

На правах рукописи

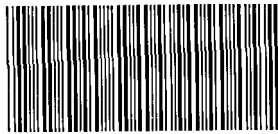
САТТОРОВ НОСИРЧОН РАСУЛОВИЧ

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА
ПРОБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ *VACILLUS SUBTILIS*
И ИХ ЭФФЕКТИВНОСТЬ
ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЭНТЕРИТАХ ТЕЛЯТ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук



005061652

13 ИЮН 2013

Казань – 2013

Работа выполнена в Таджикском аграрном университете им. Ш. Шотемура (ТАУ) и в Сумском национальном аграрном университете (СНАУ, Республика Украина).

Научный консультант: доктор ветеринарных наук, академик
Саттори И.

Официальные оппоненты: - Тремасов М. Я. - доктор биологических наук, профессор, зав. отделом токсикологии Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности;

- Девришов Д.А. - доктор биологических наук, профессор, проректор по инновационным технологиям, зав. кафедрой иммунологии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина;

- Зухрабов М.Г. - доктор ветеринарных наук, профессор, зав. кафедрой терапии и клинической диагностики с рентгенологией Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана.

Ведущая организация: Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов.

Защита диссертации состоится «03» июля 2013 г. в 10⁰⁰ ч на заседании диссертационного совета Д-220.012.01 при ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (420075, Казань, Научный городок-2, ФГБУ «ФЦТРЕ-ВНИВИ»).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ФЦТРЕ-ВНИВИ» (Казань).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2013 г. и размещен на официальном сайте ФГБУ «ФЦТРЕ-ВНИВИ» www.vnivi.ru и на официальном сайте ВАК РФ www.vak2.ed.gov.ru.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук

 Степанов В.И.

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В ветеринарной медицине при терапии и профилактике инфекционных болезней и стресса широко используют пробиотики – препараты, в состав которых входят живые микроорганизмы – естественные обитатели организма животных или сапрофиты, обитающие во внешней среде. Пробиотические препараты безвредны, являются экологически чистыми и не имеют противопоказаний для применения, могут стать альтернативой антибиотикам (Коршунов В.М. и др., 1996; Шендеров Б.А. и др., 1997; Тремасов М.Я. и др., 1997; Девришов Д.А. и др., 1998; Запруднов А.М. и др., 1999; Сатори И., 2000; Парникова С.И., 2002; Панин А.Н., Малик Н.И., 2004; Пестова Л.В. и др., 2006).

Совокупность свойств, реализованных в фенотипе бактерий-компонентов пробиотиков, а также биологически активных продуктов их метаболизма обуславливает спектр и выраженность лечебно-профилактической эффективности конкретного пробиотика, что определяет выбор наиболее активных бактерий-продуцентов (Ноздрин Г.А. и др., 1992; Бусол В.О. и др., 1995; Наумов М.М. и др., 2000; Папуниди К.Х., 2006).

В качестве основы для разработки лечебно-профилактических препаратов, перспективных для использования в ветеринарии, привлекают внимание исследователей экологически чистые живые культуры спорообразующих аэробных бактерий из рода *Bacillus*, что наряду с их полной безвредностью обусловлено высокой антагонистической активностью этих культур в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, продукцией БАВ. Бактерии рода *Bacillus* широко применяются для производства ферментов, биопрепаратов, средств защиты растений и т.п. (Антипов В.А., 1991; Кашин А.С., 2002; Матросова Л.Е., 2010).

Способность к росту на простых по составу и недорогих средах, высокий выход готового продукта, стабильность при хранении штаммов *Bacillus* делают их технологичными и позволяют создавать высокоэффективные технологии (Коляков Я.Е., 1970; Кашперова Т.А., 2005).

Для более длительного сохранения физико-химических и лечебных свойств пробиотика выпускают в основном в лиофилизированном виде в герметичных ампулах и флаконах. Однако наряду с известными достоинствами такие лекарственные формы пробиотиков не лишены и определенных недостатков: высокие затраты на индивидуальную и транспортную тару; наличие определенных технологических и иных ограничений, приводящих к нерациональному использованию ампул (флаконов) и относительно высокому проценту их выбраковки при производстве и контроле качества; специфические условия применения, отличающиеся рядом особенностей и др. (Вершинина И.Ю. и др., 1994; Ермолин А.В. и др., 1996; Пылаев С.А., 2001; Алтухов Ю.П. и др., 2002; Garber L.P. et al., 1995).

Большинство недостатков, свойственных производству пробиотиков в ампулах или флаконах, исключит серийный выпуск пробиотиков в порошках, жидкой, таблеточной и других лекарственных формах (ЛФ), улакованных во

вещающие большое количество доз емкости, что позволит применять эти препараты для терапии и профилактики инфекционных заболеваний разных видов сельскохозяйственных животных и птиц (DeSimone C. et al., 1995).

Применение пробиотических препаратов различного видового состава при выращивании молодняка животных снижает заболеваемость инфекционными желудочно-кишечными болезнями, повышает естественную резистентность молодняка и сохранность, корректирует кишечный биоценоз, стимулирует откорм, сокращает продолжительность выращивания, уменьшает затраты кормов (Пылаев С.А., 2001; Алтухов Ю.П. и др., 2002; Парникова С.И., 2002; Кашперова Т.А., 2005; Пестова Л.В. и др., 2006; Иванов А.В., 2012).

Из вышеизложенного очевидно актуальная необходимость изыскание эффективных штаммов *Bac. subtilis* для изготовления пробиотиков в различных лекарственных формах и изучения их свойств.

Целью исследования явились разработка технологии производства пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* и изучение их эффективности при инфекционных энтеритах телят.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить эпизоотическую ситуацию по инфекционным энтеритам телят в хозяйствах Республики Таджикистан и северо-восточного региона Украины.
2. Отобрать и изучить морфологические, культуральные, биохимические, физиолого-биологические свойства, патогенность и антагонистическую активность штаммов *Bac. subtilis* для производства на их основе пробиотиков.
3. Изыскать эффективную питательную среду для культивирования *Bac. subtilis*.
4. Совершенствовать технологию сушки биомассы *Bac. subtilis* контактно-сорбционным методом.
5. Разработать технологию изготовления пробиотических препаратов. Субтилбен и Лаксубтил и исследовать их свойства.
6. Изучить эффективность пробиотических препаратов Субтилбен и Лаксубтил при профилактике и лечении инфекционных энтеритов телят.
7. Разработать нормативно-техническую документацию на пробиотики Субтилбен и Лаксубтил и внедрить их в ветеринарную практику.

Научная новизна. Впервые в результате эпизоотологического мониторинга в животноводческих хозяйствах Северного, Центрального и Южного Таджикистана и северо-восточного региона Украины определена роль патогенных микроорганизмов в возникновении инфекционных энтеритов молодняка КРС.

Установлено, что инфекционные энтериты телят чаще всего вызываются бактериальной флорой, которая циркулирует в хозяйствах и выделяется от коров больных эндометритами, маститами и коров-бактерионосителей. Чаще всего этиологическим фактором этих заболеваний являлись *E. coli*, *S. dublin*, *Pr. vulgaris*.

Для производства пробиотиков на основе *Bac. subtilis* отобраны наиболее перспективные непатогенные штаммы BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, проявляющие antimicrobные свойства в отношении тест-культур микроорганизмов в низких концентрациях (3,9 – 31,2 млн м.к./мл) и характеризующиеся ти-

пичными для *Vac. subtilis* физиолого-биологическими свойствами, которые обуславливают более широкий диапазон действия при сочетанном применении этих штаммов.

Модифицированы питательная среда, состоящая из пептона, картофельного крахмала, глюкозы, хлорида натрия и бентонита, для глубинного культивирования *Vac. subtilis* и контактно-сорбционный метод обезвоживания биомассы, содержащей бактериальную массу *Vac. subtilis*.

На основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 разработаны составы и технологии производства пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил. Изучены их токсикологические свойства, проведены доклинические исследования этих препаратов.

При производственных испытаниях сконструированных препаратов установлена их высокая лечебно-профилактическая и экономическая эффективность.

Научная новизна проведенных исследований подтверждена 8 патентами РТ.

Практическая ценность. В результате проведенных исследований ветеринарной практике предложены эффективные пробиотические препараты Субтилбен и Лаксубтил, обладающие этиотропным и патогенетическим действием и предназначенные для профилактики и терапии инфекционных энтеритов телят.

Разработана нормативная документация по изготовлению и контролю, технические условия, наставление по применению на пробиотики Субтилбен и Лаксубтил для профилактики и лечения желудочно-кишечных и респираторных болезней животных;

В ветеринарной практике рекомендовано использование препаратов на основе *Vac. subtilis* в технологическом процессе при выращивании молодняка крупного рогатого скота, начиная с первых дней жизни, что повысит уровень неспецифической резистентности, иммунный статус, сохранность телят и прирост живой массы.

Материалы работы используются в учебном процессе на кафедры «Микробиология и эпизоотология» для студентов ветеринарного и зооинженерного факультета.

Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту:

1. Результаты изучения эпизоотической ситуации по инфекционным энтеритам телят в хозяйствах Таджикистана и северо-восточного региона Украины.
2. Результаты изучения морфологических, культуральных, биохимических, физиолого-биологических свойств, патогенности и антагонистической активности штаммов *Vac. subtilis*, отобранных для производства на их основе пробиотиков.
3. Результаты изыскания эффективной питательной среды для культивирования *Vac. subtilis*.
4. Технология сушки биомассы *Vac. subtilis* контактно-сорбционным методом.

5. Технология изготовления пробиотических препаратов Субтилбен и Лаксубтил и результаты исследования их свойств.

6. Результаты доклинических исследований пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил.

7. Результаты изучения эффективности пробиотических препаратов Субтилбен и Лаксубтил при профилактике и лечении инфекционных энтеритов телят.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на заседаниях ученого совета Таджикского аграрного университета им. Ш. Шотемур (2006 – 2012 гг.); республиканских научно-практических конференциях и семинарах-совещаниях (Душанбе, 2006 – 2012 гг.); Международной научно-практической конференции «Биобезопасность и зоонозные инфекции» (Алматы, 2009 г.), Международной научно-практической конференции «Научное и клиническое применение традиционной медицины в Синьцзяне и соседних странах» (Урумчи, 2011 г.), Международной научно-практической конференции «Ветеринарные проблемы в Центральной Азии – Продовольственная безопасность: Использование современных методов диагностики и профилактики инфекционных болезней животных» (Душанбе, 2011 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 43 научных работ, получены 8 патентов Республики Таджикистан, в том числе издано 3 учебных пособия. В изданиях, рекомендованных ВАК РФ, опубликованы 15 работ, в которых изложены основные положения и выводы по изучаемой проблеме.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений, списка литературы и приложения.

Диссертация изложена на 261 странице, иллюстрирована 51 таблицами и 15 рисунками. Список литературы содержит 450 источников. В приложение включены материалы, подтверждающие внедрение результатов исследования в практику.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность проректору по науке, заведующей кафедрой ветеринарной санитарной экспертизы, микробиологии и зоогигиены СНАУ (Республика Украина) Фогиной Татьяне Ивановне за консультационную, методическую и практическую помощь в проведении исследований.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2006 – 2012 гг. в лаборатории микробиотехнологии Таджикского аграрного университета им. Ш. Шотемура в соответствии с республиканской научно-технической программой «Разработка и внедрение эффективных биологических средств профилактики и терапии бактериозов и микоплазмозов животных» на 2005 – 2010 гг., зарегистрированной в Национальном патентно-информационном центре (НПИЦентр) РТ (№ госрегистрации 0105 ТД 236), и на кафедре ветеринарной санитарной экспертизы, микробиологии и зооигиены Сумского национального аграрного университета (Республика Украина).

Экспериментальные и производственные исследования проведены в 12 животноводческих хозяйствах районов республиканского подчинения (РРП: Кооперативное хозяйство (КХ) им. Л. Муродова, Открытое акционерное общество (ОАО) «Баракат», Производственный кооператив (ПК) «Ватан», ПК им. А. Юсупова, Учебно-производственное хозяйство (УПХ) ТАУ – Гиссарский р-н; Производственное аграрно-промышленное объединение (ПАПО) «Шахринав», ПК «Навруз» – Шахринавский р-н); Согдийской (Ассоциация дехканских хозяйств (АДХ) «Ленин»; Племенное хозяйство (ПХ) им. Х. Мукаримова – Исфаринский р-н; ПК им. Дж. Расулова – Бободжон-Гафуровский р-н) и Хатлонской областей (ОАО «Баракат», УПХ ТАУ – Яванский р-н) Республики Таджикистан.

2.1 Диагностические исследования

Бактериальные болезни диагностировали на основании анализа эпизоотологических данных с учетом клинических признаков болезни, патологоанатомических изменений и результатов бактериологического исследования патологического материала от больных, павших и вынужденно убитых больных телят.

Чувствительность выделенных культур к антибиотикам определяли методами серийных разведений с посевом на плотные питательные среды и результаты оценивали соответственно по задержке роста (МБсК) / гибели (МБцК) и величине зоны задержки роста микроорганизмов.

2.2 Штаммы *Bac. subtilis*

В работе использовали штаммы *Bac. subtilis* BS TJ 06, BS TJ 07, BS TJ 08, BS TJ 09, BS TJ 10, BS TJ 11, BS TJ 12, BS TJ Д 24, BS TJ Д 26 из коллекции ТАУ, при сравнительной характеристике которых изучали морфологические, тинкториальные, культуральные, ферментативные свойства, патогенность (биопроба), антагонистическую активность (методом серийных разведений с посевом на плотные питательные среды в отношении тест-культур *E. coli*, *S. dublin*, *Pr. vulgaris*), совместимость (при совместном культивировании на жидких и плотных питательных средах, после которого изучали морфологические,

тинкториальные, культуральные, ферментативные свойства, патогенность и антагонистическую активность).

2.3 Антимикробная активность

Антагонистические свойства Субтилбена и Лаксубтила изучали методом серийных разведений.

2.4 Токсикологические свойства

Проверку безвредности Субтилбена и Лаксубтила осуществляли методом с использованием сухой культуры инфузории *Colpoda steinii* согласно требованиям ГОСТа Р 52337-2005.

В соответствии с «Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве» (М., 1989) изучали острую и хроническую токсичность, раздражающие и аллергенное свойства Субтилбена и Лаксубтила.

2.5 Методы стандартизации пробиотиков на основе *Bac. subtilis*

2.5.1 Физико-химические свойства

Внешний вид, наличие механических примесей, плесени определяли визуально при рассмотрении отобранных образцов при хорошем естественном освещении на белом фоне на расстоянии 25 – 30 см от глаз.

Определение размера таблеток и массы таблеток проводили по ГФ XI (вып. 2, с. 156).

Определение времени распадаемости проводили по ГФ XI (вып. 2, с. 158).

Концентрацию водородных ионов (рН) 10% водной суспензии определяли потенциометрически (ГФ XI, вып. 1, с. 175).

Определение массовой доли влаги проводили по ГОСТ 24061-89.

2.5.2 Биологические свойства

*Подсчет количества микробных клеток *Bac. subtilis**. Пробы (Субтилбен в форме гранул и таблеток) суспендировали физиологическим раствором в 10 – 15 раз и заправляли суспензией подготовленную камеру Горяева, в 5 квадратах которой под микроскопом определяли количество микробных клеток и рассчитывали их число.

*Определение количества жизнеспособных клеток *Bac. subtilis**. В пробирку, содержащую 1 г (мл) ЛФ на основе *Bac. subtilis*, добавляли 9 см³ стерильного физиологического раствора, после тщательного перемешивания 0,5 см³ суспензии переносили во вторую пробирку с 4,5 см³ физиологического раствора, из которой 0,5 см³ разведенной суспензии – в третью, из третьей – в четвертую, из четвертой – в пятую, из пятой – в шестую пробирку с 4,5 см³ физиологического раствора.

Из последней (шестой) пробирки по 0,5 см³ суспензии пипеткой засеивали в шесть чашек Петри с картофельным агаром, колебательными движениями

распределяя суспензию по всей поверхности агара. Культивировали 36 ч при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, после чего учитывали результаты исследования (определяли количество больших и малых по диаметру колоний).

Проверку на *стерильность* осуществляли по ГОСТ 28085-89.

Контаминацию микоплазмами исключали по ГФ XI (вып. 2, с. 15).

Антагонистические свойства определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой и плотной питательных средах в отношении моно- и ассоциаций патогенов *E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris*.

Испытание *токсичности* проводили по ГФ XI (вып. 2, с. 182).

2.6 Определение стабильности Субтилбена

Образцы экспериментальных серий лекаренных препаратов на основе *Vac. subtilis* при температуре 30°C помещали в термостат на сроки, соответствующие 6, 12, 18, 24, 30, 36 и 42 мес. естественного хранения, в которые изучали стабильность физико-химических и биологических свойств.

Экономическую эффективность пробиотических препаратов рассчитывали согласно «Методике определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий» (утв. ГУВ МСХ СССР, 1982 г.), а также в соответствии с «Методикой определения экономической эффективности использования в сельском хозяйстве результатов научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, новой техники, изобретений и рационализаторских предложений» (утв. МСХ СССР, 1983 г.).

Методики отдельных экспериментов изложены в соответствующих разделах диссертации.

Цифровой материал диссертации обработан статистически по критерию Стьюдента для проверки достоверности различий. Разница между сравниваемыми величинами считалась достоверной при $p \leq 0,05$ (Лакин Г.Ф., 1990).

За основу выводов и практических предложений взяты результаты контролируемых опытов в лабораторных и производственных условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 3 ИНФЕКЦИОННЫЕ ЭНТЕРИТЫ ТЕЛЯТ

3.1 Эпизоотическая ситуация в Северном, Центральном и Южном Таджикистане

На молочно-товарных фермах (МТФ) Таджикистана *E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris* являются возбудителями инфекционных энтеритов молодняка КРС, вероятность возникновения и тяжесть течения которых определяют внешние факторы, влияющие на естественную резистентность и иммунологическую реактивность организма.

В результате исследования 700 проб патологического материала (фекалии, кровь, паренхиматозные органы) от новорожденных телят из 12 животноводческих хозяйств РРП, Хатлонской и Согдийской областей РТ наибольшее

количество больных инфекционными энтеритами телят (42,0%) выявлено в хозяйствах РРП, наименьшее (25,0%) – Хатлонской области (табл. 1).

Таблица 1 Результаты бактериологического исследования патологического материала от новорожденных телят

Количество		РРП	Область		Всего
			Согдийская	Хатлонская	
Хозяйств	исследованных	7	2	3	12
	неблагополучных	7	2	2	11
Проб	исследованных	420	126	154	700
	положительных	176 (42,0)	42 (33,0)	39 (25,0)	257 (40,3)

Примечание. В скобках указано процентное значение.

В 196 (76,3%) пробах выделены моновозбудители, 61 (23,7%) – ассоциации патогенов. В 59,8% (154) случаев возбудителем инфекционного энтерита была *E. coli*, в 10,2 (26) – *Pr. vulgaris*, 6,3% (16) – *S. dublin*, 14,2% (36) – ассоциации *E. coli* и *Pr. vulgaris*, 5,5% (14) – ассоциации *E. coli* и *S. dublin*, 4,0% (11) – ассоциации *E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris*.

3.2 Эпизоотическая ситуация в хозяйствах северо-восточного региона Украины

Результаты анали за бактериологических исследований Сумской, Харьковской и Черниговской государственных областных и районных лабораторий ветеринарной медицины за 2007 – 2011 гг. свидетельствуют, что в хозяйствах северо-восточного региона Украины, специализирующихся на выращивании КРС, чаще всего циркулируют сальмонеллы сероваров *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*; эшерихии – O1, O8, O4, O78, O86, O101 и O111; стафилококки – *St. aureus*, *St. saprophyticus*, *St. epidermidis*; стрептококки – *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. pyogenes*, *Str. uberis*, *Str. pneumoniae*. Реже из патматериала изолировали синегнойную палочку, протей и пастереллу.

При бактериологических исследованиях в 32,2% случаев изолировали *E. coli*, 15,6 – *Ps. aeruginosa*, 10,1 – *Pr. vulgaris*, 9,9 – *St. aureus*, 5,9 – *S. enteritidis*, 5,7 – *Str. uberis*, 20,6% случаев приходилось на долю остальных видов микроорганизмов.

При серотипизации эшерихий и сальмонелл установлено, что в регионе циркулируют серовары эшерихий – O8 (16,9%), O4 (11,1%), O1 (10,4%), O78 (10,1%), O86 (9,8%), O101 (8,5%), O111 (7,3%), не типировались – 24,9% и сальмонелл – *S. enteritidis* (55,7%), *S. dublin* (23,5%), *S. typhimurium* (20,8%).

При бактериологическом исследовании больных и павших телят изолирована условно-патогенная микрофлора – 12 видов (*E. coli* – 23,1% случаев, *Ps. aeruginosa* – 17,6, *S. enteritidis* – 13,7, *S. dublin* – 10,5, *S. typhimurium* – 8,8, *Pr. vulgaris* – 6,1, *St. aureus* – 5,6, *Str. pyogenes* – 5,6, *Str. pneumoniae* – 4,6, *Str. epidermidis* – 2,6, *P. multivida* – 1,8% случаев).

Таким образом, инфекционные энтериты молодняка КРС вызываются бактериальной флорой, которая циркулирует в хозяйствах и выделяется от коров, больных эндометритами и маститами, а также больные и клинически здоровые животные – бактерионосители. Чаще всего этиологическим фактором этих заболеваний были эшерихии, сальмонеллы, протей и синегнойная палочка, что обуславливает актуальность разработки новых антибактериальных лекарственных средств и рациональных способов их применения.

4 ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРОБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ *BAC. SUBTILIS*

4.1 Подбор штаммов *Bac. subtilis*

Из изученных (BS TJ 06, BS TJ 07, BS TJ 08, BS TJ 09, BS TJ 10, BS TJ 11, BS TJ 12, BS TJ Д 24, BS TJ Д 26) для производства на их основе пробиотиков отобраны наиболее перспективные штаммы *Bac. subtilis* – BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, – проявляющие антимикробные свойства в отношении тест-культур микроорганизмов в низких концентрациях (3,9 – 31,2 млн м.к./мл).

Установлено, что штаммы BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 характеризуются типичными для *Bac. subtilis* физиолого-биологическими свойствами, которые могут обусловить более широкий диапазон их действия при сочетанном применении.

Изученные штаммы характеризуются отсутствием гемолитической активности, у них не обнаружены ферменты, которые могут обуславливать патогенные свойства (лецитиназа, гиалуронидаза), обладают важными технологическими свойствами – растут в присутствии 7%-ной NaCl, не нуждаются в аминокислотах и витаминах, не проявляют взаимного антагонизма при совместном культивировании.

Таким образом, морфологические, культуральные, ферментативные свойства, отсутствие патогенности, высокая противомикробная активность и физиолого-биологические свойства штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 послужили основанием для использования их при изготовлении пробиотиков.

4.2 Модифицированная питательная среда для культивирования *Bac. subtilis*

Для выращивания *Bac. subtilis* рекомендуют картофельные среды, но получаемая концентрация бактерий в бактериальной массе не превышает 1 – 3 млрд/мл и недостаточна для изготовления пробиотиков.

Проведены эксперименты по глубинному культивированию *Bac. subtilis* на:

1) элективной питательной среде (среда для выращивания *Vac. subtilis*), содержащей фосфатнокислый калий – 0,1%, азотнокислый натрий – 1%, глюкозу – 1%, хлорид натрия – 0,01%, сернокислый магний – 0,1%, сернокислое железо – 0,1% и дистиллированную воду – до 100%;

2) картофельной питательной среде, содержащей пептон – 0,25%, картофельный крахмал – 0,25%, глюкозу – 0,125%, хлорид натрия – 0,01% и дистиллированную воду – до 100%.

При культивировании на элективной питательной среде (вариант I) рост бактерий был слабым, наблюдали ее незначительное помутнение, а на картофельной питательной среде (вариант II) отмечали обильный рост, ее помутнение и выпадение осадка, что определило направление дальнейших исследований с целью модификации этой среды для получения качественной бактериальной массы с высоким содержанием спорных форм бактерий.

С этой целью, для модификации и обогащения картофельной питательной среды нами была изготовлено VI вариантов питательных сред с использованием растительных (соевых растений), химических (натриевые, калиевые и магниевые соли) и минеральных веществ (макро и микроэлементов).

Определено, что эффективной питательной средой для выращивания *Vac. subtilis* (вариант VI) является среда, состоящая из 0,25% пептона, 0,25% картофельного крахмала, 0,125% глюкозы, 0,01% хлорида натрия и 10% минеральные и растительные вещества.

Таким образом, морфологические, культуральные, ферментативные свойства, противомикробная активность отобранных для производства пробиотиков штаммов *Vac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 при культивировании на модифицированной нами среде в сравнении с исходными штаммами не изменялись, что определило использование этой среды при производстве пробиотиков.

4.3 Сушка бактериальной массы модифицированным контактно-сорбционным методом

С целью высушивания бактериальную массу смешивали с бентонитопектиновую смесь в соотношении 9:1 выдерживали в течение 24 ч. При температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, затем температуру повысили до $(50 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и выдерживали в течение 48 ч. Высушенную смесь измельчали в шаровых мельницах и полученный порошок просеивали через сито.

Результаты исследования полученного порошка пробиотика Субтилбен показали, что массовой доли влаги колебалось от 3,0 до 4,0%, рН 10% водной суспензии составляет 6,8-7,2. В 1 г пробиотика содержался 24-26 млрд м.к., количество живых клеток колебалась в пределах 80%. Бактерицидная активность *Vac. subtilis* в тест-штаммов эшерихии коли, сальмонеллы и пастереллы составила 15,6-31,2 млн м.к./мл.

Таким образом, результаты проведенных исследований показывали, что контактно-сорбционный метод высушивания биомассы *Vac. subtilis* с помощью минеральных и растительных адсорбентов в течение 72 часов позволяет получить порошок *Vac. subtilis*, обладающий высокой антимикробной активностью.

4.4 Субтилбен в форме порошка

4.4.1 Состав и технология производства

Основные технологические стадии производства Субтилбена на основе штаммов *Bac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 в форме порошка состоят из следующих стадий.

1. Получение первичных культур производственных штаммов (ПШ)

С полужидкого агара культуры производственных штаммов *Bac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 засевают в пробирку с модифицированным картофельным питательным бульоном и выращивают в течение 24 ч при температуре $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$.

2. Получение матричных культур производственных штаммов

Первичные культуры проверяют на чистоту, засевают в колбы Эрленмейера (объемом 1,5 л), наполненные модифицированным картофельным питательным бульоном не более 2/3 объема, и инкубируют при температуре $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч.

3. Изготовление бактериальной массы (БМ) методом глубинного культивирования (I стадия)

Чистые культуры производственных штаммов (BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26) 24-часового роста в количестве 10% объема (1 л) засеваемого модифицированного картофельного питательного бульона (pH 7,4 – 7,6) инокулируют в 10-литровые бутылки и выращивают при температуре $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч.

4. Приготовление бентонито-пектиновой смеси (БПС)

Пектин перемешивают с бентонитом в соотношении 37:60 до получения однородной смеси.

5. Приготовление гомогената бентонито-пектиновой смеси и бактериальной массы производственных штаммов *Bac. subtilis*

Бентонито-пектиновую смесь добавляют в бактериальную массу производственных штаммов *Bac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 и перемешивают.

6. Сушка производственной серии биомассы

Контактно-сорбционным методом обезвоживания биомассу в течение 48 ч сушат при температуре $(50\pm 0,5)^\circ\text{C}$.

7. Измельчение высушенной производственной серии биомассы

Производственную серию биомассы после сушки измельчают в шаровых мельницах, порошок просеивают через сито.

8. Выдержка на складе временного хранения (СВХ) до получения заключения контролера ОТК.

Производственную серию биомассы после сушки измельчают в шаровых мельницах, порошок просеивают через сито.

9. Выдержка на складе временного хранения (СВХ) до получения заключения контролера ОТК.

10. Этикетировка и укладка в индивидуальную упаковку.

11. Укладка в групповую упаковку и этикетировка.

12. Хранение на складе готовой продукции.

4.4.2 Антимикробная активность

Установлена высокая бактериостатическая и бактерицидная активность Субтилбена в форме порошка на основе штаммов *Vac. subtilis* в отношении исследованных тест-микробов. МБСК пробиотика для *E. coli* и *P. multocida* составляла 0,3, *S. dublin*, *Pr. vulgaris* и *St. aureus* – 0,6 мг/мл. Гибель (МБЦК) тест-культур изученный пробиотический препарат вызывал в концентрациях, превышающих бактериостатические в два раза.

Таким образом, выделение *Vac. subtilis* БАВ обуславливает высокую антагонистическую активность Субтилбена в форме порошка на основе штаммов *Vac. subtilis* в отношении музейных штаммов и изолятов *E. coli*, *S. dublin*, *Pr. vulgaris*, *P. multocida* и *St. aureus*.

4.4.3 Токсикологические свойства

В соответствии с требованиями ГОСТа Р 52337-2005 Субтилбен в форме порошка относится к нетоксичным препаратам микробиологического синтеза, под действием которых за установленное время остаются активными свыше 80% стилохоний. Через 3 ч воздействия исследовавшимся препаратом активность стилохоний опытного ряда составила 89%, а в контроле – 90%.

Безвредность Субтилбена в форме порошка также изучали на белых мышах (массой 18 – 20 г; 3 группы, n=10), кроликах породы шиншилла (массой 2,5 – 2,7 кг; 3 группы, n=5) и новорожденных телятах черно-пестрой породы (массой 31 – 33 кг; 3 группы, n=5), которым препарат в дозе 0,3 г/кг массы тела вводили с водой перорально в объемах соответственно 0,5; 10 и 30 мл 2 раза в сут в течение 7 дней.

В течение 14 сут наблюдения не было ни одного случая падежа животных, что свидетельствует о безвредности Субтилбена в форме порошка.

Острую токсичность пробиотика изучали в опытах на белых мышах (массой 18 – 20 г, n=10) и новорожденных телятах черно-пестрой породы (массой 31 – 33 кг, n=5), из которых по принципу парных аналогов сформировали по 6 групп.

Белым мышам Субтилбен в форме порошка в виде суспензии на физиологическом растворе вводили однократно перорально в объеме 0,5 мл в дозах 1,0 (1-я группа), 1,5 (2-я), 2,0 (3-я), 2,5 (4-я), 3,0 г/кг массы тела (5-я); телятам – в объеме 30 мл в тех же дозах. Контрольным животным в соответствующих объемах вводили физиологический раствор.

За лабораторными животными и телятами наблюдали в течение 14 дней, учитывая общее состояние, внешний вид, поведенческие реакции, прием пищи и воды, частоту сердцебиения, количество дыхательных движений.

Гибели опытных животных не наблюдали, клиническое состояние опытных и контрольных животных не отличалось.

Следовательно, Субтилбен в форме порошка на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 относится к нетоксичным веществам.

В опытах по скармливанию Субтилбена в форме порошка в течение 20 сут трем группам (n=10) белых мышей (массой 18 – 20 г) и трем группам (n=10) кроликов породы шиншилла (массой 2,5 – 2,7 кг) в дозах 0,6; 1,5 и 3,0 г/кг массы тела изучали хроническую токсичность. Животные контрольных групп (n=10) пробиотик не получали. За лабораторными животными наблюдали в течение 30 дней.

Установлено, что при длительном введении Субтилбена в форме порошка в дозах 0,6; 1,5 и 3,0 г/кг массы тела поведение, аппетит, прием воды, состояние слизистых оболочек и шерстного покрова опытных животных не отличается от контрольных.

Применение Субтилбена порошка в дозах 0,6; 1,5 и 3,0 г/кг массы тела не влияет на динамику массы тела, которую определяли на 5, 10, 15 и 20 сут: у опытных и контрольных животных (величины статистически не отличались). Пробиотик не вызывал повышения температуры тела и не влиял на характер локомоторной активности, стереотипное поведение и выносливость животных.

Влияние Субтилбена в форме порошка на кожу изучали методом однократной аппликации 10% суспензии на белых мышцах (массой 18 – 20 г, n=6).

Повторное местное раздражающее действие пробиотика исследовали на белых мышцах (самках, массой 18 – 20 г, n=6) и кроликах (самках, массой 2,5 – 2,7 кг, n=6), которым ежедневно на выстриженный участок кожи в межлопаточной области наносили соответственно по 1 и 2 капли 10% суспензии Субтилбена в форме порошка в течение соответственно 14 и 21 дня. Животным контрольных групп (n=6) по той же методике наносили подсолнечное масло. Наблюдение за белыми мышцами вели в течение 30, кроликами – 60 дней.

При изучении раздражающих свойств Субтилбена в форме порошка методом аппликации на кожу установлено, что кожа кроликов на месте нанесения порошков оставалась гладкой, эластичной, не утолщенной, безболезненной и без признаков гиперемии.

На кроликах (самках, массой 2,5 – 2,7 кг), которых разделили на две группы (n=6) изучали действие Субтилбена в форме порошка на слизистую оболочку глаза, которое при однократном и повторном введении не наблюдали покраснения конъюнктивы глаз, инъекции сосудов склеры, слезотечения.

4.4.4 Стандартизация и стабильность

Нами разработаны качественные и количественные методы исследований, предусмотренные ОСТ 91500.05.001.00 в требованиях к качеству порошков, для стандартизации и контроля качества, изучения стабильности при хранении Субтилбена в форме порошка на основе штаммов *Vac. subtilis*.

Результаты проверки качества трех экспериментальных серий показали хорошую воспроизводимость и точность разработанных качественных и количественных методов контроля.

Качество препарата характеризуется следующими физико-химическими и биологическими показателями:

1. Внешний вид и цвет – порошок серовато-белого цвета.
2. Наличие механических примесей, плесени – нет.

3. Концентрация водородных ионов (рН) 10% водной суспензии – 6,5 – 7,0.

4. Массовая доля влаги – не более 10%.

5. Стерильность – посторонняя микрофлора отсутствует.

6. Количество м.к. *Vac. subtilis* – 30 млрд/г.

7. Количество жизнеспособных клеток *Vac. subtilis* – 75 – 80%.

8. Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой – отсутствует.

9. Контаминация микоплазмами – отсутствует.

10. Антагонистические свойства (МБцК в отношении *E. coli* и *P. multocida*, *S. dublin*, *Pr. vulgaris* и *St. aureus*) – 0,3 – 1,2 мг/мл.

11. Токсичность – нетоксичен.

На основании проведенных исследований предложены требования к качеству Субтилбена в форме порошка на основе штаммов *Vac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26.

Изучение стабильности Субтилбена в форме порошка методом «ускоренного старения» при повышенных температурах (37 и 50°C; образцы экспериментальных серий помещали в термостат на сроки, соответствующие 0,5; 1; 2 и 3 годам естественного хранения) показало, что по физико-химическим и биологическим показателям качества пробиотик оставался стабильным в течение срока, соответствующего 2 годам естественного хранения.

4.5 Субтилбен в форме гранул и таблеток

4.5.1 Состав и технология производства

На основе высушенной контактно-сорбционным методом бактериальной массы штаммов *Vac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 в лаборатории микробиотехнологии ТАУ разработан пробиотик Субтилбен в форме гранул и таблеток, состоящий из порошок, содержащий бактериальную массу (BS TJ 09, BS TJ Д 24, BS TJ Д 26) – 89 г, крахмал – 4 г, сахарный сироп – 3 г и стеарат кальция – 4 г.

Основные технологические стадии изготовления Субтилбена в формах гранул и таблеток представлены на рисунке 1.

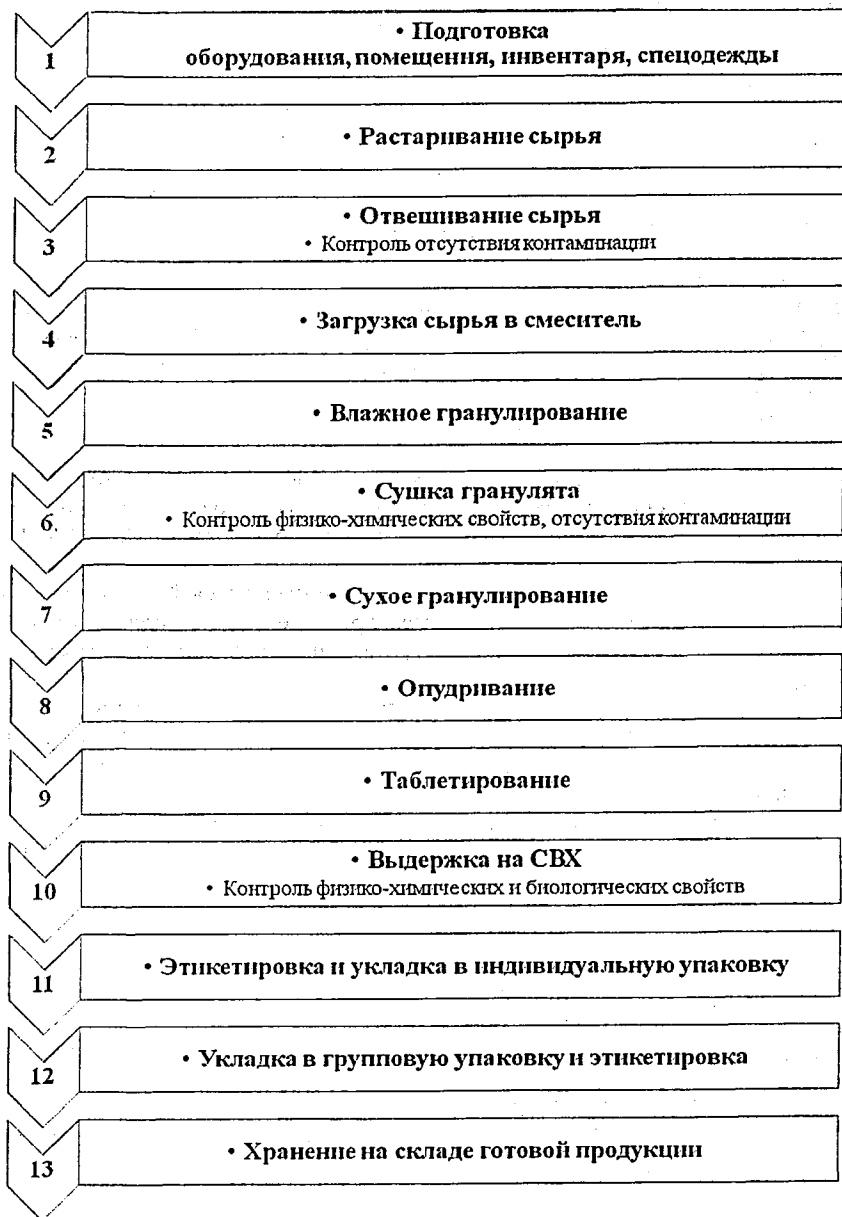


Рис. 1. Технологические стадии изготовления Субтилбена в формах гранул и таблеток

4.5.2 Стандартизация и стабильность

Воспроизводимость и точность разработанных качественных и количественных методов контроля препарата подтверждены результатами исследования 5 экспериментальных серий Субтилбена в форме гранул и таблеток и обеспечиваются в соответствии с требованиями ФС 42-3476-98 и ГФ оптимальный уровень качества стандартизируемого объекта в процессе его производства, хранения и применения.

В результате пяти опытов установлено, что таблетки имеют круглую форму, серовато-белого цвета мраморного характера, диаметром 16 мм, массой $2,0 \pm 0,1$ г. Время распадаемости таблеток в среднем составляло 15,2 мин. Массовая доля влаги колебалась от 3,0 до 4,5% и рН 10%-ной водной суспензии составлял 7,0. В 1 г препарата содержалось 24 млрд м.к., количество жизнеспособных клеток колебалось от $75 \pm 0,5$ до $85 \pm 0,5\%$. Препарат был безвреден для животных, не контаминирован посторонней микрофлорой. Бактерицидная активность в отношении моно- и ассоциированных патогенов возбудителей (*E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris*) инфекционного энтерита телят составила 15,6 – 31,2 млн м.к./мл.

Предложенные на основании проведенных исследований требования к качеству пробиотика Субтилбен в формах гранул и таблеток вошли в инструкцию по изготовлению и контролю, ТУ на препарат (утв. ГУВ МСХ РТ 25.11.2004 г.).

При хранении физико-химические и биологические свойства препарата оставались стабильными в течение 24 мес.: при определении количественных показателей достоверных расхождений в полученных результатах не отмечали ($p \leq 0,05$).

Срок хранения Субтилбена в форме гранул и таблеток по списку Б, в сухом, хорошо проветриваемом, защищенном от света и атмосферных осадков месте, при температуре не выше 30°C по результатам проведенных исследований установлен в течение 2 лет.

Полученные результаты вошли в инструкцию по изготовлению и методы контроля, технические условия препарата Субтилбен в форме гранул и таблеток (утв. ГУВ МСХ РТ 25.11.2004 г.).

4.6 Лаксубтил в форме суспензии

4.6.1 Композиция и технология изготовления

В лаборатории микробиотехнологии ТАУ разработан пробиотик Лаксубтил в форме суспензии на основе штаммов *Vac. subtilis* BS TJ 09 и BS TJ Д 26. Состав препарата и количественное содержание состоит из бактериальной массы *Vac. subtilis* BS TJ 09 BS TJ Д 26 – 0,5 – 1 млрд и коровье молоко.

Основные технологические стадии изготовления Лаксубтила в форме суспензии представлены на рисунке 2.

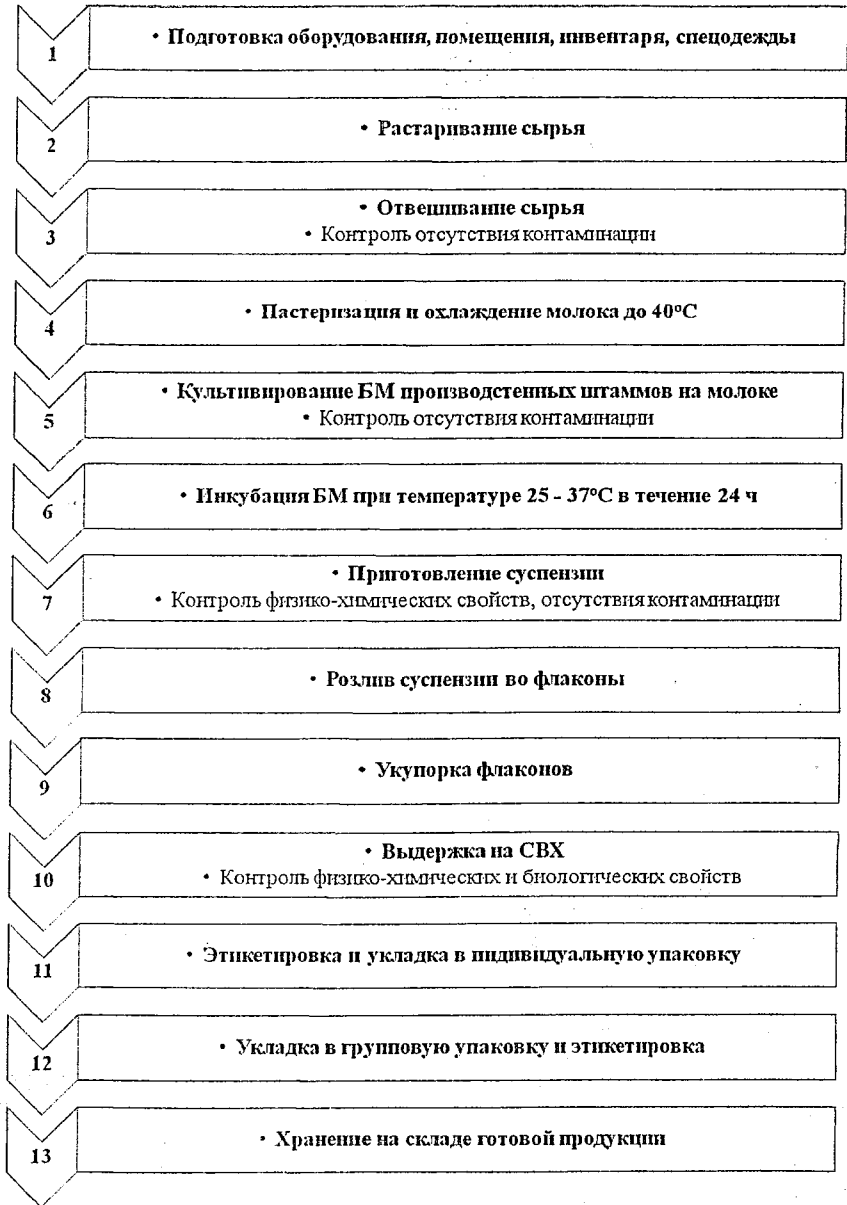


Рис. 2. Технологические стадии изготовления Лаксубтила

Смывы суточных агаровых культур штаммов *Vac. subtilis* BS TJ 09 и BS TJ Д 26 при пероральном кроликам, телятам (9 млрд м.к./кг массы тела) и парентеральном (100 млн м.к./кг массы тела) белым мышам введении в объемах соответственно 0,6; 10,5 и 0,3 мл не обуславливали физиологические отклонения у опытных животных в сравнении с контрольными, что свидетельствует об отсутствии патогенности у испытанных штаммов.

МБсК штаммов *Vac. subtilis* BS TJ 09 и BS TJ Д 26 в отношении *E. coli* 7,8 млн м.к./мл; МБцК – 15,6 млн м.к./мл.

Штаммы BS TJ 09 и BS TJ Д 26 характеризуются типичными для *Vac. subtilis* физиолого-биологическими свойствами, которые могут обусловить более широкий диапазон их действия при сочетанном применении. Эти штаммы характеризуются отсутствием гемолитической активности, у них не обнаружены ферменты, обуславливающие патогенные свойства (лецитиназа, гиалуронидаза), обладают важными технологическими свойствами – растут в присутствии 7%-ной NaCl, не нуждаются в аминокислотах и витаминах, не проявляют взаимного антагонизма при совместном культивировании. Кроме того, по сравнению с другими испытанными отобранными нами штаммы BS TJ 09 и BS TJ Д 26 при сквашивании молока образовывали однородную суспензию.

Таким образом, морфологические, культуральные, ферментативные свойства, отсутствие патогенности, высокая противомикробная активность и физиолого-биологические свойства штаммов *Vac. subtilis* BS TJ 09 и BS TJ Д 26 послужили основанием для использования их при изготовлении пробиотика Лаксубтил.

4.6.2 Стандартизация и стабильность

Результаты проверки качества трех экспериментальных серий, показали хорошую воспроизводимость и точность разработанных качественных и количественных методов контроля Лаксубтила, характеризующегося следующими физико-химическими и биологическими показателями:

1. Внешний вид и цвет – суспензия серовато-белого цвета.
2. Наличие механических примесей, плесени – нет.
3. Концентрация водородных ионов (pH) – 4,5 – 5,0.
4. Количество микробных клеток *Vac. subtilis* – 500 млн/мл.
5. Количество жизнеспособных клеток *Vac. subtilis* – 85 – 90%.
6. Контаминация бактериальной и грибковой микрофлорой – отсутствует.
7. Контаминация микоплазмами – отсутствует.
8. Противомикробные свойства – 15,6 – 31,2 млн м.к./мл.
9. Токсичность – безвреден.

Требования к качеству Лаксубтила, предложенные на основании результатов проведенных исследований, вошли в инструкцию по изготовлению и контролю, технические условия на препарат (утв. СГВН МСХ РТ 11.09.2012 г.).

Изучение стабильности Лаксубтила при естественном хранении (+18 – +20°C) и в условиях холодильника (+2 – +8°C) выявило, что в первом случае физико-химические и биологические свойства пробиотика оставались стабильными 2 сут, во втором – 10 дней, в которых препарат хранят по списку Б.

5 БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ *Vac. subtilis*

5.1 Антагонистические свойства

5.1.1 *Субтилбен*

Методом двукратных серийных разведений в жидкой (МПБ) и плотной (МПА) средах на ассоциацию *E. coli* и *S. dublin*, выделенных от больных инфекционными энтеритами телят в животноводческих хозяйствах РТ, изучили антагонистические свойства *Субтилбена*. При МБсК в мазках тест-культур, окрашенных по Граму, наблюдали задержку роста, МБцК через 24 – 72 ч инкубации – только грамположительные палочки *Vac. subtilis*.

Установлена высокая бактериостатическая и бактерицидная активность *Субтилбена* в отношении исследованных тест-культур (табл. 2), задержка роста которых происходила при концентрации препарата 15,6 - 31,2, а гибель – 31,2 – 62,5 млн м.к./мл. Соответствующие показатели для известного препарата Биоспорин составили 62,5 – 125 и 125 – 250 млн м.к./мл.

Таблица 2 - Антагонистические свойства пробиотика *Субтилбен* в отношении ассоциации *E. coli* и *S. dublin*, млн м.к./мл

Наименование препаратов		Опыт		
		1	2	3
<i>Субтилбен</i>	МБсК	15,6	15,6	31,2
	МБцК	31,2	31,2	62,5
Биоспорин	МБсК	62,5	125	125
	МБцК	125	250	250

В отношении односуточной бульонной культуры *S. dublin* (концентрация – 1 млрд м.к./мл) методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде изучили динамику антагонистической активности *Субтилбена*, которую оценивали через 1, 3, 6, 12, 18, 24, 36 и 48 часов.

Изменение морфологии *S. dublin* начиналось спустя 6 ч после контакта с препаратом: клетки тест-культуры увеличивались в размере и принимали различную форму. Количество клеток *S. dublin* через 12 – 18 ч начинало уменьшаться, лизис тест-культур заканчивался через 48 ч после контакта с *Субтилбеном*.

В контрольных пробирках изменение морфологии тест-культуры не наблюдали, что свидетельствует о связи бактерицидной активности изученного препарата с выделением *Vac. subtilis* биологически активных веществ.

Таким образом, *Субтилбен* обладает высоким антибактериальным действием и при контакте с препаратом полный лизис патогена (*S. dublin*) происходит спустя 48 часов.

5.1.2 Лаксубтил

Лаксубтил обладает высокой антагонистической активностью в отношении *E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris* как в отдельности, так и в различных ассоциациях. Минимальное количество пробиотика, которое приводило к гибели бактерий, составило 15,6 – 31,2 млн м.к./мл. Противомикробное действие Лаксубтила было равнозначно таковому у препарата сравнения Субтилбен.

Методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде в отношении односуточной бульонной культуры наиболее часто выделявшихся серотипов *E. coli* (концентрация – 500 млн м.к./мл) изучали динамику антагонистической активности Лаксубтила, оценивая ее через 1, 3, 6, 12, 18, 24, 36 и 48 часов.

Через 6 ч после контакта с препаратом начиналось изменение морфологии *E. coli*, выражавшееся в увеличении размеров и изменении формы клеток, количество которых начинало уменьшаться через 6 – 12 ч, а через 48 ч после контакта с Лаксубтилом лизис тест-бактерий заканчивался (рис. 3).

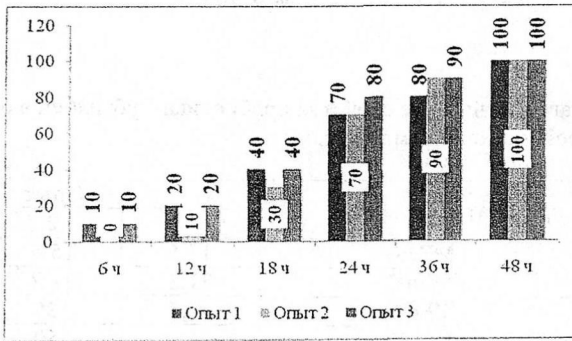


Рис. 3. Динамика лизиса *E. coli* после контакта с Лаксубтилом, %.

Таким образом, бактерицидная активность Лаксубтила в отношении *E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris* как в отдельности, так и в различных ассоциациях, выделенных от больных инфекционными энтеритами телят, проявлялась в концентрациях 15,6 и 31,2 млн м.к./мл и была обусловлена выделением *B. subtilis* биологически активных веществ, о чем свидетельствует отсутствие изменения морфологии тест-культуры в контрольных пробиорках.

5.2 Токсикологические свойства Субтилбена и Лаксубтила

5.2.1 Безвредность

При изучении безвредности пробиотиков Субтилбен в форме гранул и таблеток, Лаксубтил в форме суспензии установлено, что через 3 ч воздействия препаратами активность стилохоний опытного ряда составила 89% (в контроле – 90%). Следовательно, пробиотики Субтилбен и Лаксубтил относятся к без-

вредным средствам микробиологического синтеза, под действием которых за установленное время остаются активными свыше 80% стилехоний.

5.2.2 Острая токсичность

В соответствии с «Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве» острую токсичность пробиотиков Лаксубтил и Субтилбен изучали на лабораторных животных, за которыми, содержащимися в обычных условиях, перед началом исследований наблюдали в течение 14 дней. Последний раз корм давали накануне опыта вечером, прием воды не ограничивали.

Из 40 белых мышей (массой 18 – 21 г) по принципу парных аналогов сформировали по 5 групп (n=8): 4 опытные и 1 контрольная. Лабораторным животным опытных групп препараты вводили перорально однократно в дозах:

- гранулы и таблетки Субтилбен в форме суспензии в объеме 0,5 мл: 0,05 г (1-я группа), 0,1 г (2-я), 0,15 г (3-я) и 0,2 г (4-я группа) – в пересчете на 1 кг массы тела соответственно 2,5; 5,0; 7,5 и 10,0 г;

- суспензия Лаксубтил: 0,1 мл (1-я группа), 0,2 мл (2-я), 0,3 мл (3-я) и 0,5 мл (4-я группа) – в пересчете на 1 кг массы тела соответственно 5,0; 10,0; 15,0 и 25,0 мл.

Контрольным животным (5-я группа) в таком же объеме вводили физиологический раствор.

Кратковременное снижение двигательной активности опытных белых мышей отмечали в первые 3 – 4 ч наблюдений, клиническое состояние которых в дальнейшем не отличалось от такового у контрольных животных. Ни одного случая гибели опытных белых мышей за все время исследования не было.

Таким образом, в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 пробиотики Субтилбен и Лаксубтил при энтеральном введении в максимальной дозе (соответственно 10000 мг/кг и 25000 мкл/кг массы тела) не вызывают гибели экспериментальных животных, поэтому относятся к VI классу токсичности (нетоксичным веществам).

5.2.3 Хроническая токсичность

Хроническую токсичность гранул и таблеток Субтилбен, суспензии Лаксубтил изучали в опытах по вскармливанию препаратов 1 раз в день в течение 30 сут трем группам (n=10) кроликов породы шиншилла (массой 2,5 – 2,7 кг) в 1-, 2- и 3-кратной ориентировочно-терапевтической дозе (Субтилбен – 0,3 г/кг, Лаксубтил – 5,0 мл/кг массы тела). Животные контрольной группы (n=10) препараты не получали. За лабораторными животными наблюдали во время всего опыта, по окончании которого их усыпляли и проводили патологоанатомическое вскрытие.

Установлено, что длительное введение Субтилбена и Лаксубтила в дозах соответственно 0,3; 0,6 и 0,9 г/кг; 5,0; 10,0 и 15,0 мл/кг массы тела не влияет на поведение, аппетит, прием воды, состояние слизистых оболочек и шерстного покрова опытных кроликов, у которых не наблюдали повышения температуры

тела, характер локомоторной активности, стереотипное поведение и выносливость лабораторных животных не изменялись.

При патологоанатомическом исследовании у опытных кроликов не отмечали нарушений в размере и структуре паренхиматозных органов (сердце, печень и селезенка), имели характерный цвет, без кровоизлияний и дистрофических изменений.

Следовательно, пробиотики Субтилбен и Лаксубтил не обладают хронической токсичностью при оральном введении лабораторным животным.

5.2.4 Раздражающее и аллергенное свойства

Раздражающее действие гранул и таблеток Субтилбен, суспензии Лаксубтил изучали на 6 кроликах породы шиншилла (массой 2,5 – 2,7 кг), которым ежедневно делали аппликации на выстриженных участках кожи нативного препарата в дозе 0,1 см³ в течение 26 сут, учитывая реакцию кожи (гиперемия, болезненность, утолщение кожной складки, расчесы) и клиническое состояние организма лабораторных животных.

Раздражающее действие гранул и таблеток Субтилбен, суспензии Лаксубтил на слизистую оболочку глаза определяли на 2 группах (n=6) самок кроликов породы шиншилла (массой 2,5 – 2,7 кг), первым (опытная группа) из которых в конъюнктивальный мешок однократно закапывали 10%-ную суспензию разных лекарственных форм пробиотиков в объеме 0,1 см³, вторым (контроль) – инстиллировали воду в том же объеме. Влияние препаратов оценивали по проявлению гиперемии, инъекции сосудов склеры, слезотечению.

При изучении кожно-резорбтивного и местного действия на кожу мышей (массой 18 – 21 г) в опытной группе (n=6) делали однократную аппликацию 10%-ной суспензии гранул и таблеток Субтилбен и Лаксубтила, в контрольной группе (n=6) – подсолнечного масла.

Определение повторного местного раздражающего действия препаратов проводили на мышах (самках, массой 18 – 21 г), которым ежедневно на выстриженный участок кожи в межлопаточной области в течение 14 дней наносили по 1 капле 10%-ной суспензии гранул и таблеток Субтилбен и Лаксубтила (опытная группа, n=6), животным контрольной группы (n=6) – по 1 капле подсолнечного масла. Наблюдение за животными опытных и контрольных групп вели в течение 30 дней.

Повторное местное действие изучали также на кроликах (самках, массой 2,5 – 2,7 кг), которым ежедневно на кожу в течение 21 дня наносили по 2 капли 10%-ной суспензии гранул и таблеток Субтилбен и Лаксубтила (опытная группа, n=6), контрольным животным (n=6) – по 2 капли подсолнечного масла. За опытными и контрольными кроликами наблюдали в течение 60 дней.

Действие Субтилбена и Лаксубтила на слизистую оболочку глаза определяли на кроликах (самках, массой 2,5 – 2,7 кг), которых разделили на две группы (n=6): опытным животным в конъюнктивальный мешок однократно в количестве 1 капли закапывали 10%-ную суспензию гранул и таблеток Субтилбен и Лаксубтила, контрольным – воду.

При исследовании раздражающего свойства пробиотиков Субтилбен в форме гранул и таблеток, Лаксубтил в форме суспензии методами аппликации на кожу и инстилляций на слизистую оболочку глаз установлено; что кожа лабораторных животных на месте нанесения препаратов оставалась гладкой, эластичной, не утолщенной, безболезненной и без признаков гиперемии, не наблюдали покраснения конъюнктивы глаз, инъекции сосудов склеры, слезотечения. Отрицательная реакция кожи, слизистой оболочки и организма белых мышей и кроликов на нанесение разрешающей дозы Субтилбена и Лаксубтила свидетельствует об отсутствии сенсибилизации организма.

5.2.5 Влияние Субтилбена и Лаксубтила на качество мяса

Ветеринарно-санитарная экспертиза и бактериологические исследования свидетельствуют о доброкачественности мяса, полученного после убоя кроликов, обработанных гранулами и таблетками Субтилбен, суспензией Лаксубтил.

Мясо кроликов после 5-кратной дачи препаратов в дозах соответственно 0,3 г/кг и 5 мл/кг массы тела 1 раз в сут не отличалось по качеству от мяса контрольных (интактных) животных, на разрезе мышечная ткань красноватого цвета, поверхность разреза влажная, эластичная, плотная; бульон прозрачный без посторонних запахов.

При бактериологическом исследовании проб мяса и внутренних органов не обнаружено их обсемененности микроорганизмами из групп токсикоинфекций. Мазки-отпечатки из проб мяса опытных и контрольных животных окрашивались плохо.

В препаратах из поверхностных слоев обнаруживались отдельные колонии (по 1 – 3 в поле зрения микроскопа) кокковой микрофлоры. Микрофлора не выделялась в препаратах из глубоких слоев мышц.

5.3 Доклинические исследования

Переносимость гранул и таблеток Субтилбен, суспензии Лаксубтил исследовали общепринятыми методами. По принципу аналогов для каждого препарата сформированы 4 группы (n=11; опытные – 1 – 3-я, контрольная – 4-я) новорожденных телят черно-пестрой породы массой 31 – 33 кг. В опытных группах Субтилбен и Лаксубтил применяли соответственно из расчета 0,3; 0,6 и 0,9 мг/кг; 5,0; 10,0 и 15,0 мл/кг массы тела (условно-терапевтическая, двух- и трехкратная дозы от условно-терапевтической) в течение 20 суток.

За телятами наблюдали во время опыта и в течение 14 дней после него, учитывая общее состояние, внешний вид, поведенческие реакции, прием пищи и воды, ритм и частоту сердцебиения, количество дыхательных движений.

Перед проведением опыта, а также в 1-ый, на 3-ый, 5-ый, 10-ый, 15-ый и 20-ый день применения Субтилбена и Лаксубтила проводили биохимические исследования крови.

В течение всего экспериментального периода ни одна из применяемых доз Субтилбена и Лаксубтила не оказала отрицательного действия на организм телят, которые были активны и не отставали в развитии и приросте живой массы от контрольных животных.

Ни в опытных, ни в контрольной группах гибели животных не наблюдали. Среднесуточный прирост телят в опытных группах превышал контрольные показатели на 2,9% (Субтилбен – 1-я группа) и 2,5% (Лаксубтил – 1-я группа), 4,1% (Субтилбен – 2- и 3-я группы) и 3,6% (Лаксубтил – 2- и 3-я группы), что свидетельствует о безвредности испытанных пробиотиков, применение которых не оказывает отрицательного влияния на организм телят.

Использование Субтилбена и Лаксубтила в применяемых дозах не вызывало повышения температуры тела и не влияло на характер локомоторной активности, стереотипное поведение и выносливость животных.

Проведенные нами исследования показали, что пробиотики Субтилбен и Лаксубтил позитивно влияют на количество лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина и уровень гематокрита.

Гематологические показатели крови телят как опытных, так и контрольной групп находились в пределах нормы. Повышение количества гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов, уровня гематокрита в крови телят опытных групп в пределах верхних границ физиологической нормы свидетельствует, что изученные пробиотики стимулируют эритропоэз и лейкопоэз, не изменяя стабильности кроветворения и постоянства в составе и общем количестве периферической крови.

Пробиотики Субтилбен и Лаксубтил не оказывают существенного влияния на биохимические показатели крови телят. При воздействии препарата на организм животных все изучавшиеся показатели не претерпевали значительных изменений и существенно не отличались от контрольных, что свидетельствует об отсутствии у Субтилбена и Лаксубтила токсического действия на организм животных.

6 ЭФФЕКТИВНОСТЬ СУБТИЛБЕНА И ЛАКСУБТИЛА ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЭНТЕРИТОВ ТЕЛЯТ

6.1 Профилактическая эффективность

В экспериментальных условиях профилактическая эффективность пробиотиков Субтилбен в форме гранул и Лаксубтил в форме суспензии исследована в сравнении с препаратом-аналогом (Биоспорин) на 2 молочно-товарных фермах, стационарно неблагополучных по инфекционным энтеритам телят.

Субтилбен в дозах 0,2 (1-я группа, n=20), 0,3 (2-я группа, n=20), 0,4 (3-я группа, n=20), 0,5 г/кг массы тела (4-я группа, n=20) и Лаксубтил 3,0 (1-я группа, n=20), 5,0 (2-я группа, n=20), 10,0 (3-я группа, n=20), 15,0 г/кг массы тела (4-я группа, n=20) в течение 10 дней 1 раз в сут телятам выпаивали с молозивом (молоком); Биоспорин (5-я группа, n=20) использовали в соответствии с наставлением по применению.

В течение месяца за животными вели клиническое наблюдение, учитывая общее состояние, прирост массы тела, заболеваемость и сохранность.

Результаты клинических наблюдений свидетельствуют о высокой профилактической эффективности Субтилбена в форме гранул (табл. 5) и таблеток

(табл. 6), Лаксубтила в форме суспензии (табл. 7), выразившейся в предотвращении инфекционных энтеритов телят в оптимальных терапевтических дозах (0,3 г/кг и 5,0 мл/кг массы тела), сохранности и хорошем общем состоянии соответственно 100, 95 и 100% телят, увеличении пророста массы тела. Биоспорин предотвращал заболеваемость телят инфекционными энтеритами в 80 – 85% случаев.

Прирост живой массы животных в опытных группах при применении Субтилбена в формах гранул и таблеток и Лаксубтила в форме суспензии был соответственно на 7,7 – 20%; 4,0 – 11,1 и 7,5 – 17,7% выше, чем в контрольной (соответственно по 120 и 125 г).

Таблица 3 Результаты изучения в эксперименте профилактической эффективности Субтилбена в форме гранул

Показатель	Группа животных				Контроль (Биоспорин)
	1	2	3	4	
	Доза, г/кг массы тела				
	0,2	0,3	0,4	0,5	
Кол-во телят, гол.	20	20	20	20	20
Заболело, гол.	3	–	–	–	4
Пало, гол.	3	–	–	–	4
Среднесуточный прирост, г	130	142	146	150	120
Стоимость 1 дозы препарата, сомони	0,26	0,39	0,52	0,65	0,80
Затраты на профилактику, сомони	52	78	104	130	160
Профилактическая эффективность, %	85	100	100	100	80

Таблица 4 Результаты экспериментального изучения профилактической эффективности Субтилбена в форме таблеток

Показатель	Группа животных				Контроль (Биоспорин)
	1	2	3	4	
	Доза, г/кг массы тела				
	0,2	0,3	0,4	0,5	
Кол-во телят, гол.	20	20	20	20	20
Заболело, гол.	3	1	1	1	3
Пало, гол.	1	–	–	–	2
Среднесуточный прирост, г	125	130	130	135	120
Стоимость 1 дозы препарата, руб	0,28	0,42	0,56	0,70	0,80
Затраты на профилактику, руб	56	84	112	140	160
Профилактическая эффективность, %	85	95	95	95	85

Таблица 5 Результаты изучения в эксперименте профилактической эффективности Лаксубтила в форме суспензии

Показатель	Группа животных				Контроль (Биоспорин)
	1	2	3	4	
	Доза, г/кг массы тела				
	3,0	5,0	10,0	15,0	
Кол-во телят, гол.	20	20	20	20	20
Заболело, гол.	2	–	–	–	3
Пало, гол.	1	–	–	–	3
Среднесуточный прирост, г	135	150	150	160	125
Стоимость 1 дозы препарата, сомони	0,16	0,24	0,32	0,40	0,80
Затраты на профилактику, сомони	32	48	64	80	160
Профилактическая эффективность, %	90	100	100	100	85

Таким образом, профилактическая эффективность пробиотиков Субтилбен в форме гранул и таблеток и Лаксубтил в форме суспензии превышает соответствующий показатель у препарата-аналога (Биоспорин) на 5 – 30%.

При производственном испытании Субтилбена в форме гранул и таблеток и Лаксубтила в форме суспензии на 175 телятах в 5 хозяйствах РРП и Согдийской области в 2009 – 2011 гг. профилактическая эффективность препаратов соответственно составила 95,0; 91,4 и 97,0% (табл. 6).

Таблица 6 Профилактическая эффективность Субтилбена в форме гранул в производственных условиях

Показатель	Группа животных			
	Субтилбен (гранула)	Субтилбен (таблетка)	Лаксубтил (суспензия)	контроль (Биоспорин)
Количество телят, гол.	40	35	100	161
Заболело, гол.	2 (5,0)	3 (3,0)	3 (3,0)	20 (12,5)
Пало, гол.	0	0	0	6 (3,7)
Стоимость 1 дозы препарата, руб	0,39	0,42	0,24	0,80
Затраты на профилактику, руб	156,0	147,0	240	1288
Профилактическая эффективность, %	95,0	91,4	97,0	87,5

Примечание. В скобках указано процентное значение.

Профилактические мероприятия, проводившиеся по схемам, принятым в хозяйствах с применением пробиотика Биоспорин, предотвращали инфекционные энтериты телят (161 гол.) в 85,8 – 88,4%.

Экономическая эффективность при профилактики инфекционных энтеритов телят пробиотиками Субтилбен и Лаксубтилом на одну голову составила 4,2 сомони.

Таким образом, профилактическая эффективность пробиотиков Субтилбен в форме гранул и таблеток и Лаксубтил в форме суспензии в производственных условиях выше соответствующих показателей применяемого в хозяйствах Таджикистана пробиотического препарата Биоспорин, что обуславливает введение разработанных нами пробиотиков в комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий.

6.2 Терапевтическая эффективность

Терапевтическую эффективность пробиотиков Субтилбен в форме гранул и таблеток и Лаксубтил в форме суспензии экспериментально изучили (в сравнении с Биоспорином, который применяли в соответствии с наставлением по применению) на телятах с клиникой диареи, у которых до применения препаратов отмечали угнетение общего состояния, анорексию, учащение пульса и увеличение интенсивности дыхания. На внешние раздражители животные реагировали слабо, были малоподвижными, больше лежали. В первые сутки заболевания наблюдали выделение жидких каловых масс с примесью хлопьев казеина, на 2 – 3 сут – профузный понос с примесью крови и пузырьков газа. При бактериологическом исследовании выделены моно- и ассоциированные патогенные возбудители – *E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris*.

За животными вели клиническое наблюдение, учитывая длительность болезни, выздоровление, сохранение поголовья.

Для определения оптимальных лечебных доз пробиотиков Субтилбен в форме гранул и таблеток и Лаксубтил в форме суспензии 4 группам (n=20) телят (для каждой лекарственной формы препаратов) с клиникой диареи внутрь с молоком вводили Субтилбен в дозах 0,2; 0,3; 0,4 и 0,5 г/кг массы тела и Лаксубтил – 3,0; 5,0; 10,0 и 15,0 мл/кг массы тела 2 раза в сут до выздоровления.

Лечение больных телят проводили непосредственно после появления первых признаков болезни. С этой целью лечение проведено по следующей схеме:

- **первый день** больным телятам выпаивали пробиотик Субтилбен, растворенный в 300 мл воды или молоко или пробиотик Лаксубтил в форме суспензии. Для восстановления водно-солевого равновесия выпаивали три раза регидратационный раствор по 1,2-1,5 л. При этом вторую порцию его смешивали с отваром из семени льна в соотношении 1:0,5. Четвертый раз больным телятам выпаивали 100 мл раствора иммуноглобулинов крови или молозива коровы. Проводили новокаиновую блокаду висцеральных рецепторов брюшной полости 0,5%-ным раствором новокаина из расчета 1 мл/кг массы тела с добавлением пенициллина и стрептомицина по 250 тыс. ЕД.

- **второй день** применяли пробиотики Субтилбен или Лаксубтил в той же дозе два раза в сутки, выпаивали регидратационный раствор смешивая с молозивом или молоком в соотношении 3:1 и выпаивали три раза по 1,2-1,5 л. Четвертый раз выпаивали 100 мл раствора иммуноглобулинов. Проводили новокаиновую блокаду.

• *третий день* применяли пробиотики субтилбен или лаксубтил два раза в сутки, регидратационный раствор смешивали с молозивом в соотношении 2:1 и выпаивали четыре раза по 1,2-1,5 л. Проводили новокаиновую блокаду висцеральных рецепторов брюшной полости.

• *четвертый день* применяли пробиотики Субтилбен или Лаксубтил два раза в сутки, выпаивали четыре раза регидратационный раствор, смешанный с молозивом или молоком в соотношении 1:1 по 1,2-1,5 л. Проводили новокаиновую блокаду висцеральных рецепторов брюшной полости.

• *пятый день* применяли пробиотики Субтилбен или Лаксубтил два раза в сутки, выпаивали четыре раза только молозиво или молоко из расчета 30-40 мл на кг массы тела. Проводили новокаиновую блокаду висцеральных рецепторов брюшной полости.

• *На 6 – 7 – и дни* больных телят лечили только пробиотиками Субтилбен и Лаксубтил

При необходимости проводили симптоматическое лечение больных телят. С этой целью животным внутривенно вводили раствор, содержащий 0,85% хлорида натрия, 0,1% глюконата кальция, 0,4% уротропина и 5% глюкозы. Указанные растворы вводили из расчета 20-30 мл на кг массы тела однократно в течение 4-х дней.

Животные контрольной группы лечили Биоспорином (5-я группа, n=20) в соответствии с наставлением по применению.

Экспериментально установлено, что лечебная эффективность пробиотика Субтилбен в форме гранул (табл. 7) и таблеток (табл. 8) в дозе 0,2 г/кг массы тела составляет соответственно 85,0 и 90,0%. Наиболее эффективным соответственно 95 - 100,0% препарат был в дозах 0,3; 0,4 и 0,5 г/кг массы тела. Препарат сравнения Биоспорин был эффективен в 85,0 и 90,0% случаев.

Таблица 7 Результаты изучения в эксперименте терапевтической эффективности Субтилбена в форме гранул

Показатель	Группа животных				Контроль (Биоспорин)
	1	2	3	4	
	Доза, г/кг массы тела				
	0,2	0,3	0,4	0,5	
Кол-во больных телят, гол.	20	20	20	20	20
Выздоровело, гол.	17	19	19	20	17
Пало, гол.	3	1	1	–	3
Кол-во телят с повторными заболеваниями, гол.	2	–	–	–	3
Продолжительность терапии, сут	5,0	4,0	4,0	4,0	6,2
Терапевтическая эффективность, %	85	95	95	100	85

Таблица 8 Результаты экспериментального изучения лечебной эффективности Субтилбена в форме таблеток

Показатель	Группа животных				Контроль (Биоспорин)
	1	2	3	4	
	Доза, г/кг массы тела				
	0,2	0,3	0,4	0,5	
Кол-во больных телят, гол.	20	20	20	20	20
Выздоровело, гол.	18	19	19	20	18
Пало, гол.	2	1	1	–	2
Кол-во телят с повторными заболеваниями, гол.	1	–	–	–	3
Продолжительность терапии, сут	5,5	4,2	4,0	4,0	6,2
Терапевтическая эффективность, %	90	95	95	100	90

Функции органов пищеварения при применении Субтилбена в форме гранул у телят 1-ой опытной группы нормализовались на 5,0 сут, 2 – 4-ой – на 4 день, контрольной – 6,2 сут. Субтилбен в форме таблеток нормализовал работу ЖКТ телят 1-ой группы через 5,5 дня, 2-ой – 4,2 сут, 3-ей и 4-ой – 4 дня. В контрольной группе соответствующий показатель составил 6,2 дня.

Более высокий лечебный эффект отмечен в группе телят, получавших Лаксубтил, применение которого способствовало улучшению общего состояния животных, повышению аппетита, нормализации температуры тела.

Терапевтическая эффективность Лаксубтила в дозе 3,0 мл/кг массы тела – 95,0%, а в дозах 5,0; 10,0 и 15,0 мл/кг массы тела – 100%. В контроле (Биоспорин) соответствующий показатель – 85%. Продолжительность лечения Лаксубтилом в дозе 3,0 г/кг массы тела составила 6,0, в дозах 5,0; 10,0 и 15,0 мл/кг массы тела – 4,0, в контрольной группе (Биоспорин) – 6,2 дня (табл. 9).

Таблица 9 Результаты изучения в эксперименте терапевтической эффективности Лаксубтила в форме суспензии

Показатель	Группа животных				Контроль (Биоспорин)
	1	2	3	4	
	Доза, мл/кг массы тела				
	3,0	5,0	10,0	15,0	
Кол-во больных телят, гол.	20	20	20	20	20
Выздоровело, гол.	19	20	20	20	17
Пало, гол.	1	–	–	–	3
Кол-во телят с повторными заболеваниями, гол.	2	–	–	–	3
Продолжительность терапии, сут	5,0	4,0	4,0	4,0	6,2
Терапевтическая эффективность, %	95	100	100	100	85

Таким образом, результаты экспериментального изучения терапевтической эффективности свидетельствуют о целесообразности применения пробиотиков Субтилбен в форме гранул и таблеток в дозе 0,3 г/кг массы тела и Лаксубтил в форме суспензии в дозе 5,0 мл/кг массы тела в производственных условиях для лечения инфекционных энтеритов телят.

Производственную проверку пробиотиков Субтилбен в формах гранул и таблеток и Лаксубтил в форме суспензии провели в 11 хозяйствах РТ на соответственно 542, 527 и 240 больных диареей телятах, которым препараты выпаивали с молозивом (молоком) в дозах 0,3 г/кг массы тела (Субтилбен в форме гранул и таблеток) и 5,0 мл/кг массы тела (Лаксубтил в форме суспензии) 2 раза в сут до выздоровления. Больных телят лечили по выше предложенной схеме.

За подопытными животными вели клиническое наблюдение: учитывали длительность болезни, выздоровление, сохранность поголовья.

Применение пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил по предложенной схеме способствовало улучшению общего состояния животных, повышению аппетита, нормализации температуры тела. Более высокий терапевтический эффект отмечен в группах телят, получавших разработанные нами пробиотики (Субтилбен в форме гранул – 90,0 – 94,8%, Субтилбен в форме таблеток – 91,3 – 93,0%, Лаксубтил в форме суспензии – 90,9 – 92,9%). Биоспорин был эффективен в 80,0 – 83,3% случаев.

Экономическая эффективность при лечении больных телят в расчете на одну голову составила 5,4 рублей.

Таким образом, результаты производственных испытаний свидетельствуют о высокой лечебной эффективности пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил при инфекционных энтеритах телят. Пероральное применение этих препаратов в комплексе с ветеринарно-санитарными мероприятиями обеспечивает сохранность 90,0 – 94,8% больных животных.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что инфекционные энтериты телят широко распространены в животноводческих хозяйствах Республики Таджикистан и в возникновении этих болезней большую роль играют *E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris* как в отдельности, так и в ассоциации. Основным источником патогенов являются больные и клинически здоровые животные - бактерионосители.

2. Отобраны штаммы *Vac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 для изготовления пробиотиков и изучены их морфологические, культуральные и биологические свойства.

3. Разработана эффективная питательная среда для выращивания *Vac. subtilis*, состоящая из 0,25% пептона, 0,25% картофельного крахмала, 0,125% глюкозы, 0,01% хлорида натрия и 10% минеральные и растительные вещества.

4. Установлено, что модифицированный контактно-сорбционный метод обезвоживания является эффективным способом получения сухой биомассы штаммов *Vac. subtilis* для изготовления пробиотиков.

5. Разработанный пробиотик Субтилбен на основе штаммов *Vac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 обладает высоким антибактериальным дей-

ствием: бактериостатическая и бактерицидная активность Субтилбена в отношении возбудителей инфекционных энтеритов проявляется в концентрациях соответственно 0,3 – 0,6 и 0,6 – 1,2 мг/мл.

6. Разработанный пробиотик Лаксубтил на основе штаммов *Vac. subtilis* BS TJ 09 и BS TJ Д 26 в отношении *E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris* проявлял высокую бактериостатическую (7,6 – 15,2 млн м.к./мл) и бактерицидную активность (15,6 – 31,2млн м.к./мл).

7. Показано, что бактерицидная активность пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил в отношении моновозбудителей проявлялась в концентрациях соответственно 7,6 – 15,2 млн м.к./мл и 15,6 – 31,2млн м.к./мл, тогда как в отношении ассоциаций возбудителей инфекционных энтеритов телят – 31,2 – 62,5млн м.к./мл и 62,5 млн м.к./мл.

8. Воспроизводимость разработанных технологий подтверждена предложенными методами качественного и количественного определения физико-химических и биологических свойств пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил.

9. Установлено, что пробиотики Субтилбен и Лаксубтил относятся к нетоксическим лекарственным средствам и в 10-кратных терапевтических дозах не оказывают отрицательного действия на организм животных. При воздействии разработанных пробиотиков на культуры инфузории *Colpoda steinii* свыше 80% стилехоний остаются активными.

10. Пробиотики Субтилбен и Лаксубтил не оказывают существенного влияния на гематологические и биохимические показатели крови телят.

11. Наилучший профилактический эффект достигается при пероральном применении пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил в дозах соответственно 0,3 – 0,5 г/кг и 5 – 10 мл/кг массы тела 1 раз в сутки в течение 10 дней. Результаты производственных испытаний показали, что профилактическая эффективность этих пробиотиков составляет 95 – 97%.

12. Отработан рациональный способ применения пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил при лечении инфекционных энтеритов телят и показано, что пероральное их применение в дозах 0,3 – 0,4 г/кг и 5 мл/кг массы тела 2 раза в день до выздоровления, соответственно обеспечивает сохранность 94,8% телят.

13. Экономическая эффективность пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил в расчете на один сомони затрат при профилактике и лечении инфекционных энтеритов телят составила 4,8 рублей, что в 1,5 раза больше, чем соответствующий показатель препарата-аналога.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Инструкция по изготовлению и контролю иммунобиотика Субтилбен для профилактики и лечения желудочно-кишечных и респираторных болезней животных и пчел (утв. ГУВ МСХ РТ 25.11.2004 г.);

2. Технические условия на иммунобиотик Субтилбен (утв. ГУВ МСХ РТ 25.11.2004 г.);

3. Наставление по применению иммунобиотика Субтилбен для профилактики и лечения желудочно-кишечных и респираторных болезней животных и пчел (утв. ГУВ МСХ РТ 25.11.2004 г.);

4. Решение 26-го заседания Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ от 24.11.2004 г. (Душанбе) о практическом использовании препарата Субтилбен в ветеринарной практике СНГ;

5. Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации колибактериоза новорожденных животных (утв. СГВН МСХ РТ, 2009 г.);

6. Инструкция о мероприятиях по борьбе с сальмонеллезом новорожденных животных (утв. СГВН МСХ РТ, 2009 г.);

7. Научно-обоснованная система получения здорового молодняка и профилактики желудочно-кишечных болезней новорожденных телят (утв. СГВН МСХ РТ, 11.09.2012 г.);

8. Рекомендации по применению пробиотиков для профилактики и лечения пневмонитов телят (утв. СГВН МСХ РТ, 11.09.2012 г.);

9. Инструкция по изготовлению и контролю пробиотического препарата Лаксубтил (утв. СГВН МСХ РТ 11.09.2012 г.);

10. Технические условия на пробиотик Лаксубтил (утв. СГВН МСХ РТ 11.09.2012 г.);

11. Наставление по применению пробиотика Лаксубтил (утв. СГВН МСХ РТ 11.09.2012 г.).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Подбор штаммов *Bac. subtilis* для изготовления пробиотиков / И.Т. Сатторов, Н.Р. Хасанов, З.С. Каландаров, Н. Сатторов, А. Сафаралиев // Кишоварз / ТАУ. – Душанбе, 2006. – №4. – С. 29 – 31.

2. Истифодаи штаммиҳои мухталифи *Bacillus subtilis* барои тайёр намудани пробиотики Субтилбен / И.Т. Саттори, Н.Р. Сатторов, Н.Р. Хасанов, А. Сафаралиев // Кишоварз / ТАУ. – 2008. – №1. – С. 12 – 13.

3. Сравнительная оценка эффективности разных методов лечения маститов и эндометритов у дойных коров / Н.Р. Хасанов, Т. Давлатмуродов, Н. Сатторов, С. Баротов // Кишоварз / ТАУ. – Душанбе, 2009. – №4 (44). С. 21-23.

4. Комплексные антибактериальные препараты и их эффективность при болезнях животных / И. Саттори, Н.Р. Хасанов, Ш.А. Турдиев, Н.Р. Сатторов // Доклады ТАСХН. – Душанбе, 2009. – №1 (19). – С. 40 – 43.

5. Саттори И. Изучение противомикробных свойств пробиотика Лаксубтил / И. Саттори, Н.Р. Сатторов, М.М. Каримов // Овцы, козы и шерстяное дело. – М., 2009. – №4. – С. 78 – 80.

6. Сатторов Н.Р. Распространение мастита и эндометрита КРС в животноводческих хозяйствах Республики Таджикистан / Н.Р. Сатторов, С.Т. Баротов // Кишоварз / ТАУ. – Душанбе, 2009. – №3. – С. 16 – 18.

7. Координационное соединение меди (II) с дибазолом, проявляющее противомикробную активность / Н.Р. Хасанов, И. Саттори, Н.Р. Сатторов, Н.Ф. Шеров, З.Н. Юсупов, У.Р. Раджабов, Р.Б. Имомов // Вестн. Таджикского национального университета. – №3 (59). – Душанбе, 2010. – С. 200 – 204.

8. Сатторов Н.Р. Изменение морфологических и биохимических показателей крови коров в зависимости от применения оптимального способа и дозы пробиотика при лечении субклинического мастита / Н.Р. Сатторов, Н.Р. Хасанов, С.Т. Баротов // Кишоварз / ТАУ. – 2010. – №3. – С. 29 – 31.

9. Синтез, идентификация и биологические свойства координационных соединений Fe (II) и Cu (II) с азолами / И. Саттори, Н.Р. Сатторов, З.Н. Юсупов, У. Раджабов // Естественные и технические науки. – М., 2011. – №3. – С. 52 – 56.

10. Сатторов Н.Р. Изучение острой токсичности пробиотического препарата Лаксубтил / Н.Р. Сатторов, Н.Р. Хасанов, М. Каримов // Кишоварз / ТАУ. – 2012. – №3. – С. 22 – 23.

11. Сатторов Н.Р. Изучение хронической токсичности препарата Лаксубтил / Н.Р. Сатторов, Н.Р. Хасанов // Кишоварз / ТАУ. – 2012. – №3. – С. 28 – 29.

12. Сатторов Н.Р. Доклиническое исследование пробиотика Лаксубтил / Н.Р. Сатторов // Кишоварз / ТАУ. – 2012. – №4. – С. 22 – 23.

13. Технология изготовления Субтилбена в форме таблеток / Ш.Х. Саидов, И. Сатторов, Н.Р. Хасанов, Н.Р. Сатторов // Кишоварз / ТАУ. – 2012. – №3. – С. 85 – 86.

14. Эффективность микробных препаратов при сальмонеллезе телят / И. Саттори, Ш.Х. Саидов, Н.Р. Хасанов, Н.Р. Сатторов // Кишоварз / ТАУ. – 2012. – №3. – С. 31 – 32.

15. Сатторов Н.Р. Эффективность пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* при профилактике смешанных инфекционных энтеритах телят / Н.Р. Сатторов // Известия ТСХА. - 2013. - № 1.

Патенты

16. Пат. ТД 386 Республика Таджикистан. Способ профилактики рота-, коронавирусного энтерита и колибактериоза телят, протекающих в ассоциации / Сатторов И.Т., Махмудов К.Б., Хамдамов А.Ш., Сатторов Н.Р., Коромыслов Г.Ф., Гоголев М.М., Соколова Н.Л.; заявитель и патентообладатель – Таджикский научно-исследовательский ветеринарный институт; заявл. 02.09.2000; опубл. 2002, Бюл. №2 (26).

17. Пат. ТД 403 Республика Таджикистан. Дифаферол, проявляющий противомикробную активность / Рачабов У., Юсупов З.Н., Сатторов И.Т., Махмудов К.Б., Турдиев Ш.А., Сатторов Н.Р., Имомов Р.Б., Болтаев С.П.; заявитель и патентообладатель – Таджикский государственный национальный университет, Таджикский научно-исследовательский ветеринарный институт; заявл. 04.04.2003; опубл. 2005, Бюл. №37.

18. Пат. ТД 404 Республика Таджикистан. Дибакупрол, проявляющий антибактериальную и антигрибковую активность / Юсупов З.Н., Рачабов У., Сат-

торов И.Т., Имомов Р.Б., Турдиев Ш.А., Махмудов К.Б., Сатторов Н., Давлатмуродов Т., Зухуров А.; заявитель и патентообладатель – Таджикский государственный национальный университет, Таджикский научно-исследовательский ветеринарный институт; заявл. 12.03.2004; опубл. 2005, Бюл. №37.

19. Пат. ТД 406 Республика Таджикистан. Препарат Витагин для лечения эндометритов у коров / Сатторов И.Т., Мирзахметов Ш.Р., Юсупов З.Н., Турдиев Ш., Сатторов Н., Давлатмуродов Т., Раджабов У., Хасанов Н.Р.; заявитель и патентообладатель – Сатторов И.Т.; заявл. 13.08.2004; опубл. 2005, Бюл. №37.

20. Пат. ТД 406 Республика Таджикистан. Препарат Лактовит для лечения маститов у коров / Сатторов И.Т., Мирзахметов Ш.Р., Юсупов З.Н., Турдиев Ш., Сатторов Н., Давлатмуродов Т., Раджабов У., Хасанов Н.Р.; заявитель и патентообладатель – Сатторов И.Т.; заявл. 13.08.2004; опубл. 2005, Бюл. №37.

21. Пат. ТД 531 Республика Таджикистан. Способ получения биопрепарата Лаксубтил / Саттори И., Сатторов Н.Р., Турдиев Ш.А., Хасанов Н.Р., Каримов М.М., Сафаралиев А.Р., Баротов С.Т., Юсупов М.М.; заявитель и патентообладатель – Саттори И.; заявл. 18.04.2012; опубл. 2012, Бюл. №79.

22. Пат. ТД Республика Таджикистан. Пробиотик Субтилгин для профилактики и лечения маститов и эндометритов у коров/ Сатторов Н.Р., Баротов С.Т.; заявл. 1300772; опубл. 2013,

23. Пат. ТД Республика Таджикистан. Способ применения пробиотика Субтилбен для профилактики и лечения инфекционных энтеритах телят./Сатторов Н.Р.; заявл. 1300773; опубл. 2013,

Статьи в других изданиях

24. Физико-химические и биологические особенности координационного соединения дигаферол / И.Т. Сатторов, К.Б. Махмудов, Н.Р. Сатторов, З.Н. Юсупов, У.Р. Раджабов, Р.Б. Имомов // Актуальные проблемы болезней животных в современных условиях: матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 60-летию ТажНИВИ – Душанбе, 2003. – С. 145 – 146.

25. Способ определения состава и получения противомикробных препаратов / И.Т. Сатторов, Н.Р. Сатторов, Ш.А. Турдиев, З.Н. Юсупов, У. Раджабов // Мониторинг распространения и предотвращения особо опасных болезней животных: матер. II Междунар. науч. конф. – Самарканд, 2004. – С. 200 – 201.

26. Саттори И. Рациональный способ сушки иммунобиотика Субтилбен на минеральных и растительных адсорбентах / И. Саттори, Н.Р. Сатторов, Н.Р. Хасанов // Матер. науч.-производ. конф. молодых ученых, посвящ. 15-летию независимости РТ, 2700-летию г. Куляба, 75-летию ТАУ и 100-летию У. Рахматзода. – Душанбе 2006. – С. 40 – 41.

27. Хасанов Н.Р. Усули бо этимоди пешгирии колибактериозии гусолахон навзод / Н.Р. Хасанов, Н.Р. Сатторов // Матер. науч.-производ. конф. молодых ученых, посвящ. 15-летию независимости РТ, 2700-летию г. Куляба, 75-летию ТАУ и 100-летию У. Рахматзода. – Душанбе, 2006. – С. 36 – 37.

28. Хасанов Н.Р. Усули самарабахши парвариши *Vac. subtilis* / Н.Р. Хасанов, Н.Р. Сатторов // Матер. науч.-производ. конф. молодых ученых, посвящ.

15-летию независимости РТ, 2700-летию г. Куляба, 75-летию ТАУ и 100-летию У. Рахматзода. – Душанбе, 2006. – С. 37.

29. Хасанов Н.Р. Этиологияи беморихои омехтаи узвҳои ҳозима ва нафақашии гусолаҳо / Н.Р. Хасанов, Н.Р. Сатторов // Матер. науч.-производ. конф. молодых ученых, посвящ. 15-летию независимости РТ, 2700-летию г. Куляба, 75-летию ТАУ и 100-летию У. Рахматзода. – Душанбе, 2006. – С. 38 – 39.

30. Хасанов Н.Р. Смешанное течение эндометритов и маститов у коров на молочно-товарных фермах республики / Н.Р. Хасанов, Т.М. Давлатмуродов, Н.Р. Сатторов // Пути устойчивого развития сельского хозяйства: Междунар. науч. конф. – Душанбе, 2007. – С. 32 – 34.

31. Саттори И. Профилактическая эффективность пробиотика Лаксубтил при желудочно-кишечных болезнях телят / И. Саттори, Н.Р. Сатторов, М.М. Каримов // Биобезопасность и зоонозные инфекции: матер. I ежегод. конф. Ассоциации Биологической Безопасности Центральной Азии. – Алматы, 2009. – С. 65. – 66. -

32. Сатторов Н.Р. Применение пробиотика Лаксубтил при пневмоэнтерите телят / Н.Р. Сатторов, Ш.А. Турдиев, М. Каримов // Тр. Сумского национального аграрного университета. – Сумы, 2010. – С. 33 – 34.

33. Сатторов Н.Р. Эффективность Лактопита при лечении мастита коров в сухостойном периоде / Н.Р. Сатторов, С.Т. Баротов // Чавонон ва илми муосир. – Душанбе, 2010. – С. 358 – 361.

34. Саттори И. Изучение параметров острой токсичности пробиотического препарата Лаксубтил / И. Саттори, Н.Р. Сатторов, М.М. Каримов // Науч.-техн. бюлл. – Львов, 2011.

35. Сатторов Н.Р. Рациональный способ сушки культуры *Vac. subtilis* контактно-сорбционным методом / Н.Р. Сатторов // Вестн. Сумского национально-гоаграрного университета. – Сумы, 2011. – №1 (28). – С. 66 – 68.

36. Sattori I. Application of useful microorganisms for correction of natural microflora / I. Sattori, N.R. Sattorov // Research and Clinical Application of Traditional Medicine in Xinjiang and Neighboring Countries in Past and Present: Material Conference: abstracts. – Xinjiang, 2011. – P. 30 – 34.

37. Sattorov N.R. Etiological role of bacterial agents in the occurrence of infectious pneumoenteridies calves / N.R. Sattorov // International Scientific-Practical Conference «Veterinary Problems of Central Asia – Food Security: The Use of Modern Ways of Diagnostics and Prophylaxis of Infectious Diseases of Animals», devoted to the 20 anniversary of the Independence of the Republic of Tajikistan and the 80th anniversary of Tajik Agrarian University named after Shirinsho Shotemur. – Dushanbe, 2011. – P. 23 – 24.

Учебно-методические пособие и рекомендации

38. Методические указания. Комплексный антибактериальный препарат «Шодмон» / Н.Р. Сатторов - Типография ТАУ, Душанбе 2003 г. - 15 с.

39. Методические рекомендации по изучению клостридиозов животных и меры борьбы с ними / Н.Р. Хасанов, Н. Р. Сатторов, Т.М. Давлатмуродов, С.Т. Баротов - Типография ТАУ Душанбе 2012. - 64 с.

40. Методические рекомендации по изучению стрептококкозов животных и меры борьбы с ними / Н.Р. Хасанов, Н. Р. Сатторов, Т.М. Давлатмуродов, С.Т. Баротов - Типография ТАУ, Душанбе 2012. - 24с.

Учебники для ВУЗов

41. Саттори, И. Учебник по ветеринарной микробиологии // И. Саттори., Н.Р. Сатторов, Н.Р. Хасанов. - Типография ТАУ, Душанбе 2010, 191 с.

42. Саттори, И. Учебник по частной ветеринарной микробиологии // И. Саттори., Н.Р. Сатторов, Н.Р. Хасанов. - Типография ТАУ, Душанбе 2010, 189 с.

43. Саттори, И. Учебник по ветеринарной иммунологии // И. Саттори., Н.Р. Сатторов, Н.Р. Хасанов. - Типография ТАУ, Душанбе 2010, 122 с.

Формат издания 60x84 1/16, V 2,0 п.л, тир.100 экз, заказ А46
Отпечатано в типографии И.П.Чермяниной А.П.