



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 081 575** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **A 01 K 61/00, A 61 K 35/80**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 95113126/13, 20.07.1995

(46) Опубликовано: 20.06.1997

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: 1. Инструкция по искусственному разведению тихоокеанских лососей. Государственный комитет по рыбному хозяйству при СНХ СССР, Главрыбвод, 1963. 2. Балахнин И. А., Лукьяненко В. И. Активация неспецифических факторов защиты рыб углеводами. Доклады Академии наук СССР, 1991, т. 318, N 5, с. 1254-1256.

(71) Заявитель(и):

Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН

(72) Автор(ы):

Елякова Л.А.,
Киселева М.И.,
Звягинцева Т.Н.

(73) Патентообладатель(ли):

Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН

(54) СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЯ ИКРЫ И МОЛОДИ РЫБ САПРОЛЕГНИЕЙ

(57) Реферат:

Использование: в рыбоводстве при искусственном разведении рыб для профилактики заболевания икры и молоди рыб сапролегнией и получения тем самым здорового и жизнестойкого потомства. Сущность изобретения: икру рыб во время оплодотворения выдерживают в

растворе 1 → 3; 1 → 6-β-D - глюканов, таких как ламинаран и транслан в концентрации 100-1000 мкг/мл. Обработка икры этими препаратами приводит к увеличению жизнеспособности икры и молоди рыб и уменьшению повреждаемости сапролегнией грибами за счет активации иммунной системы. 1 табл.

RU 2 0 8 1 5 7 5 C 1

RU 2 0 8 1 5 7 5 C 1



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 081 575** (13) **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **A 01 K 61/00, A 61 K 35/80**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **95113126/13, 20.07.1995**

(46) Date of publication: **20.06.1997**

(71) Applicant(s):

Тикхокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН

(72) Inventor(s):

**Eljakova L.A.,
Kiseleva M.I.,
Zvjagintseva T.N.**

(73) Proprietor(s):

Тикхокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН

(54) **METHOD TO PREVENT CAVIAR AND YOUNG FISH DISEASES AFFECTED BY SAPROLEGNIA**

(57) Abstract:

FIELD: fish breeding. SUBSTANCE: caviar during fertilization is kept in certain beta-D-glucanes solution such as laminarin and translan at 100-

1000 mcg/ml concentration. EFFECT: increased caviar and young fish viability, decreased harm by saprolegnia fungi due to higher activation of immune system. 1 tbl

R U 2 0 8 1 5 7 5 C 1

R U 2 0 8 1 5 7 5 C 1

Изобретение относится к области искусственного разведения рыб и касается способа профилактики заболевания икры и молоди рыб сапролегнией с целью получения здорового и жизнестойкого потомства.

В практике рыбоводства, в частности лососеводства, для предупреждения заражения сапролегниевыми грибами икру перед закладкой на инкубацию и после образования пигментации глаз обрабатывают 0,5%-ным раствором формалина в течение трех минут или малахитовым зеленым в разведении 1 г на 15 л в течение 10-60 с [1]

К недостатком известного способа можно отнести то, что в указанных концентрациях формалин и малахитовый зеленый практически не ингибируют развитие сапролегниевых грибов. С увеличением концентрации препаратов увеличивается токсичность, особенно в отношении личинок рыб. Кроме того, формалин является сильным ядом для персонала, работающего с ним, так как вызывает аллергию и кожные заболевания, а при вдыхании способен накапливаться в организме.

В качестве прототипа выбран способ обработки икры форели для предупреждения заражения сапролегниевыми грибами углеводами рамнозой и арабинозой [2] Икру выдерживали в 0,1 и 0,01 М растворах углеводов с последующей инкубацией в условиях рыбозавода. Через 10 дней после начала инкубации в экстрактах зародышей определяли титр рамнозоспецифичного анти-В лектина, который заметно повышался при обработке икры 0,01 М растворами моносахаридов. Обработка же икры растворами большей концентрации (0,1 М) приводила к резкому падению титра анти-В лектина. В этом случае икра поражается сапролегниевыми грибами и почти полностью погибает.

Однако в этой работе нет конкретных цифр по выживаемости и поражаемости сапролегниевыми грибами икры и зародышей.

Задача изобретения разработка высокоэффективного способа профилактики (способа профилактики) заболевания икры и молоди рыб сапролегнией, увеличивающего жизнеспособность зародышей и мальков, что в дальнейшем должно сказаться на увеличении количества промысловых рыб.

Поставленная задача решена тем, что в способе профилактики заболевания икры и молоди рыб сапролегнией, включающем обработку икры иммуномодулятором путем выдерживания в растворе препарата, в качестве последнего используют раствор $1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6$ - β -D глюканов в концентрации 100-1000 мкг/мл, а обработку осуществляют непосредственно во время оплодотворения. В качестве $1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6$ - β -D глюканов используют ламинаран и Транслам.

Ламинаран получают из морских водорослей известным способом [3] Транслам получают путем ферментативной трансформации ламинарана [4] Способность к стимуляции иммунитета рыб, выявленная у ламинарана и Транслама, позволила использовать их в предлагаемом способе профилактики заболевания икры и молоди рыб сапролегнией. Способ позволяет значительно увеличить жизнеспособность икры и молоди рыб (кеты), уменьшить поражаемость сапролегниевыми грибами за счет активации иммунной системы по сравнению с применяемым в рыбоводной практике способом обработки икры формалином.

Сущность способа поясняется следующими примерами.

Пример 1. Икру и молоди для эксперимента взяли от зрелых текучих рыб на забойной станции, расположенной в 15 км от рыбоводного завода "Рязановский" вниз по руслу реки. К полученной от нескольких самок икре добавляют сперму нескольких самцов, делят на 5 партий. В контрольную партию 1 добавляют воду. В оставшиеся партии вместо воды добавляют водный раствор ламинарана (в концентрации 1000; 500; 100 и 50 мкг/мл). Икру выдерживают в растворах в течение трех минут, после оплодотворения промывают от избытка спермы и оставляют набухать в проточной воде на 2 ч. После набухания перевозят для дальнейшей инкубации на рыбоводный завод. За инкубационный период несколько раз определяют процент погибшей икры, размер и вес молоди. Об иммунном статусе рыб судят как визуально, учитывая количество поражений сапролегниевыми грибами икры, так и по определению титра анти-В лектина (реакцией гемагглютинации) в

экстрактах зародышей кеты, который определяют дважды: через 10 и 45 дней после обработки. Формалином (контроль 2) икру обрабатывают через сутки после оплодотворения, пользуясь инструкцией, которую применяют на рыбноводном заводе [1]

В представленной таблице показаны результаты проделанной работы, откуда видно, что
5 после обработки ламинараном (концентрация 10000; 500 и 100 мкг/мл) отход икры уменьшается в 2-3,5 раза по сравнению с контролями 1 и 2. Как видно из таблицы, ламинаран в тех же концентрациях оказывает особенно существенное влияние на сохранность икры при транспортировке на завод. Так, по сравнению с контролем 1, отход икры после перевозки уменьшается в 2-4 раза. Ламинаран в меньшей концентрации (50
10 мкг/мл) уже не оказывает существенного влияния на изменение количества отхода. После обработки ламинараном (концентрация 10000; 500 и 100 мкг/мл) количество сапролегниевых грибов, поражающих икру, уменьшается в 2-5 раза по сравнению с контролями 1 и 2. Обработка ламинараном в концентрации 50 мкг/мл не дает существенных результатов и рост сапролегниевых грибов мало отличается от
15 необработанной партии.

Иммуностимулирующее действие ламинарана подтверждается количеством анти-В лектина в экстрактах зародышей. Через 10 дней после обработки реакция с тест-эритроцитами наблюдается до разведения 1/64 (в концентрации 1000; 500 мкг/мл), тогда как в контролях 1 и 2 лишь до разведения 1/4. Через 45 дней в контроле 1 титр лектина
20 уменьшился до разведения 1/2, а после обработки ламинараном в концентрации 500 мкг/мл почти сохранился (1/32). В партии икры, обработанной формалином, уровень лектина остался на прежнем уровне (1/4). Это указывает на то, что в икре, обработанной ламинараном, иммунитет повышается и это состояние сохраняется достаточно длительной
25 время.

После выклева личинок дважды измеряли прирост после поднятия личинок на плав и перед выпуском в бассейны. В первом случае молодь была крупнее после обработки ламинараном в концентрации 100 мкг/мл, а перед выпуском более крупная молодь отмечалась в партиях, обработанных большей концентрацией ламинарана. Так, после
30 обработки ламинараном в концентрации 500 мкг/мл молодь была на 20% крупнее, чем в контроле 1. Обработка формалином почти не оказывает влияние на размер молоди (см. таблицу).

Пример 2. Икру обрабатывают так же, как в примере 1, но в этом варианте применяют Транслам. После обработки трансламом в концентрациях 1000 и 500 мкг/мл отход икры по сравнению с контролями 1 и 2 уменьшился в 2 и 3 раза соответственно (см. табл.). При
35 транспортировке оплодотворения икра лучше всего сохраняется после обработки трансламом в концентрациях 100 и 500 мкг/мл (отход икры в 3,5 раза меньше, чем в контроле 1). Уменьшение концентрата действующего вещества до 50 мкг/мл не оказывает существенного влияния на отход икры и рост сапролегниевых грибов. Поражаемость сапролегниевыми грибами меньше всего после обработки трансламом в концентрациях
40 1000 и 500 мкг/мл. Это подтверждается данными по определению титра анти-В лектина. После обработки икры трансламом в этих концентрациях титр анти-В лектина в экстрактах зародышей кеты через 10 дней после обработки наблюдался до разведения 1/64, а через 45 дней 1/16, тогда как в первом контроле он был 1/4 и 1/2 соответственно. После обработки меньшей концентрацией транслама титр анти-В лектина изменялся с
45 разведением 1/32 до 1/8 при 100 мкг/мл; 1/8 до 1/4 при 50 мкг/мл. Обработка формалином, как и в первом примере, с течением времени (45 дней) уровень лектина не изменяли и этот уровень мало отличался от уровня контроля 1. Отсюда видно, что транслам, как и ламинаран, вызывает и длительное время поддерживает повышенную устойчивость иммунитета. В то же время самая крупная молодь была после обработки
50 икры трансламом в концентрации 500 мкг/мл (после поднятия на плав 10% перед выпуском на 45% крупнее, чем в контролях 1 и 2).

Таким образом показано, что ламинаран и транслам обладают значительно большей эффективностью для предупреждения заражения икры и молоди рыб сапролегниевыми

грибами, чем используемый в настоящее время для этой цели формалин. В оптимальном случае (обработка $1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6$ - β -D глюкозами в концентрации 500 мкг/мл) отмечено в 5 раз меньше количество сапролегниевых грибов, чем в контроле 1; тогда как после обработки формалином разница с контролем 1 была совсем незначительна (на 0,5% см. таблицу).

Сравнивая действие ламинарана и транслама, видим, что несмотря на то, что в отличие от теплокровных, где транслам является лучшим иммуностимулятором [5,6] чем ламинаран, для хладнокровных (рыбы) иммуностимулирующие эффекты этих двух веществ довольно близки. Поэтому возможно использование как транслама, так и более доступного и дешевого ламинарана для профилактики против заражения сапролегниевыми грибами. Оптимальной концентрацией для обработки икры является концентрация 500 мкг/мл. Уменьшение концентрации препаратов (ниже 100 мкг/мл) почти снимает эффект иммунизации зародышей кеты. Обработка икры $1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6$ - β -D глюкозами в концентрациях от 100 до 1000 мкг/мл значительно увеличивает сохранность икры при перевозке (отход в 2-4 раза меньше, чем в контроле 1). Увеличение сохранности икры при перевозке, возможно, еще одно проявление иммуностимуляции икры, обработанной $1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6$ - β -D

глюкозами.

Литература.

1. Инструкция по искусственному разведению тихоокеанских лососей. Гос. комитет по рыбному хозяйству при СНХ СССР. Главрыбвод, 1963 г.

2. Балахнин И. А. и Лукьяненко В.И. Активация неспецифических факторов защиты рыб углеводами. Доклады Академии наук СССР, 1991, т. 318. N 5, с. 1254-1256.

3. Звягинцева Т.Н. Сундукова Е.В. и Елякова Л.А. Патент РФ N 1642725, C O8 B 37/18 "Способ получения ламинарана". 1990 г.

4. Звягинцева Т.Н. Исакова В.В. и Елякова Л.А. Ферментативное превращение ламинаранов в $1,3; 1,6$ - β -D-глюкан, обладающий иммуностимулирующей активностью. "Биоорганическая химия". 1995, т. 21. N 3, с.218-225.

5. Кузнецова Т. А. и др. Влияние транслама на некоторые показатели естественной резистентности облученного организма. Радиобиология. 1994, N 2, с. 236-238.

6. Игнатенко Л.А. и др. Стимуляция регенерации гемопоэза мышей под действием транслама. 1990. т. 30. с. 555-556.

Формула изобретения

Способ профилактики заболевания икры и молоди рыб сапролегнией, включающий обработку икры иммуномодулятором путем выдерживания в растворе препарата, отличающийся тем, что в качестве последнего используют

$1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6$ - β -D-

глюканы в концентрации 100 1000 мкг/мл, а обработку осуществляют непосредственно во время оплодотворения.

Таблица

Влияние 1→3;1→6-β-D-глюканов на жизнеспособность и иммунитет икры и молоди кеты, обработанных во время оплодотворения (количество икринок в каждой партии - 3000-6000 шт)

Показатель	Контроль		Пример 1 ламинаран, мкг.мл				Пример 2 транслам, мкг.мл			
	1 (вода)	2 (фор малин)	1000	500	100	50	1000	500	100	50
<u>Отход икры, %:</u>										
После транспортировки	4,8	4,8	1,9	1,2	1,2	4,3	2,4	1,4	1,5	4,2
За инкубационный период	7,9	7,6	4,1	2,2	5,6	7,4	3,2	2,5	7,6	8,5
Всего	12,7	12,3	6,0	3,4	6,8	11,7	5,6	3,9	9,1	12,7
<u>Поражаемость сапролегниевыми грибами за инкубационный период, %</u>										
	7,6	7,1	2,7	1,6	4,2	6,6	2,9	2,3	6,9	7,7
<u>Титр анти-В лектина (кол-во выдержанных разведений)*</u>										
Через 10 дней после обработки	4	4	64	64	32	16	64	64	32	8
Через 45 дней после обработки	2	4	16	32	16	8	16	16	8	4
<u>Размер молоди после поднятия на плав</u>										
Средний вес, мг	414	420	429	421	456	420	436	449	422	421
Средняя длина, мм	390	395	395	395	400	395	395	400	395	395
<u>Размер молоди перед выпуском</u>										
Средний вес, мг	466	478	519	554	486	484	594	678	480	462
Средняя длина, мм	40	41	42	42	42	41	43	44	42	40

* - исходная концентрация экстрактов зародышей - 400 мкг/мл