphaera stadtmanae* и/или *Methanobrevibacter smithii*.

Биологически активная пищевая добавка согласно настоящему изобретению характеризуется тем фактом, что содержит по меньшей мере одну популяцию по меньшей мере одного вида археобактерий. Тем не менее, несколько других веществ могут присутствовать в добавке, в частности другой вид пробиотиков. Это особенно справедливо, когда, как будет подробно описано далее, указанная популяция археобактерий была получена из экстрактов рубца крупного рогатого скота, где может присутствовать смесь нескольких микроорганизмов (обычно называемая микробиотой). Без обязательной привязки к указанной теории, некоторые наблюдения, сделанные авторами настоящего изобретения, предполагают, что популяции археобактерий поддерживают положительный симбиоз и способствуют соответствующим окружающим условиям роста/распространения так называемой "связанной с археями микробиоты" (т.е. совокупности микроорганизмов, которые обычно устанавливают симбиотическую связь в определенной среде с археобактериями, включая, например, анаэробные/ферментирующие пробиотики), в частности исходя из предохранения сложной популяции, содержащей больше типов анаэробных микроорганизмов. Равновесие между более чем одним пробиотиком в пищевой добавке, обогащенной археобактериями, согласно настоящему изобретению, возможно, представляет собой одну из ключевых особенностей отмеченных положительных эффектов добавки согласно настоящему изобретению для сельскохозяйственных животных. Соответственно, в некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения биологически активная пищевая добавка характеризуется тем фактом, что она по существу обогащена видами археобактерий. В контексте настоящего документа термин "по существу обогащенный" означает, что популяция клеток архей в добавке согласно настоящему изобретению составляет по меньшей мере 1% от всех микробных пробиотических клеток, предпочтительно от приблизительно 2 до приблизительно 10% от всех микробных пробиотических клеток. Указанное обогащение имеет благотворное влияние, описанное выше, когда в композиции присутствует более одной популяции микроорганизмов, предпочтительно пробиотических микроорганизмов. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения более высокие проценты, такие как 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 вплоть до 100% микробных клеток, присутствующих в добавке, являются клетками архей, т.е. биоактивная пищевая добавка не содержит никаких других микроорганизмов, включая пробиотические микроорганизмы.

Как сказано ранее, биологически активная пищевая добавка согласно настоящему изобретению действует как пробиотик. В частности, одной из задач биологически активной пищевой добавки согласно настоящему изобретению является иммунизация и/или повышение определенных аспектов физиологии сельскохозяйственных животных, а также последующее влияние, которое указанные улучшенные условия, связанные с физиологией, оказывают на окружающую среду. Как объяснено в разделе существующего уровня техники, это особенно справедливо для аквакультуры, где сельскохозяйственные животные

(в данном случае, водные животные, такие как рыбы, угри или ракообразные) имеют чрезвычайно тесную связь с окружающей средой, в которой их выращивают. Однако сельскохозяйственные животные согласно настоящему изобретению также могут быть птицами, такими как курицы, домашние птицы, страусы и т.п., или млекопитающие, например одомашненные животные, такие как крупный рогатый скот, овцы, свиньи, лошади, грызуны и т.п., и также, возможно, приматы и люди. Соответственно, биологически активная пищевая добавка характеризуется тем фактом, что она действует на физиологические параметры животных, положительно влияя на них таким образом, что сельскохозяйственные условия преимущественно улучшены по сравнению со стандартными сельскохозяйственными условиями. В частности, биологически активная пищевая добавка согласно настоящему изобретению является полезной для повышения темпов роста животных и/или для снижения восприимчивости животных к паразитарным инфекциям, и/или для улучшения влияния фекальных отходов от животных на окружающую среду. Указанные полезные свойства добавки согласно настоящему изобретению были показаны, как будет подробно описано ниже в разделе "Примеры", как на модельных млекопитающих животных, так и на модельных водных животных, которых кормили добавкой в течение соответствующего периода времени, подтверждая, таким образом, указанные выше положительные свойства. Поэтому, кроме того, одной задачей настоящего изобретения является обеспечение способов повышения скорости темпов роста животных, снижение восприимчивости животных к паразитарным инфекциям или улучшении влияния фекальных отходов от животных на окружающую среду, причем указанные способы включают стадию введения биологически активной пищевой добавки, или композиции, содержащей биологически активную пищевую добавку сельскохозяйственному животному. Поэтому, в соответствии с вышеизложенным, согласно одному аспекту настоящего изобретения также обеспечена композиция, характеризующаяся тем, что она содержит биологически активную пищевую добавку согласно настоящему изобретению. В рамках настоящего изобретения термин "композиция" используется взаимозаменяемо с термином "состав". В контексте настоящего документа "композиция", обозначает смесь ингредиентов или соединений, полученную определенным образом, и применяемую с определенным назначением. Указанная концепция также явно связана со способом, в котором различные соединения, включающие активное вещество, объединяют для получения конечного продукта. Обычно, поскольку ингредиенты придают особые свойства конечному продукту (т.е. конечной композиции), когда продукт применяют, указанные ингредиенты смешивают в соответствии с конкретной формулой, чтобы получить характерные свойства для конечной композиции, такие как, например, достижение эффектов, которые не могут быть получены из её компонентов, когда их применяют по отдельности, более высокую степень эффективности для содействия любому потенциальному синергетическому действию их компонентов, чтобы улучшить технологические свойства и/или безопасность для потребителя и т.п.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть в различных формах, причем предпочтительная форма обычно зависит от предполагаемого способа введения и/или предполагаемого применения. Композиции обычно содержат по меньшей мере один приемлемый носитель для активного вещества (и который также может служить в качестве разбавляющего средства), вспомогательные вещества и т.д. В контексте настоящего документа термин "приемлемый носитель" представляет собой любое вещество, действующее как средство доставки, а также, при необходимости, диспергирующее средство для активного вещества. Указанный термин включает любые и все растворители, жидкие разбавляющие средства, средства, замедляющие поглощение, и т.п., которые физиологически совместимы с потребителем, в данном случае сельскохозяйственным животным, но также твердые носители в виде предварительно составленной кормовой гранулы. Примеры подходящих носителей хорошо известны в данной области техники и включают водные растворы (например, растворы хлорида натрия, фосфатные буферные раствор, содержащий хлорид натрия и т.п.), воду, масла, такие как рыбные жиры, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих веществ и т.д.

Согласно настоящему изобретению композиция может быть обеспечена в жидкой форме. Жидкая композиция представляет собой композицию, в которой носитель представляет собой жидкий носитель, и которая поддерживает жидкую форму, несмотря на присутствие любого другого добавленного вспомогательного вещества. Жидкий состав включает, например, водные растворы, неполярные растворы или эмульсии. "Водный раствор" представляет собой раствор, в котором растворитель по существу состоит из воды. В рамках настоящего изобретения термин "водный" означает относящийся к воде, связанный с водой, подобный воде или растворенный в воде. Указанное выражение также включает высококонцентрированные и/или вязкие растворы, такие как, например, сиропы (например, растворы насыщенная вода/сахара) и т.п., в которых содержание воды составляет, например, менее 5% от массы всего раствора. "Неполярный раствор" представляет собой раствор, в котором растворитель является неполярным соединением. Неполярные растворители предназначены для соединений, которые имеют низкие диэлектрические постоянные и которые не смешиваются с водой. Неполярные растворы могут содержать, например, масла. "Масло" представляет собой любое неполярное химическое вещество, которое представляет собой вязкую жидкость при температуре окружающей среды и представляет собой одновременно гидрофобной и липофильную жидкость. Согласно настоящему изобретению особенно подходящие масла представляют собой рыбные жиры. "Эмульсия" представляет собой смесь двух или более текучих сред, которые

обычно являются расслаивающимися (не смешиваются). Эмульсии являются частью более общего класса систем веществ, называемых коллоидами. Хотя термины коллоид и эмульсия иногда используют как взаимозаменяемые, в рамках настоящего изобретения термин "эмульсия" используют, когда и дисперсная, и дисперсионная фаза являются текучими средами, такими как, например, жидкости. В эмульсии одна текучая среда ("дисперсная фаза") распределяется в другой ("дисперсионная фаза").

Согласно одному конкретному варианту реализации настоящего изобретения композиция, содержащая биологически активную пищевую добавку согласно настоящему изобретению, поступает в виде твердой формы, то есть состав, в котором носитель представляет собой твердый носитель или в котором содержание жидкого носителя (или жидкой композиции) и/или присутствие дополнительных вспомогательных веществ в жидком носителе (или жидкой композиции) является таким, чтобы создать нетекучую композицию. Это включает, среди прочего, также полутвердые композиции, лиофилизированные композиции, порошкообразные составы, гелеобразные материалы, составные гидрогели и т.п. В контексте настоящего документа термин "гель" обозначает нетекучую коллоидную сетку или полимерную сетку, которая расширяется по всему ее объему за счет текучей среды. Гель представляет собой твердую пространственную полимерную сетку, которая включает объем жидкой среды и поглощает ее за счет сил поверхностного натяжения. Структура внутренней сетки может быть результатом физических связей (физические гели) или химических связей (химические гели). В контексте настоящего документа термин "гидрогель" относится к гелю, в котором вызывающее набухание средство представляет собой водный раствор. Гидрогель представляет собой макромолекулярный полимерный гель, составленный из сетки поперечно-сшитых полимерных цепей. Гидрогель синтезируют из гидрофильных мономеров, иногда находится в виде коллоидного геля, в котором вода представляет собой дисперсионную среду. Гидрогели представляют собой хорошо поглощающие влагу (они могут содержать более 90% водного раствора) натуральные или синтетические полимерные сетки. В результате их характеристик гидрогели проявляют типичные твердые, но эластичные механические свойства.

Твердая композиция также может быть создана, как указано, путем добавления определенных вспомогательных веществ к жидкому носителю или жидкой композиции. Указанный подход особенно выгоден, когда, как должно быть в случае настоящего изобретения, жидкий раствор уже содержит активное вещество. В одном варианте реализации настоящего изобретения на самом деле архебактерии (в сущности активное вещество согласно настоящему изобретению) культивируют в жидкой культуральной среде (также называемой "бульон"). Если твердая композиция предназначена для применения для кормления животных, такая жидкая среда для культивирования может быть отверждена или загущена путем добавления загущающего агента (загустителя). "Загущающий агент" или "загуститель" представляет собой вещество, которое может увеличивать вязкость жидкости без существенного изменения других ее свойств. Загустители также могут улучшить суспензию других ингредиентов или эмульсий, что повышает стабильность продукта. Пищевые загустители часто основаны либо на полисахаридах (крахмал, растительная камедь и пектин), либо на белках. К указанной категории относятся крахмалы, такие как аррорут, кукурузный крахмал, катакуруко крахмал, картофельный крахмал, саго, тапиока и производные указанных крахмалов. Растительные камеди, применяемые в качестве пищевых загустителей, включают альгинин и его соли (например, альгиновую кислоту (E400), альгинат натрия (E401), альгинат калия (E402), альгинат аммония (E403), альгинат кальция (E404)), гуаровую камедь, камедь бобов рожкового дерева и ксантановую камедь. Белки, применяемые в качестве пищевых загустителей, включают коллаген, яичные белки, фуцелларан и желатин. Сахара включают агарозу, трегалозу, сахарозу, глюкозу, маннит и каррагенан. Некоторые загустители представляют собой гелеобразующие агенты (гелеобразователи), образующие гель, растворяющийся в жидкой фазе в виде коллоидной смеси, которая образует слабо связанную внутреннюю структуру. Типичные гелеобразующие агенты включают, например, природные камеди, крахмалы, пектины, агар-агар и желатин. Различные загустители могут быть более или менее подходящими в приведенном применении из-за различий во вкусе, прозрачности и их ответных реакций на химические и физические условия. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения загуститель, включенный в кормовые композиции, выбирают из сахара, желатина и/или крахмала.

Композиция обычно содержит, в зависимости от частных потребностей, другие компоненты, такие как, например, органические кислоты или их соли; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; низкомолекулярные (менее десяти остатков) (поли)пептиды, например полиаргинин или трипептиды; белки, такие как белки, полученные из растительного источника, например сои; аминокислоты, такие как глицин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лизин, метионин, триптофан или аргинин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие целлюлозу или ее производные, глюкозу, маннозу или декстрины; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; витамины; масла, такие как соевое масло; жирные кислоты; фосфолипиды и/или ионы, такие как натрий. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения твердая композиция может быть также предложена таким образом, чтобы впоследствии она была растворима в воде, такой как питьевая вода, для того чтобы она имела простой способ доставки "по требованию" для сельскохозяйственных животных, таких как куры и свиньи, при этом сохраняя все преимущества твердых составов (простота хранения, точная дозировка, вакуумная

упаковка и т.п.). Независимо от формы состава одним из важных аспектов композиций согласно настоящему изобретению является содержание в составе клеток архей, которое предложено для того, чтобы оказывать физиологическое действие, характерное для пробиотиков. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения композиция отличается тем, что она содержит от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^8 клеток археобактерий на 1 г композиции. Исходя из этого, дозировка может быть оптимизирована в соответствии с несколькими параметрами, такими как тип животного, его рацион, его масса и т.д. В любом случае указанный выше диапазон концентраций не является ограничивающим, и в рамках настоящего изобретения могут быть предусмотрены более низкие или более высокие диапазоны. В одном описании биологически активная пищевая добавка по настоящему изобретению может быть смешана с, например, предварительно созданным или коммерчески доступным кормом для сельскохозяйственных животных: от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^8 клеток археобактерий на 1 г конечного корма для животных после смешивания, такую смесь считают предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения. Другой аспект настоящего изобретения основан на способах получения композиции согласно настоящему изобретению, а также на композициях, полученных посредством указанных способов. В общем случае, согласно настоящему изобретению способ получения композиции, подходящей в качестве корма для животных, включает стадии получения по меньшей мере одной популяции по меньшей мере одного вида археобактерий и её смешивания с подходящим носителем. В зависимости от потребностей носитель может быть жидким носителем или твердым носителем, так что может быть получен жидкий состав или твердый состав.

Как было бы понятно специалисту в данной области, популяция по меньшей мере одного вида археобактерий может быть получена любым известным способом, таким как приобретение у производителей изолированных штаммов археобактерий (включая лиофилизированные формы археобактерий), культуру археобактерий в подходящих средах для культивирования (таких как, например, среда *Methanospaera Medium I* или *Methanobacterium Medium* из Института Лейбница DIMZ-Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур GmbH) с или без стадии гранулирования и т.п. Дополнительно или альтернативно, археобактерии могут быть получены из других источников, таких как, например, выделение из экстракта рубца, например, крупного рогатого скота. Экстракт рубца представляет собой идеальную среду для культивирования археобактерий, поскольку содержит питательные вещества, которые питают микроорганизмы (особенно метаногенные археи) в идеальных условиях культивирования - анаэробные условия в рубце коровы. Путем рутинных лабораторных обработок большое количество экстракта рубца может быть получено из одной коровы в день; экстракт рубца может быть, по возможности, стерилизован (например, посредством воздействия кислорода и/или экстремальных температур), и полученный из него сок рубца может быть использован в качестве основы для культивирования археобактерий в анаэробных, контролируемых лабораторных условиях. Кроме того, высокий функциональный потенциал метаногенной микробиоты коровы может быть сохранен даже при немедленном получении после смерти крупного рогатого скота и затем использован для того, чтобы способствовать лучшему перевариванию пищи на основе растений и активации иммунной системы для сельскохозяйственных животных, таких как курицы, свиньи и рыбы. Например, анаэробная микробиота рубца коров после их смерти может быть экстрагирована из рубца механическим прессованием таким образом, чтобы получить сок рубца, обогащенный метаногенными археями; сок рубца может быть фильтрован на сетчатом фильтре и, по возможности, в итоге сохранен путем обычной сушки сублимацией или распылительной сушки с применением подходящего криопротектора (сахар, крахмал, желатин и т.д.).

После получения популяции по меньшей мере одного вида археобактерий его смешивают с носителем: либо жидким, либо твердым носителем. В некоторых аспектах, в частности, когда предусмотрена жидкая композиция, носитель может быть даже одним и теми же средой для культивирования и/или соком рубца, полученным из экстракта рубца после процесса экстракции (например, прессованием экстракта рубца), в котором были культивированы микроорганизмы.

В конкретном варианте реализации настоящего изобретения для получения твердой композиции, начиная с жидкой композиции, могут быть выполнены дополнительные стадии. Согласно настоящему изобретению конкретный способ предусматривает добавление от 1 до 10% мас./об. загустителя к жидкой композиции, содержащей жидкий носитель и по меньшей мере одну популяцию по меньшей мере одного вида археобактерий, смешивание с использованием любых подходящих устройств (например, мешалки) полученной таким образом жидкой композиции/загустителя с получением загустевшего раствора с или без нагревания жидкой композиции и сушку загустевшего раствора с получением твердой композиции. Указанная твердая композиция может быть в дальнейшем сформирована наиболее удобным способом для получения палочек, блоков, брикетов, гранул, (микро)сфер и т.д.

С целью более подробного пояснения следующих параграфов "пейерова бляшка" представляет собой приблизительно овальный узел лимфатической ткани, который похож на лимфатические узлы по структуре, за исключением того, что он не окружен капсулой из соединительной ткани. Пейеровы бляшки относятся к классу неинкапсулированной лимфатической ткани, известной как лимфатические узлы, которые включают миндалины и лимфатическую ткань аппендикса. Специальные эпителиальные клетки, известные как микроскладчатые клетки (М-клетки), покрывают сторону пейеровой бляшки, обращенную

к просвету кишечника, тогда как внешняя сторона содержит много лимфоцитов и лимфатических сосудов. Функция пейеровых бляшек заключается в анализе и реагировании на патогенные микробы в подвздошной кишке. Антигены от микробов в кишечнике поглощаются посредством эндоцитоза М-клетками, покрывающими поверхность каждой пейеровой бляшки. Указанные антигены переносятся в лимфоидную ткань, где они поглощаются макрофагами и презентуются Т-лимфоцитам и В-лимфоцитам. При презентации опасных патогенных антигенов лимфоциты вызывают иммунный ответ, образуя патоген-специфические антитела, превращаясь в цитотоксические Т-лимфоциты, элиминирующие патогены, и мигрируя через лимфатические сосуды в лимфатические узлы, для того чтобы активировать другие клетки иммунной системы. Затем организм генерирует полноценный иммунный ответ против патогена на уровне целого организма, прежде чем указанный патоген сможет распространиться за пределы кишечника. Пейеровы бляшки, как и другие компоненты лимфатической системы, могут воспаляться или покрываться язвами, когда окружающая их ткань становится воспаленной, что делает их проницаемыми для токсинов и чужеродных бактерий.

Примеры

Пример 1.

Для более подробного описания и иллюстрирования настоящего изобретения подробным образом представлены следующие примеры, которые, однако, не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. В приведенном в настоящей заявке примерном варианте реализации настоящего изобретения сбор и подготовку биологически активных компонентов согласно настоящему изобретению из рубца крупного рогатого скота осуществляли для улучшения кормовых гранул для мышей. Указанный результат был достигнут путем выделения и последующего включения встречающихся в природе архей из бычьего рубца в корм для мышей.

Способы.

Мыши.

Самок C57BL/6 начали исследовать в возрасте 8 недель. Массу тела измеряли периодически, и внимательно следили за состоянием мышей.

Получение биологически активной пищевой добавки.

Штамм *Methanosphaera stadtmanae* DSMZ 3091 и штамм *Methanobrevibacter smithii* DSMZ 861 были приобретены в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ, Брауншвейг, Германия), оба штамма принадлежали к царству: Археи; тип: *Euryarchaeota*; класс: *Methanobacteria*; порядок: *Methanobacteriales*; семейство: *Methanobacteriaceae*. Их культивировали в жидкой среде 322 и 119 (DSMZ, Брауншвейг, Германия) соответственно, следуя специальным инструкциям по культивированию метаногенов и специальным инструкциям по культивированию анаэробов (DSMZ, Брауншвейг, Германия) в анаэробных условиях при 37°C в пробирках Хангейта при атмосфере 2-бар H₂/CO₂ (80-20%) при перемешивании.

Биологически активная пищевая добавка, вводимая в качестве кормовой добавки.

Каждую мышь в клетке кормили *ad libitum* специальными подготовленными кормовыми гранулами. 500 мл от каждой жидкой культуры *Methanosphaera stadtmanae* и *Methanobrevibacter smithii* собирали из культуральных пробирок после 5 дней инкубации и объединяли с 5 г агарозы/желатина, и смешивали для получения твердого продукта. Смесь агароза/желатин-биологически активная пищевая добавка механически измельчали в твердые куски диаметром приблизительно 2-4 мм. 19 кг стандартных кормовых гранул для мышей растворяли в 6 л дистиллированной H₂O, и затем добавляли смесь агароза/желатин-биологически активная пищевая добавка. Полученную смесь перемешивали в течение 5 мин, получая однородную массу. Указанную массу дробили на куски 0,5×1 см, распределяли по алюминиевой фольге и сушили в течение ночи при 21°C.

H. polygyrus модель.

C57BL/6 выращивали и содержали в условиях, свободных от патогенной микрофлоры (СПФ). Всех мышей кормили стандартным рационом для разведения до начала эксперимента. Чтобы стандартизировать кишечные бактерии среди разных групп СПФ-мышей, которых анализировали в течение одного эксперимента, все мыши были совместно размещены в течение 3 недель до паразитного инфицирования. Мышей затем инфицировали перорально с 200 L3 *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (Hpb), и рационы одновременно изменяли либо на стандартный контрольный рацион, либо на экспериментальный рацион, содержащий биологически активную пищевую добавку, как описано выше. После инфицирования Hpb в течение оставшихся экспериментов совместное размещение и применение совместной подстилки было прекращено. Выработку яиц определяли количественно на протяжении всего эксперимента путем сбора влажной фекальной флотации с использованием насыщенного NaCl и подсчитывали визуальным способом с применением камеры для подсчета яиц червей McMaster (Weber Scientific International, Ltd, Гамильтон, Нью-Джерси, США). В конце эксперимента животных умерщвляли, и зрелую массу червей, а также размеры пейеровой бляшки кишечника определяли путем ручного подсчета содержимого тонкого кишечника и наружной поверхности, соответственно, с использованием препаровальной лупы.

Результаты.

Биологически активная пищевая добавка способствует увеличению массы у мышей дикого типа, не

использовавшихся ранее в опытах.

Было проверено влияние биологически активной пищевой добавки на массу тела мыши (фиг. 1). Обычный корм смешивали с 1% носителем на основе агара, содержащим добавку, или только с носителем на основе агара, в качестве контроля. За мышами следили на предмет возможного отвращения к носителю на основе агара и к биологически активной пищевой добавке. Мыши не проявили никакого отвращения к питанию кормом, содержащим носитель на основе агара или добавку. Масса мышей достоверно не различалась в начальной точке, когда была введена биологически активная добавка. Через 4 недели на соответствующих кормах мыши, получавшие добавку, показали статистически достоверное увеличение массы по сравнению с мышами, получавшими контрольный носитель.

Биологически активная пищевая добавка способствует иммунитету слизистых оболочек.

Было проверено влияние биологически активной пищевой добавки на иммунитет слизистой оболочки тонкого кишечника мыши (фиг. 2). Кишечник является общим путем интернализации патогена у позвоночных, поэтому слизистая оболочка образует важный барьер, предотвращающий инвазию патогенов. Пейеровы бляшки - групповые лимфоидные скопления в тонком кишечнике - представляют собой предварительный сайт для создания клеток, секретирующих антитела слизистой в кишечник, необходимые для обеспечения барьерной функции слизистой оболочки, а также для питания эндемичной микробиоты. Так как размер пейеровых бляшек в кишечнике мышей напрямую связан с образованием и качеством антител слизистой оболочки, авторы настоящего изобретения определили размеры пейеровых бляшек у мышей, которые получали либо биоактивную пищевую добавку, либо контрольный носитель в течение 7 недель. Размеры пейеровой бляшки оценивали как или небольшие, или нормальные, или увеличенные, и рассчитывали показатель среднего размера для каждого кишечника. Каждый тонкий кишечник мыши обычно имел 7 пейеровых бляшек, и это количество было неизменным в соответствующих группах. Средний размер пейеровых бляшек был выше у мышей, которые получали биологически активную пищевую добавку, по сравнению с мышами, получавшими контрольный носитель.

Биологически активная пищевая добавка повышает устойчивость к паразитарной инфекции.

Было проверено влияние биологически активной пищевой добавки на устойчивость к природному кишечному паразиту (фиг. 3 и 4). Кишечные паразиты (гельминты) представляют собой частую проблему в сельском хозяйстве; поэтому авторы настоящего изобретения применили прототип инфекции гельминтом, *Hrb*, чтобы определить изменения восприимчивости к инфекции у мышей, которые получали биологически активную пищевую добавку в их рационе. *Hrb* вводили перорально в соответствии со стандартизированной моделью, и определяли приспособленность червя путем проведения подсчета яиц червя в фекалиях в периоде от 2 до 4 недель после инфицирования. У мышей, получавших биологически активную пищевую добавку, было достоверно меньше количество яиц червя по сравнению с мышами, которые получали контрольный носитель, что только указывало на повышенную устойчивость к паразитам у получавших добавку мышей. Через 4 недели после инфицирования мышей умерщвляли и препарировали для определения массы червя в кишечнике, другого ключевого параметра для определения восприимчивости к инфекции у хозяина. Количество червей, обнаруженных у мышей, получавших биологически активную пищевую добавку, было достоверно ниже по сравнению с мышами, которые получали только контрольный носитель, таким образом подкрепляя вывод о том, что биологически активная пищевая добавка повысила устойчивость к инфицированию прототипом кишечного паразита.

В указанном исследовании была проверена возможность применения биологически активной пищевой добавки согласно настоящему изобретению в качестве биологически активного ингредиента, который может способствовать темпу роста и врожденной устойчивости к болезням у сельскохозяйственных животных. Указанные данные явно показывают, что указанная добавка способствует как росту, так и устойчивости к инфекции в общепринятой модели на мышах, таким образом обеспечивая первое ключевое доказательство концепции. Поскольку указанная добавка использует естественные биологические связи в кишечнике животного, она представляет собой физиологически, а также экологически безопасную альтернативу современным подходам к борьбе с заболеваниями на основе лекарственных средств в сельскохозяйственной промышленности.

Повышенное увеличение массы, наблюдаемое у мышей, получавших биологически активную пищевую добавку, согласуется с сообщениями о том, что метаногенные археи вовлечены в биохимический симбиоз с бактериями для усвоения сложных пищевых углеводов, тем самым повышая содержание энергии. Указанные данные также обеспечивают доказательство того, что биологически активная пищевая добавка оказывает благотворное влияние в основном на просвет кишечника и/или слизь в кишечнике. Во-первых, повышенное увеличение массы, скорее всего, связано с повышенным получением энергии из рациона в кишечнике. Во-вторых, повышенное развитие лимфоидных тканей, ассоциированных с кишечником (пейеровы бляшки), обусловлено локальными изменениями в микроокружении кишечника. В-третьих, наблюдали повышенную устойчивость к инфекции, локализованной в кишечнике. Целенаправленно воздействуя на кишечник животного, указанная добавка является ограниченной/локализованной, в отличие от антибиотиков, которые проникают в большинство тканей хозяина. Барьер слизистой оболочки играет важную роль в предотвращении инвазии патогенов, но также играет важную роль в питании эндемичной микробиоты, которая оказывает сильное влияние на иммунную систему хозяина, которая

выходит за пределы кишечника. Поэтому, поддерживая гомеостаз кишечника, можно было бы предположить, что биологически активная пищевая добавка способна улучшить общее функциональное состояние иммунной системы, таким образом повышая иммунную устойчивость в различных тканях (эпителиальные поверхности, системы дыхания, жабры рыб и т.д.).

Пример 2.

Было определено влияние биологически активной добавки согласно настоящему изобретению на рост патогенных вибрионов *in vitro* и на вирулентность указанных патогенных вибрионов *in vivo*. В частности, авторы настоящего изобретения применили способ, зависящий от культуры, для определения антагонистической активности биологической активной добавки против трех выбранных патогенов *in vitro* и стерильную систему солоноводной креветки *Artemia* для определения защитного действия архебактерий против выбранного патогена *V. harveyi* BB120 *in vivo*.

Бактериальные штаммы и приготовление.

В тестах применяли патогенные штаммы *Vibrio campbellii* LMG21363, *V. harveyi* BB120 и *V. parahaemolyticus* PV1. Все штаммы хранили при -80°C в морском бульоне 2216 (Difco Laboratories, Детройт, Мичиган, США) с 20% стерильным глицерином. Первоначально патогенные вибрионы выращивали при 28°C в течение 24 ч на морском агаре (Difco Laboratories, Детройт, Мичиган, США), и затем следовала лаг-фаза роста на морском бульоне при инкубации при 28°C с непрерывным встряхиванием. Лиофилизированную композицию согласно настоящему изобретению получали с концентрацией архебактерий 10^{11} КОЕ г^{-1} .

Аксеническое вылупление личинок солоноводных креветок.

Аксенические личинки были получены после декапсуляции и вылупления. Кратко, 2,5 г цист *Artemia franciscana*, происходящих из Большого Солёного озера, Юта, США (тип EG, партия 21452, INVE Aquaculture, Дендермонде, Бельгия) выдерживали в 89 мл дистиллированной воды в течение 1 ч. Стерильные цисты и личинки получали путем декапсулирования с использованием 3,3 мл NaOH (32%) и 50 мл NaOCl (50%). Во время реакции обеспечивали аэрацию через 0,22-мкм фильтр. Все манипуляции проводили в вытяжном шкафу с ламинарным потоком, и все инструменты стерилизовали в автоклаве при 121°C в течение 20 мин. Декапсуляцию прекращали приблизительно через 2 мин, добавляя 50 мл $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ при 10 г/л. Затем прекращали аэрацию и декапсулированные цисты промывали фильтрованной (0,2 мкм) и искусственной морской водой, стерилизованной в автоклаве (FAASW), содержащей 35 г/л растворимой океанической синтетической морской соли (Aquarium Systems, Карребург, Франция). Затем цисты суспендировали в 1 л FAASW, содержащейся стеклянной колбе объемом 1 л, и обеспечивали 0,22-мкм фильтрацию воздуха на входе и выходе для аэрации. Колбу помещали при 28°C при постоянном освещении приблизительно 2000 лк. Собирали появляющиеся личинки, достигающие стадии II (на которой они начали потреблять бактерии).

Анализ образцов на чашках Петри *in vitro*.

Аликвоту (50 мкл) каждого из патогенных вибрионов высевали на основной агар для культивирования (Морской агар, МА) и на минимальный агар с добавленным кормом для креветок. Последний агар состоял из агара с девятью солями (NSA), с добавленным до стерилизации кормом для креветок (Crevetec PL500, Crevetec, Бельгия) 500 мг/л. После заливки среды чашки Петри оставляли открытым в стерильных условиях до высыхания. Затем композицию согласно настоящему изобретению суспендировали в соответствующей питательной среде (например, морской бульон или раствор с девятью солями) при 100 мг/л (= 107 КОЕ/мл), и 50 мкл аликвоты переносили на стерильный диск для посева, который был помещен в центре чашки Петри с агаром. Каждая чашка Петри была герметически заклеена парафильмом и помещена в инкубатор при 28°C . Рост патогенных вибрионов наблюдали в течение 48 ч и определяли появление чистых зон вокруг диска с нанесенной композицией согласно настоящему изобретению. На каждой из засеянных чашек Петри с агаром можно было явно наблюдать рост патогена. Однако ни в одной из чашек не была представлена чистая зона, указывающая на ингибирование роста вокруг диска с нанесенными археями, как это видно на фиг. 5.

In vivo анализ заражения.

В этом эксперименте определяли защиту *Artemia nauplii* от заражения выбранным патогеном *Vibrio harveyi* BB120 посредством применения композиции согласно настоящему изобретению. Аксенически вылупленные креветки *Artemia* собирали из колбы для вылупления на стерильном сите 100 мкм и промывали с использованием FAASW. *Artemia* переносили в стерильные 50-мл пробирки, содержащие 10 мл FAASW с плотностью 2 артемии/мл (= 20 *Artemia nauplii* на пробирку). Стерилизованные в автоклаве *Aeromonas hydrophila* LVS3 добавляли при 107 КОЕ/мл в каждую пробирку в качестве корма для *Artemia nauplii*. Анализ состоял из следующих обработок (n = 5 на обработку):

- нейтральный контроль (без добавления архей и *Vibrio harveyi* BB120),
- положительный контроль (только добавление архей),
- отрицательный контроль (только добавление *Vibrio harveyi* BB120),
- тест (добавление архей + добавления *Vibrio harveyi* BB120).

Архей и патогенные *Vibrio harveyi* BB120 добавляли при плотности 107 клеток/мл (плотность равна 100 мг/л в случае пробиотика). Выживание *Artemia* определяли через 48 ч. Через 48 ч определяли коли-

чество патогенных вибрионов в тестовой обработке (= добавление архей + добавление *Vibrio harveyi* BB120) путем посева методом разбавления на среде TCBS и инкубации чашек Петри при 28°C в течение 48 ч.

Влияние археобактерий на выживаемость по-разному обработанных *Artemia nauplii* приведено на фиг. 6. Не подвергнутые обработке *Artemia nauplii* показали среднюю выживаемость почти 90%, и *Artemia nauplii*, зараженные *V. harveyi* BB120, показали достоверно более низкую выживаемость: в среднем 35%. Такие результаты являются нормальными для системы заражения стерильных *Artemia* с заражением *V. harveyi* в течение 48 ч. Применение одних только археобактерий привело к выживанию в среднем 64%, что было достоверно ниже, чем у не подвергнутого обработке контроля. Когда археобактерии применили к *Artemia nauplii*, которые были заражены патогенным *V. harveyi* BB120, выживаемость была достоверно выше по сравнению с *nauplii*, которые были заражены патогеном, но которых не обрабатывали продуктом.

Дополнительно наблюдали, что *Artemia nauplii* при обработке археобактериями казались более активными и более крупными, чем *Artemia nauplii*, в не подвергнутом обработке контроле.

В начале исследования плотность патогенов, добавленных для стимуляции патогеном, составляла в среднем $7,0 \times 10^6$ КОЕ мл⁻¹ (см. табл. 1). При обработке только археобактериями наличие вибрионов не было обнаружено ни в начале, ни в конце исследования. В конце исследования плотность патогенов при добавлении археобактерий в сочетании с патогеном составляла в среднем $7,5 \times 10^6$ КОЕ мл⁻¹.

Таблица 1

Концентрация *V. harveyi* BB120 (посчитано на агаре TCBS) в воде в начале и в конце исследования *in vivo* с *Artemia nauplii* для определения влияния археобактерий на выживаемость *Artemia nauplii*, подверженных воздействию патогенных *Vibrio harveyi* BB120

Обработка	Начальная концентрация <i>V. harveyi</i> BB120 (КОЕ мл ⁻¹)	Конечная концентрация <i>V. harveyi</i> BB120 (КОЕ мл ⁻¹)
Не подвергнутый обработке контроль	не обнаружен	не обнаружен
<i>V. harveyi</i> BB120	$7,0 \times 10^6 \pm 2,4 \times 10^5$	/
Археобактерии	не обнаружен	не обнаружен
<i>V. harveyi</i> BB120 + Археобактерии	$7,0 \times 10^6 \pm 2,4 \times 10^5$	$7,5 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$

Из полученных результатов можно сделать вывод о том, что археобактерии обеспечивают значительную защиту для *Artemia nauplii*, зараженных известным патогеном аквакультуры *V. harveyi* BB120. Из-за отсутствия чистых зон в исследовании на чашках Петри в условиях *in vitro* и того факта, что количество *V. harveyi* BB120 не уменьшилось во время исследования заражения *in vivo*, нельзя сделать вывод, что эта защита была вызвана прямым противомикробным действием пробиотика на патогены. Однако было (качественно) отмечено, что *Artemia* из исследования *in vivo*, подвергшиеся воздействию только археобактерий, казались более крупными и более активными, чем *Artemia nauplii* из контрольной обработки (то есть питавшиеся только LVS3). Это указывает на то, что археобактерии поддерживали развитие и рост и, как следствие, потенциально поддерживали также устойчивость к заболеваниям *Artemia nauplii* во время исследования.

Пример 3.

Чтобы продемонстрировать влияние биологически активной добавки согласно настоящему изобретению на питание, рост, фекальные загрязнители и изменения микробиома кишечника у рыб, было проведено несколько экспериментов на растительноядных сомах *Ancistrus dolichopterus*.

Способы.

Рыба.

Использовали потомство одних и тех же родителей сома *Ancistrus dolichopterus* (в возрасте 1 месяца в начале эксперимента). В кишечник мальков первоначально внесли фекалии, исходящие от их отца, чтобы способствовать микробной колонизации кишечника рыб однородным образом. Рыб содержали в аквариумах объемом 50 л с автономной системой фильтрации воды. Одну четверть воды заменяли каждую неделю. Периодически проверяли состояние рыб и их нормальное поведение.

Получение стандартного и биологически активного корма.

Рыб кормили кормом домашнего приготовления, состоящим из овощей (листья шпината, огурца, цуккини, зеленого горошка и картофеля, что составляет 75% от общей влажной массы), белой соевой пастой (15% от влажной массы) и мясом рыбы (10% от влажной массы). Указанные ингредиенты были измельчены и смешаны с образованием пасты, и был добавлен предварительно нагретый агар-агар, и пасту тщательно перемешали. Конечную пасту выливали в полиэтиленовые пакеты, выравнивали и замораживали при -20°C . Мелкие куски разрезали, размораживали и взвешивали для кормления рыб.

Для проверки влияния биологически активной кормовой добавки была приготовлена партия корма домашнего приготовления, содержащая низкую дозу биологически активной кормовой добавки с конечной концентрацией 10^6 клеток археобактерий на 1 г корма (называемой кормом с низкой дозой добавки). Также была приготовлена партия корма домашнего приготовления, содержащая высокую дозу биологически активной кормовой добавки с конечной концентрацией 10^8 клеток археобактерий на 1 г корма (называемой кормом с высокой дозой добавки).

Мальки сома *Ancistrus* были разделены на три экспериментальные группы с 20 особями на группу, и их кормили *ad libitum* 6 дней в неделю следующим образом.

1. Контроль: стандартный корм домашнего приготовления без добавления биологически активной кормовой добавки.

2. Низкая доза добавки: корм домашнего приготовления с низкой дозой добавки.

3. Высокая доза добавки: корм домашнего приготовления с высокой дозой добавки.

Рыб содержали при этих условиях кормления в течение 4 месяцев и трех недель.

Увеличение массы рыбы.

В 1 день эксперимента по кормлению 20 рыб в группе взвешивали с точностью до 5 мг. Затем рыб взвешивали в шести временных точках в течение четырех месяцев и двух недель.

Коэффициент конверсии корма (FCR).

Через четыре месяца после начала эксперимента по кормлению 8 особей из каждой из 3 экспериментальных групп индивидуально взвешивали и помещали в отдельные 3-литровые емкости с уменьшенной циркуляцией фильтрованной воды (0,5 л/ч). В течение четырех дней каждая рыба получала точно взвешенное количество соответствующего корма утром. Суточная масса корма составляла приблизительно 100 мг. На пятый день утром каждую рыбу взвешивали, взвешивали остаточный корм на дне емкостей, и собирали и взвешивали фекалии. Общий потреблённый корм в течение 4-дневного периода был рассчитан путем суммирования суточной массы корма и затем вычитания массы остаточного корма. Увеличение массы рыб в течение 4-дневного периода рассчитывали путем вычитания начальной массы рыбы из массы рыбы на утро 5 дня. FCR получали делением массы потребленного корма в течение 4-дневного периода на увеличение массы рыбы за тот же период. FCR рассчитывали в соответствии с правилами, представленными в Техническом бюллетене USAID № 07.

Измерения качества воды в ёмкости.

Через три месяца и три недели после начала эксперимента по кормлению и через 6 ч после сеанса кормления в течение дня 8 особей из каждой из 3 экспериментальных групп были взяты из их аквариума и помещены в три небольшие 3-литровые емкости, одна емкость на группу. Указанные 3 емкости были предварительно заполнены чистой водой, поступающей из одного и того же резервуара воды, чтобы обеспечить однородное исходное качество воды в трех группах. Образец исходной воды хранили для последующего анализа качества воды. Рыбы не получали корм в течение 30 ч. Через 30 ч собирали 500 мл воды из емкости каждой экспериментальной группы для измерения параметров качества воды, а рыб возвращали в их первоначальные соответствующие аквариумы. Используя фотометр AL450 (Aqualytic) и соответствующие наборы, были измерены следующие параметры воды: фосфаты, нитриты, pH, проводимость. Конечные значения фосфатов и нитритов были получены после вычитания значений, измеренных для исходной воды. 8 рыб на одну экспериментальную группу взвешивали, и конечные значения фосфатов и нитритов приводили на 1 г рыбы в емкости. Процедуру в полном объеме повторяли 3 раза в общей сложности с одним и тем же набором рыб и с интервалом в 7 дней.

Метабаркодирование микробиома.

Через три месяца после начала эксперимента по кормлению пять особей контрольной группы и пять особей группы с высокой дозой добавки были помещены в отдельные 3-литровые емкости, заполненные чистой водой, без циркуляции воды. Через 2 ч были собраны фекалии каждой особи индивидуально и помещены непосредственно в пробирки для экстракции ДНК набора PowerSoil DNA isolation (MoBio). После экстракции ДНК проводили амплификацию с помощью ПЦР с использованием праймеров Pro341

F/Pro805R (исключая последовательности адаптеров illumina) 16S сверхизменчивых участков V3-V4 прокариотов (бактерии и археи), опубликовано Takahashi et al. (PLoS One, DOI: 10.1371/journal.pone.0105592, 2014). 10 продуктов ПЦР очищали с применением набора High Pure PCR Product Purification (Roche). Была получена библиотека для каждого из 10 образцов с использованием набора TruSeq Nano DNA Library Preparation (illumina). Библиотеки были количественно определены посредством количественной ПЦР в режиме реального времени и объединены в эквимоллярные количества. Пул библиотек был секвенирован методом парных прочтений с использованием набора MiSeq Reagent Nano Kit V2 (500 Cycle), 2×250-bp цикл проводили на приборе MiSeq. Парные прочтения контролировали по качеству с использованием illumina Real-Time Analysis software (v 1.17.28). Собранные прочтения анализировали с использованием ресурсов illumina 16S метагеномного анализа, как осуществлено на платформе BaseSpace illumina (версия 1.0.1.0, 2016).

Результаты.

Биологически активная добавка повышает темпы роста сома *Ancistrus*.

Микробиом кишечника играет главную роль в переваривании корма и усвоении питательных веществ, и высоко специализированное микробное сообщество развилось у растительноядных животных для извлечения питательных веществ из их энергетически бедного растительного рациона. Добавление в корм полезных микроорганизмов может улучшить усвоение питательных веществ и повысить темпы роста.

Сомы *Ancistrus*, которых кормили биологически активной добавкой, показали более высокие темпы роста, выраженные как увеличение массы, по сравнению с контрольной группой (фиг. 7). Однако разница в темпах роста достоверна только между контрольной группой и группой, получавшей корм с высокой дозой добавки. Таким образом, ответ на питание и реакция роста зависят от дозы добавки в корме.

Биологически активная добавка улучшает коэффициент конверсии корма у сома *Ancistrus*.

Улучшение функции микробиома кишечника путем добавления полезных микроорганизмов может привести к ускоренному росту и увеличению массы в период роста. Коэффициент конверсии корма (FCR), который измеряет эффективность преобразования массы корма в увеличение массы животного, был рассчитан для 8 особей на экспериментальную группу в течение 4 дней кормления (табл. 2). Значения FCR составляли от 24 до 207 для контрольной группы, от 19,9 до 196,7 для группы, получавшей корм с низкой дозой добавки, и от 6,5 до 139 для группы, получавшей корм с высокой дозой добавки. Указанные значения относительно высоки по сравнению с высокопродуктивными искусственно выращенными рыбами, потому что у сомов *Ancistrus* наблюдается медленный рост, в частности, вследствие высоко развитого и сильного скелета и их растительноядного рациона. Результаты FCR свидетельствуют о достоверном увеличении для рыб, получавших корм с высокой дозой добавки, по сравнению с контролем (t-тест, двухстороннее: t-статистика = 2,4178, df = 9,69, P = 0,0369). Небольшое увеличение FCR наблюдалось также для рыб, получавших корм с низкой дозой добавки по сравнению с контролем (t-тест, двухстороннее: t-статистика = 1,575, df = 12, P = 0,141). Таким образом, улучшение FCR для сомов *Ancistrus* зависит от дозы биологически активной добавки, содержащей археобактерии, и только корм с высокой дозой добавки показал достоверное улучшение по сравнению с контролем.

Таблица 2

Данные и результаты Коэффициента конверсии корма (FCR) для трех экспериментальных групп: контрольной, группы, получавшей корм с низкой дозой добавки, и группы, получавшей корм с высокой дозой добавки

Контроль: без биологически активной добавки х										
Особь Номер	Начальная масса рыбы (мг)	Масса корма (мг)				Остаточный корм (мг)	Общий потребленный корм = (день кормления 1+2+3+4) + Остаточный корм	Конечная масса рыбы	Увеличение массы рыбы (мг)	FCR Общий потребленный корм/ увеличение массы
		день 1	день 2	день 3	день 4					
A1	831	100	103	118	123	56.1	387.9	833	2	193.95
A2	943	104	106.6	105	115	71.2	358.9	945	2	179.45
A3	1213	102	108.8	111	111	60.8	372.1	1216	3	124.0333333
A4	633	110	104	102.5	128	39.1	405.6	647	14	28.97142857
A5	605	109	100.5	109	115	32.5	401	608	3	133.6666667
A6	497	101	100.4	132.5	84.7	9.9	408.7	514	17	24.04117647
A7	527	103	104	125	94	11.1	414.9	529	2	207.45
A8	532	104	103	126	93.5	11.3	415.2	535	3	138.4
Низкая доза биологически активной добавки х										
Особь Номер	Начальная масса рыбы (мг)	Масса корма (мг)				Остаточный корм (мг)	Общий потребленный корм = (день кормления 1+2+3+4) + Остаточный корм	Конечная масса рыбы	Увеличение массы рыбы (мг)	FCR Общий потребленный корм/ увеличение массы
		день 1	день 2	день 3	день 4					
B1	1335	103.3	104.7	128	108	12.4	431.7	1339	4	107.925
B2	748	105.3	108.5	122.3	125	10.1	450.8	785	37	12.183783378
B3	996	102	103.3	124.1	117	16.1	430.3	1000	4	107.575
B4	678	107	102	133	103	8.7	436.3	698	20	21.815
B5	477	103.2	92.3	128	113	42.8	393.4	479	2	196.7
B6	368	107.1	123.4	114	111	16.1	439.4	380	12	36.61666667
B7	270	104.9	94.1	107.2	88.1	15.8	378.5	289	19	19.92105263
B8	682	108	101	132	104	7.2	437.8	694	12	36.48333333
Высокая доза биологически активной добавки х										
Особь Номер	Начальная масса рыбы (мг)	Масса корма (мг)				Остаточный корм (мг)	Общий потребленный корм = (день кормления 1+2+3+4) + Остаточный корм	Конечная масса рыбы	Увеличение массы рыбы (мг)	FCR Общий потребленный корм/ увеличение массы
		день 1	день 2	день 3	день 4					
C1	638	108.6	109.6	100.5	127	28.2	417.5	641	3	139.1666667
C2	926	100.5	101.4	103	112	6.3	411	978	52	7.903846154
C3	847	104	102.6	103.1	112	18.1	403.2	852	5	80.64
C4	1147	107.6	97	105.3	112	19.1	402.9	1151	4	100.725
C5	988	101.7	100.4	103.2	115	14.2	406.3	993	5	81.26
C6	728	109.4	100.4	121	109	14.1	425.6	782	54	7.881481481
C7	570	108.1	101.3	119.8	97	12	414.2	634	64	6.471875
C8	690	103.2	100.1	121	96.3	17.5	403.1	702	12	33.59166667

Биологически активная добавка уменьшает количество фекалий у сома *Ancistrus*.

Ожидали, что улучшенное пищеварение и усвоение питательных веществ, вызванные кормовой биологически активной добавкой, уменьшит массу фекалий, вырабатываемую на массу потребленного корма. Используя те же данные, что и для расчета FCR, и путем взвешивания фекалий, полученных на пятый день эксперимента, было рассчитано соотношение массы фекалий на массу потребленного корма (табл. 3). Результаты показывают, что рыбы, получавшие корм с биологически активной добавкой, вырабатывают меньшее количество фекалий, чем контрольная группа. Т-тесты независимых образцов показывают, что корм как и с низкой дозой добавки, так и корм с высокой дозой добавки привел к достоверному уменьшению массы фекалий на массу потребленного корма (низкая доза: t-стат = 2,277, df = 12, P = 0,023; высокая доза: t-стат = 3,761, df = 12, P = 0,0014). Указанный результат свидетельствует о том, что биологически активная добавка, вероятно, уменьшит количество фекальных загрязнителей просто из-за сокращения количества фекалий.

Таблица 3

Масса фекалий, выработанных в течение 4 дней кормления эксперимента FCR, выраженная как масса фекалий, деленная на потребленную массу корма × 100.

Особь рыбы и общая масса потребленного корма те же, что и в табл. 1

Контроль: без биологически активной добавки х			Низкая доза биологически активной добавки х			Высокая доза биологически активной добавки х		
Особь Номер	Общий масса фекалий (мг)	Масса фекалий / масса потребленного корма *100	Особь Номер	Общий масса фекалий (мг)	Масса фекалий / масса потребленного корма *100	Особь Номер	Общий масса фекалий (мг)	Масса фекалий / масса потребленного корма *100
A1	22.4	5.774684197	B1	29.9	6.926106092	C1	8.9	2.131736527
A2	25.9	7.216494845	B2	28.6	6.344276841	C2	16.7	4.063260341
A3	34.8	9.352324644	B3	27.9	6.483848478	C3	16.2	4.017857143
A4	26.4	6.50887574	B4	15.2	3.483841394	C4	18.9	4.69099032
A5	25.4	6.334164589	B5	19.8	5.033045247	C5	17.1	4.208712774
A6	21.2	5.18717886	B6	15.1	3.436504324	C6	9	2.114661654
A7	20.8	5.013256206	B7	11.1	2.932628798	C7	11	2.655721873
A8	19.2	4.624277457	B8	15.6	3.5632709	C8	15.6	3.870007442

Биологически активная добавка уменьшает загрязняющие вещества рыбных отходов сома *Ancistrus*.

Фекалии животных являются источником загрязняющих веществ: нитритов и фосфатов. Наличие больших количеств нитритов и фосфатов свидетельствует о загрязнении сточной воды, что оказывает вредное влияние на окружающую среду. Влияние биологически активной добавки на снижение загрязняющих веществ в фекалиях было проверено на растительных сомах *Ancistrus dolichopterus*. Результаты измерений параметров качества воды (фиг. 8) показывают, что концентрация фосфатов и нитритов была достоверно ниже в воде ёмкостей, где содержали рыб, получавших корм с биологически активной добавкой (либо корм с высокой дозой добавки, либо корм с низкой дозой добавки) по сравнению с водой ёмкости, где содержали контрольную группу рыб (t-тесты двух независимых образцов: фосфаты в контроле по сравнению с кормом с низкой дозой добавки, t-стат = 6,478, df = 2, P = 0,0115, фосфаты в контроле по сравнению с кормом с высокой дозой добавки, t-стат = 6,298, df = 2, P = 0,012, нитриты в контроле по сравнению с кормом с низкой дозой добавки, t-стат = 24,779, df = 2, P = 0,0008, нитриты в контроле по сравнению с кормом с высокой дозой добавки, t-стат = 29,86, df = 2, P = 0,0006). Не наблюда-

лось существенной разницы между двумя экспериментальными дозами биологически активной кормовой добавки (экспериментальный корм с высокой дозой или с низкой дозой).

Начальный pH воды составлял от 7,76 до 7,91. В конце эксперимента pH воды в контрольной группе составлял от 7,57 до 7,67, в то время как pH воды в группах, получавших корм с высокой и низкой дозой добавки, составлял от 7,59 до 7,85. В конце эксперимента проводимость воды (в мкСм/см) была выше в контрольной группе (280-283 мкСм/см) по сравнению с группой, получавшей корм с низкой дозой добавки (275-277 мкСм/см), или с группой, получавшей корм с высокой дозой добавки (270-274 мкСм/см). Указанные результаты показывают на недостоверное повышение кислотности воды и повышенную проводимость воды у контрольной группы по сравнению с водой у рыб, получавших корм с биологически активной добавкой.

Биологически активная добавка изменяет микробиом сома *Ancistrus*.

Этот эксперимент предназначен для характеристики изменения микробиоты, вызванного биологически активным пробиотиком *x* у сома *Ancistrus dolichopterus*, при измерении в свежих фекалиях. Были собраны свежие фекалии от 5 особей контрольной группы, и были собраны пять особей, получавших корм с высокой дозой добавки, и был проведено метабаркодирование их микробиомов. Количество высококачественных парных прочтений составляло от 48500 до 57200 на особь. Результаты анализа метабаркодирования показывают, что микробиом заметно изменен у рыб, получавших корм с биологически активной добавкой, по сравнению с контрольной группой. Это можно наблюдать при достоверном изменении частоты встречаемости шести более распространенных классов бактерий в контрольной группе по сравнению с группой, получавшей корм с высокой дозой добавки, представленной в табл. 4 (многофакторный дисперсионный анализ (MANOVA) тест между контрольной группой и группой с высокой дозой: След Пилля t -стат = 0,984, $F = 29,98$, $df_1 = 6$, $df_2 = 3$, $P = 0,009$). Изменение микробиома также может быть оценено разнообразием родов бактерий и архей, обнаруженных в образцах, которое выше для контрольной группы (диапазон: от 246 до 313 родов на образец), чем для группы, получавшей корм с высокой дозой добавки (диапазон: от 179 до 267 родов на образец). Одномерный (однофакторный) ANOVA анализ показывает, что указанная разница достоверна (внутри групп: $SS = 7272$, $df = 8$, $MS = 909$, между группами $SS = 10112,4$, $df = 1$, $MS = 10112,4$, $F = 11,125$, $P = 0,0103$). Другое важное различие заключается в том, что виды архей, составляющие биологическую активную добавку, систематически присутствуют и в более высоком изобилии (составляют от 0,005 до 0,225% всех соотнесённых прочтений) в микробиоме рыб группы, получавших корм с высокой дозой добавки, по сравнению с микробиомом рыб контрольной группы (составляют от 0 до 0,004% от всех соотнесённых прочтений). Согласно t -тесту, такая разница достоверна (t -стат = 2,532, $df = 7$, $P = 0,019$). С учетом благоприятных свойств добавки, показанных в примерах, можно утверждать, что использование биологически активной пищевой добавки может оказывать влияние на сельскохозяйственных животных, особенно с точки зрения преимуществ для иммунной системы, а также для пищеварительной деятельности, но также и на улучшение качества фекальных отходов, особенно в отношении содержания нитритов, важного загрязнителя, который возникает в результате животноводства.

Таблица 4

Изменение частоты встречаемости шести наиболее распространенных классов бактерий, обнаруженных в контрольной группе, для пяти рыб контрольной группы и для пяти рыб группы, получавшей корм с высокой дозой добавки. Цифры представляют процент прочтений, приписываемых данному классу бактерий, по сравнению с общим количеством прочтений

	Шесть наиболее распространенных классов в контрольной группе (суммарная численность >93%)						Суммарная численность
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Actinobacteria</i>	
контроль 1	46.18	16.57	13.85	8.97	6.57	1.04	93.19
контроль 2	46.99	34.98	2.45	9.46	1.29	0.64	95.81
контроль 3	38.87	28.71	9.53	10.42	5.53	0.878	93.938
контроль 4	45.98	27.99	6.59	9.71	3.78	0.82	94.87
контроль 5	47.35	28.78	5.75	9.34	2.84	0.387	94.447
Высок. доза 1	78.23	5.38	1.14	8.24	0.552	0.62	94.162
Высок. доза 2	80.51	6.18	0.76	5.26	0.239	0.94	93.889
Высок. доза 3	79.79	6.78	0.64	7.19	0.107	0.55	95.057
Высок. доза 4	78.58	8.55	0.82	6.49	0.29	0.86	95.59
Высок. доза 5	69.01	17.45	0.66	6.97	0.377	0.261	94.728

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение обогащенной кормовой композиции для животных, содержащей по меньшей мере один вид метаногенных археобактерий, при этом указанная композиция содержит от 10^5 до 10^8 живых клеток археобактерий на 1 г для увеличения темпа роста животных и улучшения влияния фекальных отходов животных на окружающую среду по сравнению со стандартными небогащенными кормами для животных, при этом указанные животные представляют собой птиц, млекопитающих или водных животных.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что указанный по меньшей мере один вид археобактерий выбран из *Methanospaera stadmanae* и *Methanobrevibacter smithii*.

3. Применение по любому из пп.1 и 2, отличающееся тем, что указанная композиция находится в твердой форме.

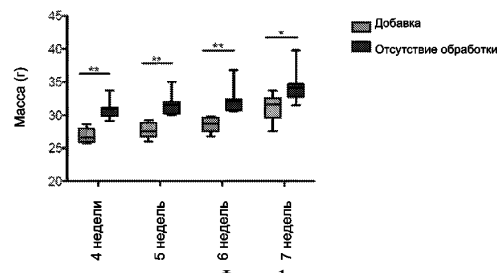
4. Применение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что указанные археобактерии выделяют из экстракта рубца.

5. Способ уменьшения восприимчивости животных к паразитарным инфекциям, включающий обеспечение указанных животных обогащенной кормовой композицией, содержащей по меньшей мере один вид метаногенных археобактерий в количестве от 10^5 до 10^8 живых клеток археобактерий на 1 г указанной композиции, при этом указанные животные представляют собой птиц, млекопитающих или водных животных.

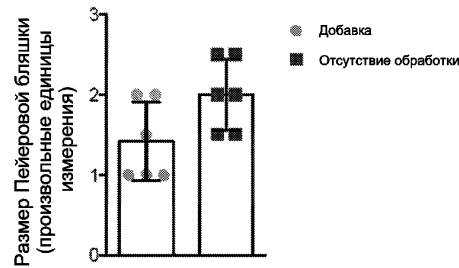
6. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один вид археобактерий выбран из *Methanosphaera stadtmanae* и *Methanobrevibacter smithii*.

7. Способ по любому из пп.5 и 6, отличающийся тем, что указанная композиция находится в твердой форме.

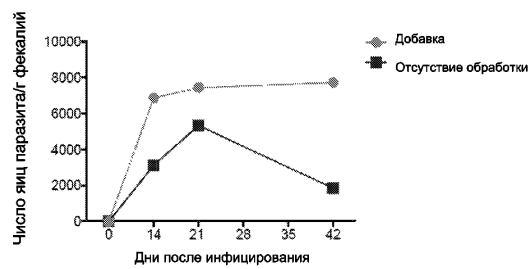
8. Способ по любому из пп.5-7, отличающийся тем, что указанные археобактерии выделяют из экстракта рубца.



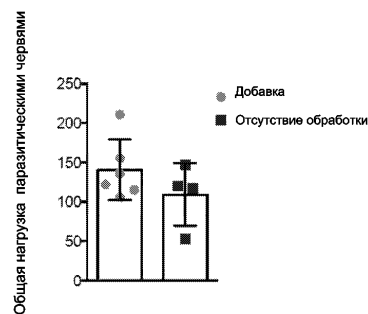
Фиг. 1



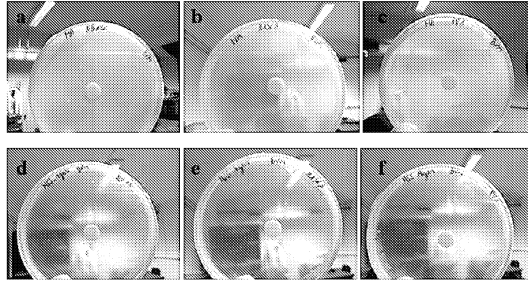
Фиг. 2



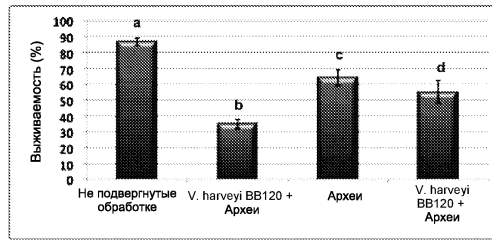
Фиг. 3



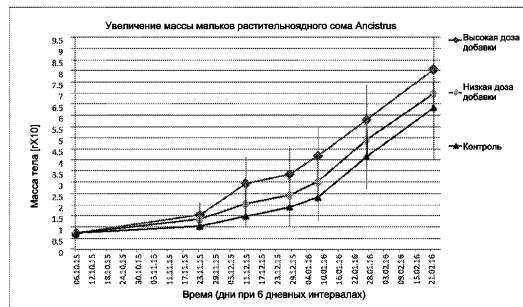
Фиг. 4



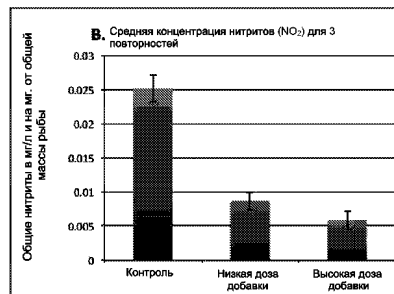
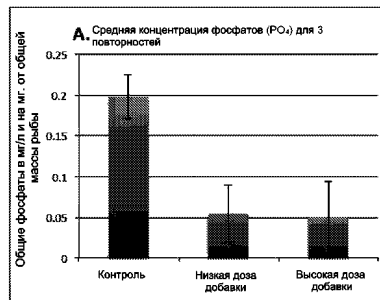
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

