

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **224877**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **399670**

(51) Int.Cl.
A61K 35/741 (2015.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **26.06.2012**

(54) **Zastosowanie szczepu bakterii *Carnobacterium divergens* oraz jego metabolitów do wytwarzania probiotyku dla ryb, mięczaków i skorupiaków słodkowodnych do ograniczenia aktywności, wzrostu lub przeżywalności chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio angillarum*, *Edwardsiella Tarda***

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

06.07.2015 BUP 14/15

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

28.02.2017 WUP 02/17

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODniczy
W POZNANIU, Poznań, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

WŁODZIMIERZ GRAJEK, Poznań, PL
ANNA SIP, Poznań, PL
ANTONI PRZYBYŁ, Tarnowo Podgórne, PL
JAN MAZURKIEWICZ, Tarnowo Podgórne, PL

(74) Pełnomocnik:

recz. pat. Bartłomiej Fijałkowski

PL 224877 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie szczepu bakterii *Carnobacterium divergens* oraz jego metabolitów do wytwarzania probiotyku dla ryb, mięczaków i skorupiaków słodkowodnych do ograniczenia aktywności, wzrostu lub przeżywalności chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio angillarum*, *Edwardsiella Tarda*.

Stan zdrowia ryb zależy od wielu czynników zarówno fizjologicznych, jak i środowiskowych. Wśród nich ważną rolę odgrywa mikroflora przewodu pokarmowego. Jej źródłem jest całe środowisko wodne. Bytujące w nim mikroorganizmy, wśród których zwykle dominują bakterie *Yibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* i *Clostridium*, już w kilka godzin po rozpoczęciu przez larwy aktywnego pobierania pokarmu zasiedlają ich jeszcze nie w pełni wykształcony przewód pokarmowy. Następnie kolonizują go również bakterie fermentacji mlekowej. W przewodzie pokarmowym, zarówno narybku jak i dorosłych ryb morskich zwykle występują one w niewielkich ilościach. U wielu gatunków ryb słodkowodnych, a zwłaszcza pstrąga tęczowego, troci wędrownej oraz ryb karpiowatych, okoniowatych, jesiotrowatych i szczupakowatych są one natomiast dominującą grupą drobnoustrojów. Największy udział w populacji bakterii fermentacji mlekowej kolonizujących przewód pokarmowy ryb słodkowodnych mają bakterie z rodzaju *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Pediococcus*. Naturalnymi i zwykle w pełni bezpiecznymi komponentami ekosystemu jelitowego wielu ryb słodkowodnych są także bakterie z rodzaju *Carnobacterium*. W przewodzie pokarmowym wolno żyjących troci wędrownych i pstrągów tęczowych reprezentowane są one przez takie gatunki jak: *C. divergens*, *C. gallinarum*, *C. funditum*, *C. mobilis* i *C. piscicola*.

Bakterie *Carnobacterium* są katalazo-negatywnymi, gram-dodatnimi, nie tworzącymi spor, względnie beztlenowymi pałeczkami, blisko spokrewnionymi z bakteriami *Lactobacillus*. Są niezdolne do wzrostu na agarze octowym, zawierają kwas mesodiaminopimelinowy w ścianie komórkowej, hydrolizują argininę do cytruliny oraz w odróżnieniu od wielu innych LAB rosną nawet w temperaturze 4°C. Nie rozwijają się natomiast w temperaturze wyższej niż 45°C. Do prawidłowego wzrostu wymagają diety bogatej w węglowodany, aminokwasy, peptydy, kwasy tłuszczowe oraz witaminy. *Carnobacterium*, podobnie jak i inne bakterie fermentacji mlekowej, są zdolne do wytwarzania kwasu mlekowego, który obniża pH jelit i w konsekwencji tego hamuje wzrost wielu drobnoustrojów, m. in. chorobotwórczych dla ryb. Istotną rolę w hamowaniu wzrostu drobnoustrojów chorobotwórczych dla ryb odgrywają również inne metabolity bakterii *Carnobacterium* tj., nadtlenek wodoru, aldehyd octowy i bakteriocyny. Spośród wymienionych związków szczególnie silną aktywność przeciwdrobnoustrojową mają bakteriocyny. Związki te pod wieloma względami przypominają antybiotyki. W odróżnieniu od nich są jednak całkowicie bezpieczne dla człowieka i zwierząt oraz nie inicjują powstawania form opornych drobnoustrojów. Z uwagi na dużą specyficzność działania bakteriocyny nie zakłócają naturalnej równowagi ekosystemu jelitowego. Większość bakteriocyn posiada bowiem wąski zakres aktywności i działa jedynie na kilka grup drobnoustrojów. Takiej wybiórczości działania nie wykazują antybiotyki.

Zdolność syntezy bakteriocyn aktywnych względem drobnoustrojów patogennych dla ryb mają jednak tylko niektóre szczepy bakterii *Carnobacterium*. Podkreślić należy, że właściwości probiotyczne są rzadkie i szczepo-specyficzne. Znane są od lat efekty probiotyczne mikroorganizmów, ale do produkcji probiotyków mogą być użyte tylko wyselekcjonowane i sprawdzone pod względem działania szczepy. Oznacza to, że w danym gatunku bakterii tylko nieliczne szczepy wyróżniają się aktywnością probiotyczną.

Woda jest idealnym środowiskiem dla rozwoju drobnoustrojów. Rozmnażaniu się mikroorganizmów sprzyja skażenie wody resztkami pasz i kału rybiego. Mikroorganizmy unoszące się w wodzie są pobierane przez ryby i łatwo przenikają do ich układu pokarmowego. Wśród mikroorganizmów wodnych często występują drobnoustroje chorobotwórcze. Drobnoustroje te za pośrednictwem wody, zwłaszcza silnie zanieczyszczonej wnikają do układu pokarmowego ryb i stają się przyczyną poważnych chorób ryb, często o wysokiej śmiertelności. Jak dotąd walka z patogenami rybimi polegała na traktowaniu ryb antybiotykami (erytromycyną, josamycyną, spiramycyną, tetracyklinami i gentamycyną). Terapia antybiotykowa jest jednak kosztowna i niekorzystna dla środowiska. Alternatywą dla leczenia ryb antybiotykami jest stosowanie probiotyków. W odróżnieniu od antybiotyków, ich działanie może mieć charakter zarówno leczniczy, jak prewencyjny, co ze względów praktycznych jest dużo korzystniejsze.

W chowie organizmów wodnych (ryby, mięczaki, stawonogi) preparaty probiotyczne są stosowane od kilkunastu lat, w celu modyfikowania jakości wody, jako środowiska ich życia oraz wprowadzania pożytecznej mikroflory do ich przewodu pokarmowego. Współczesna koncepcja probiotyków została opracowana 35 lat temu przez Parkera, który probiotyki zdefiniował jako organizmy lub

substancje, przyczyniające się do zachowania równowagi mikrobiologicznej w przewodzie pokarmowym. Rozwój badań nad zastosowaniem probiotyków w żywieniu organizmów wodnych, w tym również ryb, jest bezpośrednią konsekwencją poszukiwania alternatywy dla wycofanych z przemysłu paszowego antybiotyków stymulatorów wzrostu. Działanie wielu probiotyków jest zbliżone do efektów stosowania antybiotyków paszowych. Zarówno probiotyki jak i antybiotyki, mogą być wykorzystywane jako narzędzia regulacji liczebności bakterii patogennych. Probiotyki, w odróżnieniu do antybiotyków nie niszczą jednak natywnej mikroflory przewodu pokarmowego organizmów wodnych a tylko ją stabilizują.

W ostatnich latach w wytwarzaniu pasz stosuje się coraz szerszą paletę dodatków paszowych – substancji lub związków, których zadaniem jest uzyskiwanie jak najlepszych efektów produkcyjnych w chowie zwierząt. Zastosowanie każdego z dodatków paszowych musi uwzględniać bezpieczeństwo zdrowia ludzi (konsumentów), zdrowia zwierząt i ich dobrostanu, a także wpływ na środowisko. Przyjęty schemat procedury autoryzacji probiotyków w akwakulturze obejmuje badania *in vitro* dotyczące: wytwarzania substancji hamujących, konkurencji o składniki pokarmowe, czynników oporności i zdolności do adhezji oraz badania *in vivo* pod kątem zdolności do kolonizacji przewodu pokarmowego i ewentualnych zmian histopatologicznych.

Kolejny etap badań obejmuje przeprowadzenie eksperymentalnych pasażu przeciwko szczepom patogennym, które ostatecznie decydują o potwierdzeniu właściwości probiotycznych. Probiotyk otrzymany według powyższego schematu przed wprowadzeniem do obrotu musi zostać oficjalnie zarejestrowany, a dodatkowo podmiot ubiegający się o zarejestrowanie przeprowadza analizę opłacalności wytwarzania probiotyku w skali komercyjnej.

Szczepy probiotyczne wykazują różne mechanizmy działania na swego gospodarza – działają antagonistycznie wobec patogenów, zasiedlają powierzchniowo przewodu pokarmowego, zwiększają oporność ryb na choroby, zwiększają efektywność trawienia składników pokarmowych i aktywują układ odpornościowy zwierząt.

Wymienione efekty działania drobnoustrojów probiotycznych są tylko częścią potwierdzonych doświadczalnie ich pozytywnych właściwości. Większość komercyjnych preparatów probiotycznych dla ryb opiera się na wykorzystaniu bakterii z rodzaju *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Yibrio* oraz *Lactobacillus*.

Szczep *Carnobacterium divergens* S1 będący aktywnym składnikiem probiotyku według wynalazku jest przedmiotem zgłoszenia patentowego P.369984 (opubl. 20-03-2006). Zgodnie z wymogami traktatu budapesztańskiego dotyczącego procedur patentowych został on zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2012p.

Bakterie *C. divergens* należą do mikroflory naturalnie występującej w przewodzie pokarmowym ryb. Szczep *C. divergens* S1 jest także składnikiem ekosystemu jelitowego ryb. Został on wyizolowany z przewodu pokarmowego łososia morskiego. Szczegółową charakterystykę gatunku *Carnobacterium divergens* przedstawił Holzapfel i Gerber (1984) oraz Collins i wsp. (1987). Taksonomiczna linia tego gatunku wywodzi się z klasy *Bacilli*, rzędu *Lactobacillales*, rodziny *Carnobacteriaceae* i rodzaju *Carnobacterium*.

Ważną cechą szczepu *C. divergens* S1 jest zdolność syntezy bakteriocyny – diwercyny, która działa bakteriobójczo na chorobotwórcze dla człowieka *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* i *Clostridium*. Nieoczekiwanie stwierdzono, że szczep *C. divergens* S1 wykazuje również aktywność antagonistyczną wobec chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yibrio angillarum* i *Edwardsiella tarda*. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest określana w testach biologicznych, a jej miarą są jednostki aktywności wyrażające odwrotność najniższego stężenia substancji przeciwdrobnoustrojowych działających antagonistycznie na rozwój organizmów patogennych.

W fermowym chowie ryb słodkowodnych to właśnie wymienione bakterie są główną przyczyną śmiertelności narybku. Odkrycie to legło u podstaw niniejszego wynalazku i zostało wykorzystane do opracowania na bazie szczepu *C. divergens* S1 nowego probiotyku. Bakterie, będące aktywnym składnikiem probiotyku według wynalazku w przewodzie pokarmowym ryb słodkowodnych efektywnie wytwarzają kwas mlekowy i bakteriocynopodobne pozakomórkowe metabolity, które wyraźnie ograniczają rozwój bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio angillarum* i *Edwardsiella tarda*. W konsekwencji tego probiotyk według wynalazku zwiększa przeżywalność narybku oraz odporność młodocianych ryb na infekcje bakteryjne, ograniczając tym samym poważne straty jakie następują w obsadach ryb, zwłaszcza w pierwszym roku hodowli. Stosowanie probiotyku według wynalazku wpływa także pozytywnie na efekty produkcyjne chowu ryb: zwiększa dzienne przyrosty masy ciała, poprawia współczynnik wydajności wzrostowej białka oraz obniża współczynnik pokarmowy. Odnotowane korzyści są następstwem kolonizacji jelit przez bakterie *C. divergens* S1 i/lub efektem

działania przeciwdrobnoustrojowego metabolitów tych bakterii. Probiotyk według wynalazku, może być więc stosowany do ochrony ryb słodkowodnych, zwłaszcza narybku przed bakteriami chorobotwórczymi, zwiększenia ich przeżywalności, poprawy tempa wzrostu oraz wykorzystania pasz. Probiotyk zawierający *C. divergens* S1 i/lub ich metabolity może być podawany rybom jako samodzielny preparat. Preparat ten może być wprowadzany bezpośrednio do wody. Może być on również składnikiem pasz, suplementów paszowych i/lub premiksów. Działanie prozdrowotne mają również martwe komórki *C. divergens* S1, które w tym przypadku mogą być traktowane jako naturalny nośnik substancji przeciwdrobnoustrojowych. Substancje te redukują w ekosystemie jelitowym ryb słodkowodnych liczebność chorobotwórczych dla nich bakterii.

W specjalistycznej literaturze naukowej wymienia się gatunek *C. divergens* jako składnik probiotyków dla ryb morskich, głównie łososa atlantyckiego, pstrąga tęczowego i dorsza. Na podstawie wyników testów żywieniowych wskazuje się, że dodatek *C. divergens* do stałej paszy, wyprodukowanej na bazie odpadów rybich z dorsza, redukuje śmiertelność narybku dorsza. Efekt ten jest następstwem działania probiotyku na chorobotwórcze bakterie *Vibrio anguillarum*.

W literaturze krajowej wyniki badań nad wpływem dodatku bakterii *Carnobacterium divergens* do pasz dla karpia opisali badacze z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (Mazurkiewicz i wsp. 2007). Zastosowali oni jednak szczepy bakterii *C. divergens*, które nie miały właściwości probiotycznych, a co za tym idzie nie wykazywały prozdrowotnego działania. Ta sama grupa badawcza testowała również działanie komercyjnego preparatu Biosaf i wykazała, że karpie, którym podawano ten probiotyk miały większe przyrosty masy ciała (Przybył i wsp. 2006). Jak dotąd w literaturze światowej brak jest innych opisów dotyczących produkcji i stosowania w hodowli ryb słodkowodnych probiotyków zawierających *Carnobacterium divergens*. Istnieje natomiast kilka opisów patentowych dotyczących wykorzystania innych mikroorganizmów jako składników probiotyków przeznaczonych dla ryb.

W patencie US 7,708,988 przedstawiono kompozycję probiotyczną oraz opisano jej terapeutyczne zastosowanie. Kompozycja probiotyczna według tego patentu zawierała w swoim składzie bakterie *Bacillus coagulans* i/lub inne bakterie fermentacji mlekowej i była przeznaczona do zwalczania patogenów jelitowych. Zastrzeżono, że składniki mikrobiologiczne, mogą być stosowane jako niezależne preparaty lub w połączeniu z antybiotykami, składnikami fungistatycznymi, anty-drożdżowymi i anty-wirusowymi. Osobnymi zastrzeżeniami objęto także doskonalenie genetyczne posiadanych szczepów bakteryjnych i poszukiwanie nowych szczepów.

Probiotykowi o działaniu prozdrowotnym na ryby jest poświęcony także patent US 6,878,373. Wynalazek ten odnosi się do nowej formuły probiotycznej dla ochrony ryb przed patogenami z rodzaju *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* i *Aeromonas*. Opisuje on metodę kontroli rozwoju bakterii patogennych oraz ograniczania śmiertelności ryb zarówno słodkowodnych, jak i morskich. Zastrzega on ponadto stosowanie opracowanej formuły probiotycznej w celu poprawy stanu higienicznego wody w zbiornikach hodowlanych.

W hiszpańskim patencie 2 216 704 do otrzymania probiotyków zastosowano nowy szczep bakteryjny *Roseobacter* PP-154. Stosowanie probiotyku na jego bazie zmniejszyło śmiertelność narybku ryb, a także małż i krewetek. W patencie zastrzeżono szczep oraz sposób jego wykorzystania do produkcji preparatu bakteryjnego. Zastrzeżono, że preparat jest przeznaczony dla ferm morskich i ma postać liofilizatu, a jego działanie jest konsekwencją aktywności wobec bakterii chorobotwórczych z rodzaju *Vibrio*, *Tenacibaculum maritimum*, *Photobacterium damsela* i *Pseudomonas anguilliseptica*.

W celu kontroli ilości patogenów w przewodzie pokarmowym ryb zastosowano także bakterie *Bacillus coagulans*. Rozwiązanie to jest opisane w patencie US 7,708,988. Dotyczy ono wykorzystania jednego lub więcej szczepów *Bacillus coagulans*. Szczepy te wykazują działanie terapeutyczne. Kolonizują przewód pokarmowy ryb i hamują w nim wzrost mikroorganizmów chorobotwórczych, m. in. patogenów opornych na antybiotyki. Patent ten obejmuje również przeciwdrobnoustrojowe związki wytwarzane przez *Bacillus coagulans*. W ramach niego zastrzeżono także selektywne ulepszanie i izolację bakterii probiotycznych wytwarzających kwas mlekowy oraz przeciwdrobnoustrojowe metabolity.

Jako probiotyk zastosowano także szczep *Bacillus subtilis* VKM B2287 wykazujący zdolność oddziaływania na chorobotwórcze bakterie *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Enterobacteria*, *Citrobacteria* i *Aeromonas*. Zastosowanie to opisano w patencie RU2246537. Na bazie szczepu *B. subtilis* VKM B2287 opracowano profilaktyczny preparat dla zwierząt hodowlanych, drobiu i ryb o nazwie *Subtilis+*.

W patencie RU 2 223 643 C2 opisano z kolei inny probiotyczny szczep *Bacillus subtilis* VKM V-2250 D. Szczep ten wprowadzano do ikry, do młodych larw oraz do paszy dla narybku. Dzięki temu uzyskano lepszą przeżywalność narybku i większą odporność młodych ryb.

W kolejnym patencie RU 2186576 C2, jako aktywny szczep wykorzystano modyfikowane genetycznie bakterie *Bacillus subtilis* VKPM V-4759. Do bakterii tych wklonowano gen kodujący alfa-interferon. Preparat (o nazwie subaline) zawierający tak udoskonalone bakterie podawano rybom wraz z paszą przez 5 dni w dawce 700 bilionów spor na 1 tonę paszy. Dzięki temu poprawiono wygląd skóry i skrzeli ryb, ustabilizowano funkcjonowanie ich przewodu pokarmowego i zredukowano zagrożenie ze strony bakterii patogennych.

Kolejnym probiotykiem opartym na bakteriach z gatunku *Bacillus subtilis* jest preparat opisany w patencie RU 2 376 755. Do jego opracowania wykorzystano szczep *B. subtilis* B-1895. Szczep ten dodawano do wysoko białkowej paszy w ilości 0,05-0,15%, którą następnie wykorzystywano w żywieniu ryb.

W patencie amerykańskim US 6,797,266 zastosowano natomiast probiotyczny szczep *Lactobacillus casei strain* KE01. Preparat na jego bazie ograniczał wzrost enteropatogennych bakterii *Escherichia coli*, *Salmonella enetriditis*, *Yersinia* i *Listeria monocytogenes*. W zastrzeżeniach patentowych podano skład tego preparatu oraz jego przeznaczenie, które obejmowało zwierzęta hodowlane, ptactwo i ryby.

Jedną z form oddziaływania na zdrowie ryb jest też zasilanie wody w zbiornikach hodowlanych w wybrane grupy mikroorganizmów. Aplikację taką opisano w patencie US7736509. Dokładniej, zastrzeżono rozwiązanie polegające na wprowadzaniu do wody probiotycznych bakterii, drożdży, grzybów, dafni, mikroalg, które z jednej strony stanowiły pokarm dla ryb, a z drugiej strony wytrącały zawiesiny zawierające fosforany. Opisy korzystnego wpływu probiotyków na ryby można także znaleźć w literaturze naukowej. Przykładowo, podanie rybom *Epinephelus gigas* (ang. grouper, poi. granik wielki - ryba z rodzaju *Epinephelus*) paszy zawierającej probiotyczny szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* P13 w ilości 10^7 jtk/kg, zwiększyło dzienne przyrosty masy, poprawiło wykorzystanie paszy, pobudziło ich system immunologiczny i zwiększyło odporność (Chiu i wsp. 2010). Podobne zmiany zaobserwowano także po podaniu tej samej rybie paszy zawierającej probiotyczny szczep bakterii *Lactobacillus plantarum* 7-40 (Son i wsp. 2009). W literaturze naukowej opisano także efekty żywienia karpia paszą z dodatkiem szczepu *Lactobacillus acidophilus* LAD oraz drożdży browarnianych *Saccharomyces cerevisiae* SCD. Uzyskano zwiększenie wzrostu narybku i polepszenie składu mikroflory jelitowej (Dhanaraj i wsp. 2010).

Zastosowanie szczepu bakterii *Carnobacterium divergens* oraz jego metabolitów, do wytwarzania probiotyku dla ryb, mięczaków i skorupiaków słodkowodnych do ograniczenia aktywności, wzrostu lub przeżywalności chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio angillarum*, *Edwardsiella Tarda*, polega na tym, że szczep bakterii *Carnobacterium divergens* oraz jego metabolity zdeponowane w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2012p, w ilości co najmniej 10^6 komórek bakterii *C. divergens* S1, najkorzystniej powyżej 10^8 , korzystnie w formie żywej lub martwej i w ilości takiej, że w 1 gramie suchej masy ich ilość przekracza 100 jednostek aktywności przeciwdrobnoustrojowych metabolitów bakterii *C. divergens* S1, korzystnie umieszcza się na nośniku jakim jest piasek i/albo żwir i/albo nośniki organiczne zmieszane ze składnikami paszowymi i/lub pełnoporcjowe mieszanki paszowe lub premiksy, a biomasa jest korzystnie utrwalona metodą suszenia lub zamrażania.

Uzyskany probiotyk jest stosowany, jako środek profilaktyczny, leczniczy lub stymulujący wzrost ryb słodkowodnych, szczególnie narybku karpia, pstrąga tęczowego, suma europejskiego i ryb jesiotrowatych oraz mięczaków i skorupiaków, szczególnie słodkowodnych małż i raków.

Przy czym uzyskany probiotyk można zastosować do obróbki ikry, albo wprowadza się go do basenów hodowlanych, gdzie poprawia stan sanitarny wody.

Korzystnie gdy probiotyk ma postać wybraną spośród: zawiesiny, granulatu, proszku, postać otoczkowaną, żelu, pasty, albo emulsji.

Probiotyk ogranicza aktywność, wzrost lub przeżywalność chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio angillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Listeria monocytogenes* i niektórych *Clostridium* sp.

Probiotyk według wynalazku stosuje się jako środek chroniący przed zakażeniem, środek leczniczy lub stymulujący wzrost ryb słodkowodnych, szczególnie narybku karpia, pstrąga tęczowego, suma europejskiego i ryb jesiotrowatych oraz mięczaków i skorupiaków, szczególnie słodkowodnych małż i raków.

Probiotyk zwiększa przeżywalność narybku oraz juwenilnych form ryb poprzez zwiększanie odporności na infekcje bakteryjne juwenilnych form ryb oraz mięczaków i skorupiaków, przy czym poprawiają się wyniki podchowu ryb oraz wykorzystanie paszy.

Probiotyk obok komórek szczepu bakterii *C. divergens* S1 i/lub ich metabolitów, zawiera inne dopuszczalne składniki, zwłaszcza nośniki lub substancje aktywne biologicznie.

Przy czym w pierwszym korzystnym przykładzie wykonania do sterylnej pożywki ciekłej, umieszczonej w bioreaktorze, wprowadza się inoculum bakterii *Carnobacterium divergens* S1 w ilości 2×10^6 jtk/ml. Proces hodowli bakterii prowadzi się w temp. 36°C przy pH 7,0 utrzymywanym na stałym poziomie przy pomocy NaOH, z łagodnym mieszaniem pożywki. Hodowlę prowadzi się przez 20 godzin. Następnie separuje się komórki bakteryjne poprzez ich odwirowanie przy 5.000 obr/min przez 15 minut. Zawiesinę komórek wprowadza się do roztworu zawierającego zagęszczoną pożywkę hodowlaną, pozbawioną soli mineralnych, o ciśnieniu osmotycznym na poziomie 1500 mOsm/kg, którą następnie inkubuje się przez 45 minut przy łagodnym mieszaniu w temperaturze 28°C , celem zwiększenia przeżywalności komórek w czasie suszenia. Następnie komórki odwirowuje się i inkubuje w roztworze, do którego dodaje się maltodekstrynę, białko mleka, kwas askorbinowy i dwutlenek krzemu. Całość miesza się i suszy w suszarni rozpyłowej otrzymując preparat probiotyczny w formie sproszkowanej i otoczkowanej, zawierający 10^8 jtk/g. Preparat ten wprowadza się do paszy wykonanej metodą prasowania wysokociśnieniowego w takiej ilości, aby w 1 gramie finalnej paszy liczebność probiotycznych bakterii wynosiła 10^6 jtk. Probiotyczną paszą karmi się narybek karpia *Cyprinus carpio*. W testach klinicznych i hodowlanych stwierdzono, że przeżywalność karpia w wodzie skażonej *Aeromonas hydrophila* i *Vibrio angillarum* wzrosła o 80%, a dzienne przyrosty były większe o 18%.

W drugim korzystnym przykładzie wykonania szczep bakterii *Carnobacterium divergens* S1 wprowadza się do pożywki zawierającej sacharozę, hydrolizat mąki kukurydzianej, pepton kazeinowy, ekstrakt drożdżowy i zestaw soli mineralnych w ilości 10^4 jtk/ml. Przy czym uprzednio pożywkę sterylizuje się w bioreaktorze w 121°C przez 15 min i schładza do 30°C . Proces hodowli bakterii prowadzi się w temp. 30°C przy pH 6,7, utrzymywanym przy pomocy $\text{Ca}(\text{OH})_2$, przy łagodnym mieszaniu pożywki. Hodowlę prowadzono przez 18 godzin. Następnie prowadzi się separację komórek bakteryjnych przy użyciu mikrofiltra membranowego o porowatości 0,45 μm metodą filtracji krzyżowej. Zawiesinę komórek miesza się z czynnikami kriochronnymi i suszy metodą liofilizacji. W wyniku suszenia otrzymuje się preparat probiotyczny w formie sproszkowanej, zawierający 3×10^9 jtk/g. Preparat ten wprowadza się do mieszanki paszowej w takiej ilości, aby w gotowej paszy liczebność probiotycznych bakterii wynosiła 7×10^8 jtk/g. Paszę prasuje się wysokociśnieniowo, a po wysuszeniu granulata pokrywa się filmem hydrofobowym składającym się z mieszaniny olejów: rybnego i rzepakowego w proporcji 50:50. Tak przygotowaną paszą probiotyczną karmi się narybek pstrąga tęczowego *Oncorhynchus mykiss*. W testach klinicznych i hodowlanych stwierdzono, że przeżywalność pstrągów w wodzie skażonej bakteriami *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda* i *Vibrio angillarum* wzrosła o 60%, a dzienne przyrosty narybku były większe o 15%.

W trzecim korzystnym przykładzie wykonania szczep bakterii *Carnobacterium divergens* S1 wprowadza się do sterylnej pożywki ¹A MRS wzbogaconej w hydrolizat enzymatyczny mąki żytniej w ilości 10^6 jtk/ml. Pożywkę uprzednio sterylizuje się przez filtrację w mikrofiltrze membranowym o porowatości 0,45 μm i wprowadza się ją do bioreaktora wysterylizowanego parą wodną. Proces hodowli bakterii prowadzi się w temp. 30°C przy pH 7,0 z korektą pH przy pomocy NaOH, przy łagodnym mieszaniu pożywki. Hodowlę prowadzi się przez 15 godzin, po czym kulturę bakteryjną razem z odfermentowaną pożywką zagęszcza się na mikrofiltrze membranowym redukując objętość o 60% w stosunku do objętości początkowej. Uzyskana gęstość bakteryjna zawiera 7×10^9 komórek/ml. Następnie gęstwą komórkową razem z odfermentowaną pożywką natryskuje się na wysuszoną paszę granulowaną w proporcji gęstości komórkowej do suchej paszy, jak 1:5. Po dokładnym wymieszaniu paszę dosusza się metodą konwekcyjną powietrzem o temperaturze nieprzekraczającej 50°C , po czym granulata natłuszcza się olejem rybnym w ilości 2% masy paszy w procesie natłuszczenia ciśnieniowego. Analiza wykazała, że tak przygotowana pasza zawierała 8×10^6 jtk/g oraz miała aktywność przeciwko patogennym bakteriom *Aeromonas hydrophila* na poziomie 150 jednostek aktywności/g. Gotową paszą karmi się narybek sterleta *Acipenser ruthenus* i jesiotra syberyjskiego *Acipenser baeri*. W testach klinicznych i hodowlanych stwierdzono, że w wyniku podawania paszy probiotycznej zwiększyła się przeżywalność narybku oraz poprawiło wykorzystanie paszy.

W czwartym korzystnym przykładzie wykonania wysterylizowaną pożywkę zawierającą sacharydy, aminokwasy, peptony, ekstrakt drożdżowy i sole mineralne szczepi się kulturą *Carnobacterium divergens* S1 w ilości 4×10^6 jtk/ml i hoduje się przy ciągłym mieszaniu w temperaturze 32°C przez 18 godzin, korygując pH pożywki za pomocą węgla wapnia (sproszkowanej kredy). Po zakończeniu hodowli całą pożywkę wraz z bakteriami zagęszcza się przez mikrofiltrację membranową, dodaje się

mączkę rybną, rozdrobnioną śrutę sojową, rozdrobnioną śrutę rzepakową, mąkę pszenną, zestaw witamin i kwas askorbinowy, a następnie całość dokładnie miesza się w mieszalniku kubicznym. Tak przygotowany roztwór poddaje się suszeniu w suszarni fluidyzacyjnej wyposażonej w granulador. W ten sposób uzyskuje się granulowany preparat zawierający $2,3 \times 10^7$ komórek/g, który bezpośrednio podaje się narybkowi jesiotra rosyjskiego *Acipenser gueldenstaedti*. W wyniku jego stosowania zwiększono przeżywalność narybku oraz przyspieszono wzrost ryb.

W piątym korzystnym przykładzie wykonania w sterylnej pożywce ciekłej hoduje się probiotyczny szczep bakterii *Carnobacterium divergens* S1. Pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu pożywkę poddaje się wirowaniu przy 6.000 obr/min przez 15 minut i uzyskuje się pastę bakteryjną zawierającą 10^9 bakterii/g. Pastę tę przechowuje się w chłodni w 4°C przez trzy dni, po czym sporządza się zawiesinę komórkową i miesza się ją z zapłodnioną i pozbawioną kleistości ikrą szczupaka *Esox lucius* w takiej ilości aby mieszanina z ikrą zawierała 3×10^8 jtk/ml. Pastę bakteryjną miesza się z ikrą szczupaka także w trakcie jej inkubacji w odstępach dwudniowych. W wyniku tego działania wykazano, że ilość żywego wylęgu pozyskanego tą metodą w stosunku do wylęgu pozyskanego z ikry nieobrabianej bakteriami była istotnie większa.

W szóstym przykładzie wykonania w sterylnej pożywce ciekłej hoduje się probiotyczny szczep bakterii *Carnobacterium divergens* S1, a po zakończeniu hodowli, po upływie 24 godzin, komórki wiruje się przy 4.000 obr/min przez 10 minut i uzyskaną gęstwą komórkową miesza się z piaskiem i żwirem. Po upływie 6 godzin piasek i żwir z zaadsorbowanymi bakteriami umieszcza się na dnie zbiornika hodowlanego dla dwóch gatunków małży: szczeżui pospolitej *Anodonta anatina* i szczeżui spłaszczonej *Pseudoanodonta complanata*. W testach klinicznych i hodowlanych stwierdzono, że w wyniku takiego działania zwiększyła się przeżywalność małży słodkowodnych.

W siódmym korzystnym przykładzie wykonania w sterylnej pożywce ciekłej hoduje się probiotyczny szczep bakterii *Carnobacterium divergens* S1, a po zakończeniu hodowli, po upływie 24 godzin, komórki wiruje się przy 4.000 obr/min przez 10 minut i uzyskaną gęstwą komórkową wprowadza się bezpośrednio do wody. W testach klinicznych i hodowlanych stwierdzono, że w zbiorniku hodowlanym znacznie poprawił się stan sanitarny wody.

Większość probiotyków opisanych w literaturze oraz będących przedmiotem zgłoszeń patentowych jest przeznaczonych dla ryb morskich. Hodowla ryb słodkowodnych z uwagi na ograniczoną objętość zbiorników wodnych jest natomiast dużo trudniejsza. Wiąże się ona z wieloma problemami natury sanitarno-higienicznej. Duże skażenie zbiorników hodowlanych mikroorganizmami patogennymi powoduje znaczne straty, szczególnie w narybku, który jest wyjątkowo wrażliwy, oraz dodatkowo spowalnia wzrost ryb. Te niekorzystne zjawiska mogą być wyeliminowane lub ograniczone poprzez stosowanie preparatów probiotycznych.

Niniejszy wynalazek ma więc głębokie uzasadnienie praktyczne. Wpisuje się on w pełni w strategię poprawy efektywności chowu, zdrowotności i dobrostanu ryb.

Probiotyk o składzie według wynalazku może być wprowadzany bezpośrednio lub za pośrednictwem różnych nośników do pasz dla ryb i do wody i spełnia wszystkie kryteria stawiane preparatom bakteryjnym:

- jest zdolny do natychmiastowej inplantacji w przewodzie pokarmowym,
- kolonizuje przewód pokarmowy poprzez zasiedlanie kosmków jelitowych i ścian przewodu pokarmowego lub może być zdolny do wzrostu bezpośrednio w treści pokarmowej,
- konkuruje z bakteriami patogennymi i syntetyzuje substancje antagonistyczne – bakteriocyny,
- utrzymuje pH w przewodzie pokarmowym na optymalnym poziomie,
- jest odporny na podwyższoną temperaturę stosowaną w technologii produkcji pasz.

Wynalazek opisany jest szczegółowo w poniższych przykładach, które jednak nie wyczerpują wszystkich jego możliwości realizacyjnych.

P r z y k ł a d 1

Zastosowanie szczepu bakterii *Carnobacterium divergens* oraz jego metabolitów, do wytwarzania probiotyku dla ryb, mięczaków i skorupiaków słodkowodnych do ograniczenia aktywności, wzrostu lub przeżywalności chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio angillarum*, *Edwardsiella Tarda*, jakie polega na tym, że szczep bakterii *Carnobacterium divergens* zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2012p, w ilości 10^8 jtk/g, wprowadza się do sterylnej pożywki ciekłej umieszczonej w bioreaktorze, wprowadzono inoculum bakterii *Carnobacterium divergens* S1 w ilości 2×10^6 jtk/ml. Proces hodowli bakterii przebiegał w temp. 36°C przy pH 7,0 utrzymywanym na

stałym poziomie przy pomocy NaOH, z łagodnym mieszaniem pożywki. Hodowlę prowadzono przez 20 godzin. Następnie przeprowadzono separację komórek bakteryjnych poprzez ich odwirowanie przy 5.000 obr/min przez 15 minut. Zawiesinę komórek wprowadzono do roztworu zawierającego zagęszczoną pożywkę hodowlaną, pozbawioną soli mineralnych, o ciśnieniu osmotycznym na poziomie 1500 mOsm/kg, którą następnie inkubowano przez 45 minut przy łagodnym mieszaniu w temperaturze 28°C, celem zwiększenia przeżywalności komórek w czasie suszenia. Następnie komórki odwirowano i inkubowano w roztworze, do którego dodano maltodekstrynę, białko mleka, kwas askorbinowy i dwutlenek krzemu. Całość dobrze wymieszano i wysuszono w suszarni rozpyłowej. W wyniku suszenia otrzymano preparat probiotyczny w formie sproszkowanej i otoczkowanej, zawierający 10^8 jtk/g. Preparat ten wprowadzono do paszy wykonanej metodą prasowania wysokociśnieniowego w takiej ilości, aby w 1 gramie finalnej paszy liczebność probiotycznych bakterii wynosiła 10^6 jtk. Probiotyczną paszą stymulującą wzrost ryb słodkowodnych karmiono narybek karpia *Cyprinus carpio*. Stwierdzono, że przeżywalność karpia w wodzie skażonej *Aeromonas hydrophila* i *Vibrio anguillarum* wzrosła o 80%, a dzienne przyrosty były większe o 18%.

Przykład 2

Zastosowanie szczepu bakterii *Carnobacterium divergens* oraz jego metabolitów, do wytwarzania probiotyku dla ryb, mięczaków i skorupiaków słodkowodnych do ograniczenia aktywności, wzrostu lub przeżywalności chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella Tarda*, jakie polega na tym, że szczep bakterii *Carnobacterium divergens* zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2012p, wprowadza się w ilości 10^4 jtk/ml do pożywki zawierającej sacharozę, hydrolizat mąki kukurydzianej, pepton kazeinowy, ekstrakt drożdżowy i zestaw soli mineralnych. Pożywka ta była uprzednio sterylizowana w bioreaktorze w 121°C przez 15 min i schłodzona do 30°C.

Proces hodowli bakterii przebiegał w temp. 30°C przy pH 6,7, utrzymywanym przy pomocy $\text{Ca}(\text{OH})_2$, przy łagodnym mieszaniu pożywki. Hodowlę prowadzono przez 18 godzin. Następnie przeprowadzono separację komórek bakteryjnych przy użyciu mikrofiltra membranowego o porowatości 0,45 µm metodą filtracji krzyżowej. Zawiesinę komórek mieszano z czynnikami krioochronnymi i suszono metodą liofilizacji. W wyniku suszenia otrzymano preparat probiotyczny w formie sproszkowanej, zawierający 3×10^9 jtk/g. Preparat ten wprowadzono do mieszanki paszowej w takiej ilości, aby w gotowej paszy liczebność probiotycznych bakterii wynosiła 7×10^8 jtk/g. Paszę upostaciowano w procesie prasowania wysokociśnieniowego, a po wysuszeniu granulaty pokryto filmem hydrofobowym składającym się z mieszaniny olejów: rybnego i rzepakowego w proporcji 50:50. Tak przygotowaną paszą probiotyczną o działaniu profilaktycznym karmiono narybek pstrąga tęczowego *Oncorhynchus mykiss*. Stwierdzono, że przeżywalność pstrągów w wodzie skażonej bakteriami *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda* i *Vibrio anguillarum* wzrosła o 60%, a dzienne przyrosty narybku były większe o 15%.

Przykład 3

Zastosowanie szczepu bakterii *Carnobacterium divergens* oraz jego metabolitów, do wytwarzania probiotyku dla ryb, mięczaków i skorupiaków słodkowodnych do ograniczenia aktywności, wzrostu lub przeżywalności chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella Tarda*, jakie polega na tym, że szczep bakterii *Carnobacterium divergens* zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2012p, w ilości 10^6 jtk/ml wprowadza się do sterylnej pożywki ½ MRS wzbogaconej w hydrolizat enzymatyczny mąki żytniej. Pożywka ta była uprzednio sterylizowana przez filtrację w mikrofiltrze membranowym o porowatości 0,45 µm i wprowadzona do bioreaktora wysterylizowanego parą wodną. Proces hodowli bakterii przebiegał w temp. 30°C przy pH 7,0 z korektą pH przy pomocy NaOH, przy łagodnym mieszaniu pożywki. Hodowlę prowadzono przez 15 godzin, po czym kulturę bakteryjną razem z odfermentowaną pożywką zagęszczoną na mikrofiltrze membranowym redukując objętość o 60% w stosunku do objętości początkowej. Uzyskana gęstość bakteryjna zawierała 7×10^9 komórek/ml. Następnie gęstwę komórkową razem z odfermentowaną pożywką natryskiwano na wysuszoną paszę granulowaną w proporcji gęstwy komórkowej do suchej paszy, jak 1:5. Po dokładnym wymieszaniu paszę dosuszano metodą konwekcyjną powietrzem o temperaturze nieprzekraczającej 50°C, po czym granulaty natłuszczono olejem rybnym w ilości 2% masy paszy w procesie natłuszczania ciśnieniowego. Analiza wykazała, że tak przygotowana pasza zawierała 8×10^6 jtk/g oraz miała aktywność przeciwko patogennym bakteriom *Aeromonas hydrophila* na poziomie 150 jednostek aktywności/g. Gotową paszą karmiono narybek sterleta *Acipenser ruthenus* i jesiotra syberyjskiego

Acipenser baeri w celu poprawy wyników howu. Badania wykazały, że w wyniku podawania paszy probiotycznej zwiększyła się przeżywalność narybku oraz poprawiło wykorzystanie paszy.

Przykład 4

Zastosowanie szczepu bakterii *Carnobacterium divergens* oraz jego metabolitów, do wytwarzania probiotyku dla ryb, mięczaków i skorupiaków słodkowodnych do ograniczenia aktywności, wzrostu lub przeżywalności chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio angillarum*, *Edwardsiella Tarda*, jakie polega na tym, że szczep bakterii *Carnobacterium divergens* zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2012p, w ilości 4×10^6 jtk/ml dodano do sterylizowanej pożywki zawierającej sacharydy, aminokwasy, peptony, ekstrakt drożdżowy i sole mineralne i hodowano przy ciągłym mieszaniu w temperaturze 32°C przez 18 godzin, korygując pH pożywki za pomocą węgla wapnia (sproszkowanej kredy). Po zakończeniu hodowli całą pożywkę wraz z bakteriami zagęszczano przez mikrofiltrację membranową, dodawano mączkę rybną, rozdrobnioną śrutę sojową, rozdrobnioną śrutę rzepakową, mąkę pszenną, zestaw witamin i kwas askorbinowy, a następnie całość dokładnie wymieszano w mieszalniku kubicznym. Tak przygotowany roztwór poddawano suszeniu w suszarni fluidyzacyjnej wyposażonej w granulator. W ten sposób uzyskano granulowany preparat zawierający $2,3 \times 10^7$ komórek/g, który bezpośrednio podawano narybkowi jesiotra rosyjskiego *Acipenser gueldenstaedti*. W wyniku jego stosowania zwiększono przeżywalność narybku oraz przyspieszono wzrost ryb.

Przykład 5

Zastosowanie szczepu bakterii *Carnobacterium divergens* oraz jego metabolitów, do wytwarzania probiotyku dla ryb, mięczaków i skorupiaków słodkowodnych do ograniczenia aktywności, wzrostu lub przeżywalności chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio angillarum*, *Edwardsiella Tarda*, jakie polega na tym, że szczep bakterii *Carnobacterium divergens* zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2012p, hoduje się w sterylnej pożywce ciekłej. Pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu pożywkę poddawano wirowaniu przy 6.000 obr/min przez 15 minut uzyskując pastę bakteryjną zawierającą 10^9 bakterii/g. Pastę tę przechowywano w chłodni w 4°C przez trzy dni, po czym sporządzano zawiesinę komórkową i mieszano ją z zapłodnioną i pozbawioną kleistości ikrą szczupaka *Esox lucius* w takiej ilości, aby mieszanina z ikrą zawierała 3×10^8 jtk/ml. Pastę bakteryjną mieszano z ikrą szczupaka także w trakcie jej inkubacji w odstępach dwudniowych uzyskując formę żelu. W wyniku tego działania wykazano, że ilość żywego wylęgu pozyskanego tą metodą w stosunku do wylęgu pozyskanego z ikry nieobrabianej bakteriami była istotnie większa.

Przykład 6

Zastosowanie szczepu bakterii *Carnobacterium divergens* oraz jego metabolitów, do wytwarzania probiotyku dla ryb, mięczaków i skorupiaków słodkowodnych do ograniczenia aktywności, wzrostu lub przeżywalności chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio angillarum*, *Edwardsiella Tarda*, jakie polega na tym, że szczep bakterii *Carnobacterium divergens* zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2012p, hoduje się w sterylnej pożywce ciekłej, a po zakończeniu hodowli, co miało miejsce po upływie 24 godzin, komórki wirowano przy 4.000 obr/min przez 10 minut i uzyskaną gęstwą komórkową mieszano z piaskiem i żwirem. Po upływie 6 godzin piasek i żwir z zaadsorbowanymi bakteriami umieszczano na dnie zbiornika hodowlanego dla dwóch gatunków małży: szczeciui pospolitej *Anodonta anatina* i szczeciui spłaszczonej *Pseudoanodonta complanata*. Wykazano, że w wyniku takiego działania zwiększyła się przeżywalność małży słodkowodnych.

Przykład 7

Zastosowanie szczepu bakterii *Carnobacterium divergens* oraz jego metabolitów, do wytwarzania probiotyku dla ryb, mięczaków i skorupiaków słodkowodnych do ograniczenia aktywności, wzrostu lub przeżywalności chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio angillarum*, *Edwardsiella Tarda*, jakie polega na tym, że szczep bakterii *Carnobacterium divergens* zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2012p, hodowano w sterylnej pożywce ciekłej, a po zakończeniu hodowli, co miało miejsce po upływie 24 godzin, komórki wirowano przy 4.000 obr/min przez 10 minut i uzyskaną gęstwą komórkową wprowadzano bezpośrednio do wody, mieszając część gęstwy z olejem rzepakowym do formy emulsji. Badania wykazały, że w zbiorniku hodowlanym znacznie poprawił się stan sanitarny wody.

Literatura

1. Balcazar J.L. 2003. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador.
2. Balcazar J.L., de Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Vendrell D., Muzaquiz J.L. 2004. Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. *J. Aquacult. Trop.* 19, 239–242.
3. Chiu C-H., Cheng C-H., Gua W-R., Guu Y-K., Cheng W., 2010. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* PI 3, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunology* 29, 1053–1059.
4. Collins M.D, Farrow J.A.E., Phillips B.A, Feresu S., Jones D, 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 310–316.
5. Dali W., Moriarty D.J.W. 1983. Functional aspects of nutrition and digestion. In: Mantel L.H. (Ed.) *The biology of crustacean*, vol. 5, Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press.
6. Dalmin G., Kathiresan K., Purushothaman A. 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J. Exp. Boil.* 39, 939–942.
7. Dhanaraj M., Haniffa M.A., Arun Singh S.V., Arockiaraj A.J., Ramakrishnan C.M., Seetharaman S., Arthimanju R. 2010. Effect of probiotics on growth performance of koi carp (*Cyprinus carpio*). *J. Appl. Aquacult.* 22, 202–209.
8. Direkbusarakom S., Yoshimizu M., Ezura Y., Ruangpan L., Danayadol Y. 1998. *Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. *J. Mar. Biotechnol.* 6, 266–267.
9. FAO/WHO, 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina.
10. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378.
11. Gatesoupe F.J., Zambonino Infante J.L., Cahu C., Quazuguel P. 1997. Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrac*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture* 158, 117–127.
12. Gildberg A., Mikkelsen H., Sandaker E., Ringo E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia* 352, 279–285.
13. Girones R., Jofre J.T., Bosh A. 1989. Isolation of marine bacteria with antiviral properties. *Can. J. Microbiol.* 35, 1015–1021.
14. Hamid A., Sakata T., Kakimoto D. 1978. Microflora in the alimentary tract of grey mullet: 2. A comparison of the mullet intestinal microflora in fresh and sea water. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44, 53–57.
15. Holzapfel WH., Gerber ES, 1984. *Lactobacillus divergens* sp. nov., a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L(+)-lactate. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 522–534.
16. Kamei Y., Yoshimizu M., Ezura Y., Kimura T. 1988. Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. *Microbiol. Immunol.* 32, 67–73.
17. Mazurkiewicz J., Przybył A., Sip A., Grajek W., 2007. Effect of *Carnobacterium divergens* and *Enterococcus hirae* as probiotic bacteria in feed for Common carp, *Cyprinus carpio* L. *Arch. Pol. Fish* 15, 79–92.
18. Nikoskelainen S., Ouwehand A., Bylund G., Salminen S., Lilius E.M. 2001. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.* 15, 443–452.
19. Parker R.B. 1974. Probiotics. The other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health.* 29: 4–8.
20. Przybył A., Mazurkiewicz J., Rożek W., 2006. Zastosowanie probiotyków i prebiotyków w żywieniu karpia. *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna* 11 (1), 65–70.
21. Ringo E., Gatesoupe F.-J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 177–203.
22. Ringo E., Strom E., Tabacheck J. 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquacult. Res.* 26, 773–789.
23. Robertson R, ODowd C., Burrells C., Williams R, Austin B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture* 185, 235–243.

24. Sakai M., Yoshida T., Astuta S., Kobayashi M. 1995. Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) by oral administration of *Clostridium butyricum* bacteria. *J. Fish. Dis.* 18, 187–190.
25. Sakata T. 1990. Microflora in the digestive tract of fish and self-fish. In: Lesel R. (Ed.), *Microbiology in Poecilotherms*, pp. 171–176. Elsevier, Amsterdam.
26. Seeto G.S., Ververs P.C., Clements K.D., Slaytor M. 1996. Carbohydrate utilisation by microbial symbionts in the marine herbivorous fishes *Odax exanomelas* and *Crinodus lophodon*. *J. Comp. Physiol.* 165B, 571–579.
27. Son V.M., Chang C-C., Wu M-C., Guu Y-K., Chiu C-H., 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunology* 26, 691–698.
28. Strand H.K., Dalmo R.A. 1997. Absorption of immunomodulating p(1,3)-glucan in yolk sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish Disease.* 20, 41–49.
29. Strom E., Ringo E. 1993. Changes in bacterial flora in developing cod, *Gadus morhua* (L.), larvae after inoculation of *Lactobacillus plantarum* in the water.
30. Sugita H., Miyajima C., Deguchi Y. 1991. The vitamin B₁₂-producing ability of the intestinal microflora of the river fish. *Aquaculture* 92, 267–276.
31. Sugita H., Shibuya K., Shimooka H., Deguchi Y. 1996. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture* 145, 195–203.
32. Vine N.G., Leukes W.D., Kaiser H. 2004. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus.
33. *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 145–152.
34. Wang X., Li H., Zhang X., Li Y., Ji W., Xu H. 2000. Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). *J. Ocean. Univ. Qingdao* 30, 493–498.
35. Watanabe K., Sezaki K., Yazawa K., Hino A. 1992. Nutritive fortification of the rotifer *Brachionus plicatilis* with eicosapentaenoic acid-producing bacteria. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 271–276.

Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie szczepu bakterii *Carnobacterium divergens* oraz jego metabolitów, zdeponowanego w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2012p, do wytwarzania probiotyku dla ryb, mięczaków i skorupiaków słodkowodnych do ograniczenia aktywności, wzrostu lub przeżywalności chorobotwórczych bakterii *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio angillarum*, *Edwardsiella Tarda*, przy czym probiotyk zawiera szczep *Carnobacterium divergens* i/lub jego metabolity, w ilości co najmniej 10^6 komórek bakterii *C. divergens* S1, najkorzystniej powyżej 10^8 .

2. Zastosowanie według zastr. 1, **znamiennie tym**, że bakterie *Carnobacterium divergens* i/lub jego metabolity zawarte w probiotyku są w formie żywej lub martwej i w ilości takiej, że w 1 gramie suchej masy ich ilość przekracza 100 jednostek aktywności przeciwdrobnoustrojowych metabolitów bakterii *C. divergens* S1.

3. Zastosowanie według zastr. 1 albo 2, **znamiennie tym**, że bakterie *Carnobacterium divergens* i/lub jego metabolity umieszczone są na nośniku jakim jest piasek i/albo żwir i/albo nośniki organiczne zmieszane ze składnikami paszowymi i/lub pełnoporcjowe mieszanki paszowe lub premiksi, a biomasa jest utrwalona metodą suszenia lub zamrażania.

4. Zastosowanie według zastr. 3, **znamiennie tym**, że uzyskany probiotyk jest stosowany, jako środek profilaktyczny, leczniczy lub stymulujący wzrost ryb słodkowodnych, szczególnie narybku karpia, pstrąga tęczowego, suma europejskiego i ryb jesiotrowatych oraz mięczaków i skorupiaków, szczególnie słodkowodnych małż i raków.

5. Zastosowanie według zastr. 1 albo 2, albo 3, albo 4, **znamiennie tym**, że probiotyk stosuje się do obróbki ikry.

6. Zastosowanie według zastr. 1 albo 2, albo 3, albo 4, albo 5, **znamiennie tym**, że stosowany probiotyk ma postać zawiesiny.

7. Zastosowanie według zastr. 1 albo 2, albo 3, albo 4, albo 5, **znamiennie tym**, że stosowany probiotyk ma postać granulatu.

8. Zastosowanie według zastrz. 1 albo 2, albo 3, albo 4, albo 5, **znamiennie tym**, że stosowany probiotyk ma postać proszku.

9. Zastosowanie według zastrz. 1 albo 2, albo 3, albo 4, albo 5, **znamiennie tym**, że stosowany probiotyk ma postać otoczkowaną.

10. Zastosowanie według zastrz. 1 albo 2, albo 3, albo 4, albo 5, **znamiennie tym**, że stosowany probiotyk ma postać żelu.

11. Zastosowanie według zastrz. 1 albo 2, albo 3, albo 4, albo 5, **znamiennie tym**, że stosowany probiotyk ma postać pasty.

12. Zastosowanie według zastrz. 1 albo 2, albo 3, albo 4, albo 5, **znamiennie tym**, że stosowany probiotyk ma postać emulsji.