



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013136182/13, 01.08.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.08.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 01.08.2013

(45) Опубликовано: 20.02.2015 Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2312517 С1, 20.12.2007. RU 2374900 С2, 10.12.2009. ЕА 16809 В1, 30.07.2012. RU 2221437 С1, 20.01.2004

Адрес для переписки:

193313, Санкт-Петербург, ул. Подвойского, 14,
к. 1, кв. 741, Кузнецову В.А.

(72) Автор(ы):

ВОЛКОВ Михаил Юрьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

**Общество с ограниченной ответственностью
"НИКОФАРМ" (RU)**

(54) ДОБАВКА К КОРМУ ДЛЯ РЫБ

(57) Реферат:

Изобретение относится к кормопроизводству, в частности к добавке к корму для рыб. Добавка содержит клетки *Halobacterium halobium* и соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, при этом клетки *Halobacterium halobium* содержатся в добавке в виде сухой стерилизованной биомассы, полученной при их культивировании и последующем обезвоживании культуральной жидкости, содержащей эти клетки. Ингредиенты содержатся в кормовой смеси в концентрации, масс. %: клетки *Halobacterium halobium* в виде сухой стерилизованной биомассы - 10-20, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты 5-10,

кормовая смесь - остальное. При этом в случае, если корма не содержат витамин А, то ингредиенты в кормовой смеси берутся в следующем соотношении, масс. %: клетки *Halobacterium halobium* в виде сухой стерилизованной биомассы - 18-20, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты - 5-10, кормовая смесь - остальное. Использование изобретения позволит положительно влиять на биологические показатели выращенных рыб, а также защитить организм рыб от воздействия тяжелых металлов. 1 з.п. ф-лы., 3 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2013136182/13, 01.08.2013**
 (24) Effective date for property rights:
01.08.2013
 Priority:
 (22) Date of filing: **01.08.2013**
 (45) Date of publication: **20.02.2015** Bull. № 5
 Mail address:
**193313, Sankt-Peterburg, ul. Podvojskogo, 14, k. 1,
 kv. 741, Kuznetsovu V.A.**

(72) Inventor(s):
VOLKOV Mikhail Jur'evich (RU)
 (73) Proprietor(s):
**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
 "NIKOFARM" (RU)**

(54) **FEED ADDITIVE FOR FISH**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.
 SUBSTANCE: additive comprises Halobacterium halobium cells and salts of ethylenediaminetetraacetic acid, at that Halobacterium halobium cells are contained in the additive as a sterile dry biomass obtained when their cultivating and subsequent dehydration of the culture liquid containing these cells. The ingredients are contained in the feed mixture in the following concentration, wt %: Halobacterium halobium cells in the form of a dry sterilised biomass - 10-20, salts of ethylenediaminetetraacetic acid 5-10, feed mixture -

the rest. At that in case, if the feed does not contain vitamin A, the ingredients in the feed mixture are taken in the following ratio, wt %: Halobacterium halobium cells in the form of a dry sterile biomass - 18-20, salts of ethylenediaminetetraacetic acid - 5-10, feed mixture - the rest.

EFFECT: use of the invention enables to influence positively on biological indicators of grown fish, and to protect the fish body from the exposure to heavy metals.

2 cl, 3 tbl

RU 2 541 676 C1

RU 2 541 676 C1

Изобретение предназначено для использования в рыбоводстве, в частности относится к кормам для рыб при их выращивании в природных и искусственных водоемах.

В настоящее время известно большое количество кормов для рыб, используемых при их выращивании в природных (прудах, реках) и искусственных (аквариумах) водоемах [www.aquafeed.ru/ru.ask.com/; Корма+Для+Рыбwww.centromall.ru и т.п.]. Выбор конкретного корма определяется породой рыб, особенностями водоема, задаваемым эффектом.

Как правило, корм для рыб состоит из кормосмеси и кормовых добавок. В состав комосмесей для рыбы, выращиваемой в прудах, входят жмыхи, шроты, комбикорма, отходы пищевой и спиртовой промышленности, некоторые сельскохозяйственные культуры (ячмень, люпин, люцерна) и т. п. Качество кормов зависит от содержания в них питательных веществ (белки, жиры, углеводы), а также витаминов. [http://www.cnshb.ru/AKDiL/0015/base/RK/000174.shtm]. Вместе с тем, потребности рыбы в питательных веществах индивидуальны для каждого вида, зависят от нескольких факторов (возраст рыбы, ее масса тела и подвижность).

Введение в кормосмесь кормовых добавок позволяет оптимизировать питательный состав кормов, улучшить их биодоступность и сохранение свойств корма при хранении, обеспечить лечебное и профилактическое действие, воздействовать на скорость развития рыб и т.п. К числу кормовых добавок относятся, в частности, микроэлементы, витамины В и С, лигнины, карбоксиметилцеллюлоза [http://aquariumfishfood.ru/; SU 1567140, 1990; GB 1466003, 1977].

Наибольший интерес в качестве кормовых добавок представляют вещества, воздействующие на биологическую активность организма рыбы. Так, известно введение в кормосмесь хитозана, обладающего неспецифической биологической активностью, но используемого в качестве связующего компонента [RU 2221437, 2004], однако его воздействие на скорость роста рыб и их защиту от негативного воздействия внешней среды весьма невелико.

Наиболее близким по технической сущности к заявляемому изобретению является использование в качестве добавки в кормовую смесь баксина и янтарной кислоты, которые содержатся в кормовой смеси в количестве, мг/кг кормосмеси: баксин - 100-1000, янтарная кислота и/или ее соединения - 50-500 [RU 2312517, 2007].

Применяемый в составе добавки баксин представляет собой высушенную биомассу выращенных в водно-минеральной питательной среде и инактивированных клеток одного из видов экстремофильных галобактерий (*Halobacterium halobium* 353П, ВКПМ в-1739), обитающих в сильно соленых водах некоторых озер Южной Африки, Мертвого моря, залива Кара-Богаз и других. В настоящее время баксин рекомендован в качестве биологически активной добавки к пище человека [RU 2109515, 1998]. Препарат представляет собой лиофильно высушенный порошок биомассы галобактерий. Применим как биологически активная добавка к пище, как средство уменьшения токсического эффекта противоопухолевых соединений. Применим для профилактики и терапии лучевой болезни.

Недостатком кормовой добавки является недостаточное стимулирующее воздействие на развитие рыб и защиту их организма от воздействия тяжелых металлов.

Задачей, решаемой авторами, являлось расширение спектра используемых кормовых добавок для рыб с целью достижения более ускоренного развития рыб и обеспечения защиты их организма от воздействия тяжелых металлов.

Технической задачей являлось создание композиции на основе *Halobacterium halobium*, способной обеспечить поставленную выше задачу.

Технический результат достигался созданием препарата, содержащего сухую стерилизованную культуральную жидкость, полученную в результате культивирования штамма *Halobacterium halobium* 353П, ВКПМ В-1739 (КЖбаксин), и соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) при следующем соотношении

5 ингредиентов (мас.%) от корма:

КЖбаксин - 10-20%,

ЭДТА - 5-10%,

Кормосмесь - остальное.

10 Добавка содержит смесь компонентов питательной среды с клетками *Halobacterium halobium* (баксина) и ЭДТА.

Стерилизованная культуральная жидкость *Halobacterium halobium* высушенная методом сублимации, содержит от 0,05 до 0,20 мг/г общей суммы каротиноидов, которые работают как ловушки свободных радикалов, повышают иммунный статус, улучшают состояние кожи, благотворно влияют на зрение. Содержащиеся в ней бетаины и эктоины

15 способны защищать биологические молекулы и живые клетки от экстремальных воздействий (замораживания/размораживания, высушивания, нагревания). Наряду с этим она, в частности, за счет метаболитов, продуцированных бактериями при их росте и в ходе обезвоживания, обладает повышенной антиоксидантной активностью.

Результаты оценки антиоксидантной активности стерилизованной культуральной жидкости *Halobacterium halobium* по ее воздействию на растертую ткань печени мышей [по методике ингибирования промежуточного продукта окисления - диеновых

20 конъюгатов (ДК) и по ингибированию конечного продукта окисления - малонового диальдегида (МДА) в системе *in vitro* - в гомогенате печени мышей и в системе *in vivo* на мышцах с токсикозом, индуцированным четыреххлористым углеродом] приведена

25 в таблице 1.

Таблица 1	
Оценка антиоксидантной активности сухой культуральной жидкости <i>Halobacterium halobium</i>	
Наименование объекта	Антиоксидантная активность, у.е./мг
Сухая культуральная жидкость <i>Halobacterium halobium</i>	10±1
Сухие клетки <i>Halobacterium halobium</i>	7±1
Альфа токоферол	2±0,3

35 Оптимальная концентрация в смеси сухой стерилизованной культуральной жидкости *Halobacterium halobium* (баксин) - 15 мас.%.

Снижение ее концентрации менее 10 мас.% существенно снижает антиоксидантное действие препарата. Повышение концентрации более чем 15 мас.% практически не влияет на свойства препарата, но повышает возможность разрушения метаболитов под действием собственных ферментов гидробионтов. При использовании в качестве

40 кормосмеси корма, не содержащего витамин А, количество КЖбаксина должно быть повышено до 18-20 мас.%.

Одним из компонентов предлагаемой добавки является ЭДТА. В настоящее время ЭДТА, как правило, применяют в виде дигидрата динатриевой соли (комплексен III, трилон Б, Na₂-ЭДТА) или соли кальция-натрия в качестве антиокислителя и

45 стабилизатора окраски при производстве маргарина и майонеза в количестве до 100 мг/кг, рыбных и консервов из морепродуктов (ракообразных и моллюсков) - до 75 мг/кг [am-am.su/210-antioksidante385-cana2-edta.html], а также в виде 5% раствора перорально

для нейтрализации тяжелых металлов при оральной хелатотерапии [<http://www.nmiff.ru/paradeigma/edta.htm>]. В организме ЭДТА практически не усваивается. Допустимая суточная норма для его введения в организм человека в виде биодобавок составляет около 2,5 мг/кг массы тела в день.

5 Особенностью заявляемой кормовой добавки является использование в качестве
препарата, содержащего клетки *Halobacterium halobium*, сухой стерилизованной
культуральной жидкости, полученной в результате их культивирования при повышении
концентрации данного ингредиента в корме с 0,1 мас.% до 20-40 мас.% с одновременным
10 введением в корм существенно более высоких количеств ЭДТА в количестве 5-10 мас.%
вместо 0,1-5 мас.%.

 Как показали проведенные эксперименты, новая комплексная добавка существенно
повышает обменные процессы в организме рыбы, усиливая величину и скорость набора
массы тела и очищая организм рыбы от негативных элементов, в частности тяжелых
металлов, которые являются ферментными ядами, воздействуют на металлоферменты,
15 ответственные за очистку организма от ксенобиотиков и за размножение клеток.
Кормление рыб кормом, включающим баксинсодержащий компонент и ЭДТА,
позволяет нормализовать обмен веществ у рыб, детоксицировать организм, повысить
резистентность к неблагоприятным внешним условиям и реализовать резервы их роста
и развития в пределах генотипа, интенсифицировать регенерацию тканей

20 Действие препарата базируется на введении в полость кишечника биокаротиноидов
и ЭДТА, что позволяет поддерживать в ЖКТ активность биологических компонентов
препарата, диффузию антиоксидантов и детоксицирующий эффект, с сорбцией токсичных
соединений, что особенно важно для общей детоксикации организма.

 Использование сухой КЖбаксин и ЭДТА позволяет проводить приготовление кормов
25 методом экструзии при краткосрочном нагревании до 95°C, обеспечивается равномерное
распределение в составе кормосмеси за счет дробного разведения. Данная технология
удобна и технологична в процессе производства, в том числе и непосредственно в местах
применения, так как не требует специального оборудования.

 В качестве кормосмеси используют, как правило, стандартные корма для рыб,
30 например упомянутые в ГОСТ 10385-76 (Комбикорма для прудовых рыб, Москва,
1979, с.76), такие как рецептура 16-80 кормосмеси, содержащей следующие компоненты:
белково-витаминный концентрат дрожжи гидролизные, муку рыбную, муку пшеничную,
шрот соевый, шрот подсолнечный, метионин, премикс; а также производные корма
для выращивания прудового карпа "Карп прудовый 26/3 и 26/5", содержащие муку
35 рыбную, муку мясокостную, дрожжи, шрот подсолнечный, шрот соевый, пшеницу,
ячмень, отруби, премикс ПКП. Корма могут дополнительно содержать добавку
витамина А (ретинол) в дозе 15000 ед.

 Кормовая добавка готовится следующим образом. Первоначально получают
препарат КЖбаксин следующим образом. Микроорганизмы *Halobacterium halobium*
40 выращивают методом глубинного культивирования в ферментерах, имеющих объем
250 л. Поддержание рабочего значения pH (7,2-7,4) осуществляется с помощью контура
контроля и регулирования. Освещение среды выращивания в ферментере осуществляется
люминесцентными лампами, расположенными в светопропускающих каналах
ферментера. Воздух для аэрации растущей бактериальной суспензии в ферментер
45 подается через эжекторы циркуляционных насосов. При достижении оптической
плотности не менее 1,0, измеренной в 3 мм кювете против дистиллированной воды при
490 нм в ферментер насосом-дозатором из мерника со скоростью 1-10 л/час, начинают
подавать раствор питательных солей (натрий хлор, магний сернокислый, калий

хлористый, натрий лимоннокислый), а из мерника микроэлементов насосом-дозатором начинают подавать раствор микроэлементов (кислота ортофосфорная, марганец хлористый, железо (II) сернокислое, цинк сернокислый) со скоростью 50-300 мл/час. По достижении рабочего объема 150 л начинается оборот суспензии из ферментера через сливной штуцер, которая направляется на сепарацию. Количество отработанной культуральной жидкости в общем объеме среды варьируют в интервале 25-50%, подбирая его таким образом, чтобы не допустить падения оптической плотности системы ниже значения 0,7. Суспензию товарной биомассы галобактерий собирают в сборник и переливают в напорные емкости, из которых она поступает на сепарацию. Сепарацию производят на центробежных сепараторах. Скорость протока сепарируемой суспензии варьируют в интервале 8-40 л/час, подбирая ее таким образом, чтобы выход сгущенной пасты биомассы галобактерий не снижался ниже 8 г/л суспензии. Для сушки используют метод лиофилизации или высушивание под вакуумом. При использовании лиофилизации сгущенную пасту продукта замораживают в морозильном шкафу при температуре -50°C. Количество пасты, загружаемой в лоток, составляет 400-600 г для сушилки типа TG-5 или 500-1000 г для сушилки типа LZ-9. Продолжительность цикла высушивания составляет 48-72 часа. В процессе сушки поддерживают следующие параметры:

- температура нагретых плит, не более - 15-20°C,
- остаточное давление, не более - 0,5 мм рт.ст.

При высушивании под вакуумом продукт загружают в лотки из нержавеющей стали в количестве 400-600 г и помещают в вакуум-сушильный шкаф. В процессе сушки, длящемся 24-48 часов, поддерживают температуру 25-50°C.

Полученный сухой препарат вместе с заданным количеством ЭДТА добавляют в корм непосредственно перед применением или в установленной пропорции загружать в бункер для экструзии с кормом.

Добавка КЖбаксина в различные корма для рыб в количестве от 100 до 200 г на кг кормосмеси активизирует иммунную систему рыбы, ускоряет ее рост и развитие. Введение ЭДТА в количестве от 50 до 100 г/кг кормосмеси совместно с КЖбаксин повышает эффективность последнего, причем комбинация баксин - ЭДТА проявляет синергичное действие на организм рыбы.

Сущность изобретения иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Испытания кормовых добавок проводили на сеголетках карпа массой 38-45 г в лабораторных условиях в проточных аквариумах. Сеголетков карпа по 20 шт. содержали в 70 л проточных аквариумах при температуре воды в ходе всего опыта в пределах 18-21°C, и с содержанием кислорода от 6,8 до 9 мг/л. При этом общая длительность эксперимента составила 45 дней. Из них 14 дней пришлось на процесс адаптации рыб к аквариумным условиям и перевод их на нормированный режим кормления - 4% в сутки. Курс скармливания кормокомбинаций составил 24 дня.

Параллельно проводили следующие эксперименты с кормосмесью «Карп прудовый 26/5»:

- вариант 1 - кормосмесь без добавок;
- вариант 2 - кормосмесь с добавкой витамина А (15000 ед);
- вариант 3 - кормосмесь с добавкой 0,5% баксина и 0,2% янтарной кислоты (ближайший аналог);
- вариант 4 - кормосмесь с добавкой 8% ЭДТА;
- вариант 5 - кормосмесь с добавкой 15% КЖбаксина;
- вариант 6 - кормосмесь с добавкой 15% КЖбаксина и 8% ЭДТА;

- вариант 7 - кормосмесь с добавкой 15% баксина и 8% ЭДТА;
- вариант 8 - кормосмесь с добавкой 10% КЖбаксина и 5% ЭДТА;
- вариант 9 - кормосмесь с добавкой 20% КЖбаксина и 10% ЭДТА;
- вариант 10 - кормосмесь с витамином А и добавкой 20% КЖбаксина и 8% ЭДТА.

По завершении курса кормления и на всех этапах эксперимента проводили сравнительную оценку физиологического состояния рыб по гематологическим параметрам. Рыбоводные расчеты абсолютного, относительного и среднесуточного прироста средней массы проводили по общепринятым методам. При этом оценивали относительный прирост массы рыб $\Delta M_{\text{отн}}^0$, который характеризует интенсивность роста рыб (%) в сравнении с начальной массой или в среднем за период по формуле:

$$\Delta M_{\text{отн}}^0 = \frac{M_1 - M_0}{M_0} \cdot 100\%,$$

Полученные результаты приведены в таблице 2. Анализ полученных данных показал, что значения основных биохимических параметров слизи у рыб в опытных и контрольной группах практически не различаются и соответствуют физиологической норме. При этом отмечается нормализация уровня гемоглобина в слизи рыб, т.к. заявляемая добавка нормализует обмен веществ, при этом относительный прирост практически удвоился, а по сравнению с ближайшим аналогом вырос на 20%. Сопоставление результатов использования заявляемой рецептуры и ее ингредиентов показало существенный рост показателей при использовании добавки и достигаемый при этом синергизм. При этом, как показали проведенные эксперименты, отмечается рост показателей при использовании в ее составе КЖбаксина по сравнению с баксином, по-видимому за счет обогащения смеси метаболитами и питательными веществами, входящими в КЖ.

Пример 2. В условиях примера 1 изучалось влияние кормовых добавок на выращивание рыбы в присутствии тяжелых металлов. С этой целью в воду добавляли соли тяжелых металлов до содержания кадмия 10,0 мкг/л; свинца - 120 мкг/л, цинка 120 мкг/л, меди 120 мкг/л

В качестве кормосмеси применяли рецептуру 16-80, в качестве кормовых добавок использовали

- вариант 1 - кормосмесь без добавок;
- вариант 3 - кормосмесь с добавкой 0,5% баксина и 0,2% янтарной кислоты (ближайший аналог);
- вариант 6 - кормосмесь с добавкой 15% КЖбаксина и 8% ЭДТА;
- вариант 9 - кормосмесь с добавкой 20% КЖбаксина и 10% ЭДТА;
- вариант 10 - кормосмесь с витамином А и добавкой 20% КЖбаксина и 10% ЭДТА.

Полученные результаты показали, что использование заявляемой добавки существенно снижает содержание тяжелых металлов в организме рыб. В случае использования смеси баксина с янтарной кислотой защитный эффект незначителен.

Приведенные примеры иллюстрируют, что корм для рыб, представляющий собой стандартную кормосмесь с добавкой КЖбаксина и ЭДТА, оказывает положительное влияние на рыбоводно-биологические показатели выращивания рыб. При этом наиболее выражены эффект ростостимуляции, детоксикации, иммунокоррекции и выживаемости искусственно зараженной рыбы.

Влияние природы кормовой добавки на содержание показатели жизнедеятельности рыб											
Показатель	Вариант добавки										
	норма	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Относительный прирост*, %		6,79	6,81	10,7	8,89	9,34	12,71	11,71	10,66	12,76	12,82
Слизь											
Гемоглобин, эр./мкл	0-10	105,4±26,1	97,1±12,5	13,0±2,0	12,0±1,8	12,0±1,8	9,2±0,1	9,1±0,1	9,3±0,1	9,1±0,1	8,5±0,1
Белок, г/л	0,3-1,0	0,98±0,09	0,86±0,05	0,79±0,1	0,89±0,1	0,89±0,1	0,68±0,4	0,72±0,4	0,55±0,3	0,72±0,4	0,66±0,4
Кровь											
Глюкоза крови, мкг/л	70-80	103,0±7,6	101,0±5,8	108±13,8	87,0±10,1	91,0±8,4	98,1±3,4	105,1±3,4	98,0±6,4	105,1±3,4	98,3±3,4
Гемоглобин, г/л	70-90	89,1±3,8	89,6±7,5	66,4±3,3	76,4±2,3	77,8±3,3	80,3±2,5	85,3±2,5	80,9±2,5	85,3±2,5	85,2±2,5
Эритроциты, млн/мкл	1,0-1,2	1,19±0,2	1,19±0,2	1,03±0,06	1,01±0,01	1,0±0,01	1,10±0,01	1,15±0,01	1,1±0,01	1,15±0,01	1,16±0,01
Лейкоциты, тыс./мкл	20-25	24,1±3,4	24,7±3,6	42,1±6,0	24,2±3,0	22,8±2,1	23,8±2,3	25,2±2,3	22,0±2,2	25,2±2,3	25,4±2,3

Влияние природы кормовой добавки на содержание тяжелых металлов в организме рыб.						
Металл, мг/кг	Норма* ПДК					
	1	3	6	9	10	
Кадмий	0,2	2,2±0,4	2,0±0,4	0,8±0,4	0,8±0,4	0,7±0,4
Свинец	1,0	5,1±1,2	4,8±1,1	3,0±1,2	2,8±1,2	3,4±1,2
Цинк	40	49,1±5,9	52,2±5,2	32,5±3,8	30,2±3,5	35,5±3,2
Медь	10	35,0±5,0	33,0±5,0	22,4±2,4	20,4±3,2	22,0±2,4

*<http://www.dietolog.org/components/food-toxins/heavy-metals/#requirements-the-content-heavy-metals-foods>

Формула изобретения

1. Добавка к корму для рыб, содержащая клетки *Halobacterium halobium*, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, а клетки *Halobacterium halobium* содержатся в добавке в виде сухой стерилизованной биомассы, полученной при их культивировании и последующем обезвоживании культуральной жидкости, содержащей эти клетки, причем ингредиенты

содержатся в кормовой смеси в концентрации, мас. %:

- сухая культуральная жидкость - 10-20,
- соли этилендиаминтетрауксусной кислоты 5-10,
- кормовая смесь - остальное.

2. Добавка к корму для рыб по п.1, отличающаяся тем, что для кормов, не содержащих витамин А, содержание ингредиентов в кормовой смеси составляет, мас. %:

- сухая культуральная жидкость 18-20,
- соли этилендиаминтетрауксусной кислоты 5-10,
- кормовая смесь - остальное.