

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041313**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.07

(21) Номер заявки
202091081

(22) Дата подачи заявки
2020.04.15

(51) Int. Cl. **A61K 35/744** (2015.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(54) **ПРОБИОТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
ДИСБАКТЕРИОЗОВ У РЫБ**

(43) **2021.10.29**

(96) **KZ2020/021 (KZ) 2020.04.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БИСЕНОВА ГУЛЬМИРА
НУРГАЛИЕВНА (KZ)**

(72) Изобретатель:
**Бисенова Гульмира Нургалиевна,
Текебаева Жанар Борамбаевна,
Уразова Майра Салаватовна,
Сармурзина Зинигуль Сериковна,
Абжалелов Ахан Бегманович, Закарья
Кунсулу (KZ)**

(56) **БИСЕНОВА Г.Н.** и др.
Изучение эффективности пробиотика на модели
бактериальной болезни мальков в лабораторных
условиях. Вестник АГТУ. Сер: Рыбное
хозяйство, 2019, № 2, стр. 14-21 <doi:
10.24143/2073-5529-2019-2-14-21> (стр.14, 15, 18)
КОШАК Ж.В. Бактерийные и
биопрепараты в профилактике заболеваний
рыб. Белорусское сельское хозяйство, 2016,
№ 12. Найдено 08.10.2020. в <[http://
www.belniirh.by/attachments/biopreparaty.pdf](http://www.belniirh.by/attachments/biopreparaty.pdf)> весь
документ

GONG L. et al. A New Isolate of *Pediococcus*
pentosaceus (SL001) With Antibacterial Activity
Against Fish Pathogens and Potency in Facilitating the
Immunity and Growth Performance of Grass Carps.
Front. Microbiol., 2019, v.10, Article 1384, стр.1, 2
<doi:10.3389/fmicb.2019.01384>

KZ-B-33967

RU-C1-2184774

JP-A-H06181656

ЖАНДАЛГАРОВА А.Д. Использование
бактерийных препаратов "Ферм-КМ" и "ПроСтор"
в кормлении осетровых рыб. Диссертация.
Астрахань, 2017, стр. 35

(57) Изобретение относится к микробиологии, биотехнологии и может быть использовано в рыбном хозяйстве для борьбы с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами рода *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*. Предлагаемое изобретение позволяет подавить рост таких возбудителей инфекционных заболеваний рыб, как *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Staphylococcus* и *Escherichia*, а также улучшить микрофлору кишечника полезными лактобактериями. Это достигается благодаря пробиотическому препарату для профилактики и лечения дисбактериозов у рыб, который включает консорциум штаммов молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum* 24С, *Pediococcus pentosaceus* 10/9К, *Lactobacillus paracasei* 9С, взятых в соотношении 1:1:1 по объему. Предлагаемый пробиотический препарат является экологичным и безопасным для рыбных хозяйств, не содержит ГМО, не токсичен, не патогенен, безвреден для людей, животных и растений, служит альтернативным замещением химическим препаратам - антибиотикам.

B1**041313****041313****B1**

Сущность изобретения заключается в получении нового пробиотического препарата из штаммов молочнокислых бактерий, обладающих высокой антимикробной активностью к широкому спектру возбудителей инфекционных заболеваний рыб - *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*.

Пробиотический препарат состоит из консорциума штаммов молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum* 24С, *Pediococcus pentosaceus* 10/9К, *Lactobacillus paracasei* 9С, рекомендуется для коррекции микрофлоры, заселения полезными микроорганизмами и подавления условно-патогенной и патогенной микрофлоры кишечника рыб.

При разработке биопрепарата в первую очередь проверяют на биосовместимость штаммов. Метод совместного культивирования трех штаммов показал, что культуры *Lactobacillus fermentum* 24С, *Pediococcus pentosaceus* 10/9К и *Lactobacillus paracasei* 9С биосовместимы между собой и в результате роста не подавляют друг друга.

При подборе оптимальной среды для наработки биомассы биопрепарата руководствовались составом среды. Состав среды может влиять на антагонистическую активность, так как при обильном росте и активности бактерии лучше будет проявляться антагонистическая активность в отношении патогенных бактерий.

Оптимальной средой для наработки биомассы пробиотического препарата была выбрана молочная сыворотка с лактозой. От нее была получена большая биомасса по сравнению с другими рассматриваемыми средами (МРС-7, молочная сыворотка с лактозой, молочная сыворотка с глюкозой, молочная сыворотка с лактозой и глюкозой), за исключением коммерческой среды MRS-1 (Hi-Media). Установлено, что коммерческая среда MRS-1 (Hi-Media) требует большего времени культивирования по сравнению со средой - молочной сывороткой с лактозой. Выбор варианта среды - молочная сыворотка с лактозой связан еще и с тем, что себестоимость компонентов среды значительно ниже, чем контрольная готовая коммерческая среда MRS-1 (Hi-Media).

Способ получения пробиотического препарата заключается в совместном культивировании молочнокислых штаммов *Lactobacillus fermentum* 24С, *Pediococcus pentosaceus* 10/9К и *Lactobacillus paracasei* 9С на усовершенствованной среде - молочной сыворотке с лактозой (г/л): лактоза - 15, L-цистеин - 0,03. Компоненты перемешивают в 200 мл дистиллированной воды, автоклавируют при 0,5 атм в течение 30 мин, затем добавляют 800 мл молочной сыворотки, рН 6,8. Инкубация при 37°C - 11 ч.

Молочнокислые штаммы, входящие в состав пробиотического препарата, в питательной среде в качестве источника аминокислот используют молочную сыворотку, в качестве источника углерода и дыхания клетки (образование АТФ) используют лактозу, в качестве редуцирующего вещества используют L-цистеин, который имеет функцию обеспечения азота для питания микроорганизмов, а также действует как восстановитель, способствующий росту бактерий.

Для наработки и получения пробиотика в ферментер с подготовленной средой на молочной сыворотке с лактозой вносят 5% маточной культуры биопрепарата от объема среды, состоящего из *Lactobacillus fermentum* 24С, *Pediococcus pentosaceus* 10/9К, *Lactobacillus paracasei* 9С в соотношении 1:1:1. Нарастивают биомассу в течение 10-11 ч при скорости перемешивания 100 об/мин, потоке кислорода 5%, аэрации 20%, при рН 6,8 и температуре 37°C. Затем бактериальную массу отделяют от культуральной жидкости путем центрифугирования при 4°C и скорости 8000 rpm. Полученную микробную биомассу клеток смешивают с защитной средой в соотношении 1:1, разливают во флаконы по 5 мл, замораживают при температуре минус 25°C, затем флаконы укупоривают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Замороженный концентрат хранят до 12 месяцев при температуре минус 20°C.

В модельном эксперименте было проведено испытание антибиотических свойств пробиотического препарата против *Aeromonas punctata*, который является основным возбудителем инфекционных заболеваний рыб. В качестве основного объекта экспериментов по получению модели заболевания и изучению антимикробной эффективности биопрепарата выступили годовики карпа и сазана (вид *Cyprinus carpio*), предоставленных ТОО "Рыбопитомник "Maubalyk". Заражение *Aeromonas punctata* осуществлялось методом регоз суточной культурой патогена, разведенной в физиологическом растворе до общей концентрации $1,0 \times 10^5$ КОЕ/мл в объеме 200 мкл на рыбку. В эксперименте по заражению с *Aeromonas punctata* были созданы 4 группы: 3 опытные и 1 контрольная. В 1-й опытной группе в течение 10 дней вводился биопрепарат в расчете 0,02 г на 0,02 коммерческого корма на аквариум (1:1), затем проведено заражение, далее повторно давался биопрепарат до конца эксперимента. Во 2-й опытной группе на третий день после заражения патогеном в аквариум в дозировке 125 мкг разово вводился антибиотик амоксиклав. В 3-й опытной группе было произведено только заражение болезнетворным агентом и кормление коммерческим кормом Color Scale (Китай). 4-я контрольная группа - без заражения и без введения биопрепарата, осуществлялось лишь ежедневное кормление рыб коммерческим кормом. Результаты по биометрическим показателям рыб на момент начала и завершения эксперимента представлены в табл. 1.

Таблица 1. Сравнение исходных и конечных значений биометрических показателей годовиков сазана в опытных и контрольной группах

№ опытной группы	Исходные биометрические показатели			Конечные биометрические показатели		
	Вес, г (сред.)	Длина тела, см (сред.)	Ширина груди, см (сред.)	Вес, г (сред.)	Длина тела, см (сред.)	Ширина груди, см (сред.)
1	5,8±0,38	7,6±0,15	2,0±0,05	5,9±0,33	7,7±0,14	2,1±0,09
2	5,8±0,42	7,7±0,21	2,0±0,05	5,8±0,56	7,7±0,32	2,0±0,13
3	5,9±0,37	7,7±0,15	2,1±0,05	5,5±0,60	7,6±0,38	2,0±0,09
4	6,3±0,33	7,8±0,10	2,3±0,04	6,4±0,79	7,9±0,48	2,4±0,14

В результате полученные данные по эксперименту на лабораторной модели аэромоноза годовиков сазана и карпа свидетельствуют о терапевтическом действии разработанного пробиотического препарата, которое выражается в снижении смертности рыб от заболевания, наряду с действием антибиотика Амоксицикла на 40% по сравнению с группой, не получавшей лечение. Кроме того, в группе, где применялся биопрепарат, не были выявлены патологии у рыб от перенесенного заболевания и прослеживалась положительная динамика роста основных биометрических показателей, что говорит об его профилактическом действии.

Исследования по изучению антимикробной активности показало, что разработанный пробиотический препарат обладает высокой антагонистической активностью по отношению к *Shevanella ximenensis* AI 2R-1B-RKM 0724, *Pseudomonas aeruginosa* G13 B-RKM 0417, *Pseudomonas taiwanensis* CB 2R-1B-RKM 0726, *Aeromonas punctata* G30 B-RKM 0287, *Staphylococcus aureus* B-RKM 0470, *Escherichia coli* B-RKM 0447, вызывающих инфекционные заболевания.

Спектр антагонистической активности пробиотического препарата определяли методом диффузии в агар. Тест-культуры в виде суспензии клеток в количестве 1 млрд/мл (по бактериальному стандарту мутности) наносили на поверхность чашки Петри со средой МПА (мясопептонный агар). После этого вырезали лунки сверлом диаметром 5 мм и заполняли их суспензией биопрепарата (в объеме 0,1 мл). Инкубацию чашек проводили в термостате при 37°C в течение 24–48 ч. После инкубации измеряли зоны ингибирования, результаты которых представлены в табл. 2 с вычетом диаметра зоны лунок.

Таблица 2. Антагонистическая активность пробиотического препарата

Наименование	Зоны ингибирования условно-патогенных штаммов, мм					
	<i>Aeromonas</i>	<i>Shevanella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>
	<i>punctata</i>	<i>ximenensis</i>	<i>taiwanensis</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>aureus</i>	<i>coli</i>
Пробиотический препарат	18,5±0,65	15,3±0,48	14,3±0,25	15,3±0,85	14,8±0,63	16,3±0,48
*Примечание: Антагонистическая активность считается нулевой при зоне отсутствия роста до 1,0 мм, низкой – при 1,1 – 4,9 мм, средней – при 5,0 – 8,9 мм, высокой при 9,0 мм и более						

По результатам исследования установлено, что созданный биопрепарат на основе молочнокислых бактерий проявил высокую антагонистическую активность ко всем условно-патогенным микроорганизмам (100%). Зоны ингибирования роста тест-штаммов варьировались от 14,3±0,25 мм (у *Pseudomonas taiwanensis*) до 18,5±0,65 мм (у *Aeromonas punctata*).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было доказано, что полученный пробиотик из трех культур молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum* 24С, *Pediococcus pentosaceus* 10/9К и *Lactobacillus paracasei* 9С перспективен в качестве пробиотического препарата, обладающего высокой антимикробной активностью, для нормализации, улучшения микрофлоры кишечника и подавления условно-патогенной микрофлоры, возбудителей инфекционных заболеваний у рыб, таким образом, являясь перспективным для профилактики и лечения бактериозов.

Оптимальной средой для наработки биомассы пробиотического препарата отобрана молочная сыворотка с лактозой. Состав среды (г/л): лактоза - 15, L-цистеин - 0,03, 200 мл дистиллированной воды (автоклавирование при 0,5 атм в течение 30 мин), затем добавляют 800 мл молочной сыворотки, pH 6,8. Полученную микробную биомассу клеток смешивают с защитной средой, разливают во флаконы по 5 мл, замораживают при температуре минус 25°C. Замороженный концентрат хранят до 12 месяцев при температуре минус 20°C.

Биопрепарат прошел процедуру депонирования в виде консорциума пробиотических бактерий КПБ-3, состоящий из молочнокислых штаммов *Lactobacillus fermentum* 24С, *Pediococcus pentosaceus* 10/9К, *Lactobacillus paracasei* 9С в РГП "Республиканская коллекция микроорганизмов" под №B-RKM 0876, используемый для улучшения микрофлоры кишечника и подавления патогенных и условно-патогенных возбудителей инфекционных заболеваний рыб.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пробиотический препарат для профилактики и лечения дисбактериозов у рыб, включающий консорциум штаммов молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum* 24С, *Pediococcus pentosaceus* 10/9К, *Lactobacillus paracasei* 9С, взятых в соотношении 1:1:1 по объему, депонированный в депозитарий РГП "Республиканская коллекция микроорганизмов" в виде биотехнологического продукта - консорциума пробиотических бактерий КПБ-3 под номером В-РКМ 0876.

