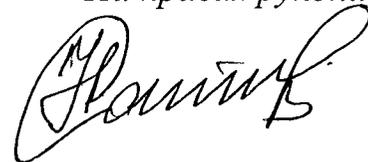


ТАДЖИКСКИЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. Ш. ШОТЕМУРА

*На правах рукописи*



05201351304

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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

**Научный консультант:**

доктор ветеринарных наук,  
профессор, академик

**И. Саттори**

Душанбе– 2013

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СОКРАЩЕНИЯ, ПРИНЯТЫЕ В РАБОТЕ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>14</b>
1.1. Распространение и ущерб от инфекционных энтеритов телят	14
1.2. Пробиотические и пребиотические препараты.....	17
1.3. Отбор микроорганизмов в состав пробиотиков ветеринарно- го назначения.....	24
1.4. Производство пробиотических препаратов.....	34
1.4.1. Пробиотики из бифидо- и лактобактерий.....	34
1.4.2. Пробиотики на основе бактерий рода <i>Bacillus</i> .....	39
1.5. Лекарственные формы пробиотиков.....	47
1.6. Механизм действия пробиотиков.....	52
1.7. Лечебно-профилактическая эффективность пробиотиков....	62
1.8. Перспективы использования пробиотиков в ветеринарии....	65
<b>СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>73</b>
<b>2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>73</b>
2.1. Диагностические исследования.....	73
2.2. Штаммы <i>Bac. subtilis</i> .....	74
2.3. Биологические свойства пробиотиков.....	75
2.3.1. Антимикробная активность.....	75
2.3.2. Токсикологические свойства.....	75
2.4. Методы стандартизации действующих веществ в форме по- рошков и лекарственных препаратов на основе <i>Bac. subtilis</i> ....	80
2.4.1. Физико-химические свойства.....	80
2.4.2. Биологические свойства.....	81
2.5. Определение стабильности .....	82
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>84</b>
<b>3. ИНФЕКЦИОННЫЕ ЭНТЕРИТЫ ТЕЛЯТ.....</b>	<b>84</b>

<b>3.1. Эпизоотическая ситуация в Северном, Центральном и Южном Таджикистане.....</b>	<b>84</b>
<b>3.2. Эпизоотическая ситуация в хозяйствах северо-восточного региона Украины.....</b>	<b>85</b>
<b>3.3. Факторы, способствующие возникновению инфекционных энтеритов телят.....</b>	<b>86</b>
<b>4. ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРОБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ BAC. SUBTILIS.....</b>	<b>87</b>
<b>4.1. ПОДБОР ШТАММОВ BAC. SUBTILIS.....</b>	<b>87</b>
<b>4.1.1. Морфологические, культуральные и биохимические свойства.....</b>	<b>87</b>
<b>4.1.2. Патогенность и антагонистические свойства.....</b>	<b>101</b>
<b>4.2. МОДИФИЦИРОВАННАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ BAC. SUBTILIS.....</b>	<b>105</b>
<b>4.3. СУШКА БАКТЕРИАЛЬНОЙ СУСПЕНЗИИ МОДИФИЦИРОВАННЫМ КОНТАКТНО-СОРБЦИОННЫМ МЕТОДОМ.....</b>	<b>109</b>
<b>4.4. СУБТИЛБЕН В ФОРМЕ ПОРОШКА.....</b>	<b>110</b>
<b>4.4.1. Состав и технология производства.....</b>	<b>110</b>
<b>4.4.2. Антимикробная активность.....</b>	<b>113</b>
<b>4.4.3. Токсикологические свойства.....</b>	<b>117</b>
<b>4.4.3.1. Острая токсичность.....</b>	<b>118</b>
<b>4.4.3.2. Хроническая токсичность.....</b>	<b>119</b>
<b>4.4.3.3. Раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки</b>	<b>119</b>
<b>4.4.4. Стандартизация и стабильность.....</b>	<b>120</b>
<b>4.4.5. Упаковка и маркировка.....</b>	<b>127</b>
<b>4.5. СУБТИЛБЕН В ФОРМЕ ГРАНУЛ И ТАБЛЕТОК.....</b>	<b>128</b>
<b>4.5.1. Состав и технология производства.....</b>	<b>128</b>
<b>4.5.2. Стандартизация и стабильность.....</b>	<b>133</b>
<b>4.6. ЛАКСУБТИЛ В ФОРМЕ СУСПЕНЗИИ.....</b>	<b>136</b>
<b>4.6.1. Композиция и технология изготовления.....</b>	<b>136</b>

4.6.2. Стандартизация и стабильность.....	141
<b>5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОБИОТИКОВ НА ОС- НОВЕ BAC. SUBTILIS.....</b>	<b>142</b>
5.1. Антимикробная активность.....	142
5.1.1. Субтилбен.....	142
5.1.2. Лаксубтил.....	145
5.2. Токсикологические свойства.....	147
5.2.1. Безвредность.....	147
5.2.2. Острая токсичность.....	150
5.2.3. Хроническая токсичность.....	151
5.2.4. Раздражающее действие и аллергенное свойство.....	152
5.2.5. Влияние Субтилбена и Лаксубтила на качество мяса.....	153
5.3. Доклиническое исследование.....	155
5.4. Стандартизация и контроль качества пробиотиков на основе штаммов B. subtilis.....	160
5.4.1. Субтилбен в форме гранул и таблеток.....	160
5.4.2. Лаксубтил в форме суспензии.....	162
5.5. Стабильность.....	164
5.5.1. Субтилбен в форме гранул и таблеток.....	164
5.5.2. Лаксубтил в форме суспензии.....	164
<b>6. ЭФФЕКТИВНОСТЬ СУБТИЛБЕНА И ЛАКСУБТИЛА ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЭНТЕ- РИТОВ ТЕЛЯТ.....</b>	<b>169</b>
6.1. Профилактическая эффективность.....	169
6.1.1. Определение профилактической эффективности пробио- тиков Субтилбен и Лаксубтил в эксперименте.....	169
6.1.2. Производственная проверка профилактической эффектив- ности пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил.....	171
6.2. Терапевтическая эффективность.....	173

<i>6.2.1. Экспериментальное определение лечебной эффективности пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил.....</i>	173
<i>6.2.2. Производственные испытания Субтилбена и Лаксубтила.</i>	176
<b>6.3. Экономическая эффективность пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил при инфекционных энтеритах телят.....</b>	178
<b>ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	180
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	194
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....</b>	196
<b>ЛИТЕРАТУРА.....</b>	197
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ.....</b>	249

## СОКРАЩЕНИЯ, ПРИНЯТЫЕ В РАБОТЕ

- БАВ – биологически активные вещества
- ВИ – Ветеринарный институт
- ГММО – генетически модифицированный микроорганизм
- ГУВ – Главное управление ветеринарии
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДХ – дехканское хозяйство
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- КРС – крупный рогатый скот
- ЛФ – лекарственная форма
- МБсК – минимальная бактериостатическая концентрация
- МБцК – минимальная бактерицидная концентрация
- м.к. – микробная клетка
- МКПБ – модифицированный картофельный питательный бульон
- МПА – мясопептонный агар
- МПБ – мясопептонный бульон
- МППБ – мясопептонный печеночный бульон
- МСХ – Министерство сельского хозяйства
- МТФ – молочно-товарная ферма
- НПА – научно-производственная ассоциация
- НПИЦентр – Национальный патентно-информационный центр
- НЦВД – Национальный центр ветеринарной диагностики
- ОАО – открытое акционерное общество
- ОХ – общественное хозяйство
- ПК – производственный кооператив
- ПХ – племенное хозяйство
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РРП – районы республиканского подчинения
- РТ – Республика Таджикистан

СГВН – Служба государственного ветеринарного надзора

ТаджНИВИ – Таджикский научно-исследовательский ветеринарный институт

ТАСХН – Таджикская академия сельскохозяйственных наук

ТАУ – Таджикский аграрный университет им. Ш. Шотемура

ТЛ – термолабильный

ТС – термостабильный

УПХ – учебно-производственное хозяйство

ЦНС – центральная нервная система

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** В ветеринарной медицине, при терапии и профилактике инфекционных заболеваний и стресса, широко используют пробиотики – препараты, в состав которых входят живые микроорганизмы – естественные обитатели кишечного тракта теплокровных или сапрофиты, обитающие во внешней среде. Пробиотические препараты, которые безвредны, являются экологически чистыми и не имеют противопоказаний для применения, могут стать альтернативой антибиотикам [91, 109, 160, 168, 247, 256, 378].

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 [203, 208, 216, 218, 221].

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*, где наряду с их полной безвредностью, обусловлена высокая антагонистическая 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. [23, 143].

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 [145, 153].

Для более длительного сохранения физико-химических и лечебных свойств пробиотики 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. [17, 21, 100, 280, 468].

Большинство недостатков, свойственных производству пробиотиков в ампулах или флаконах, исключит серийный выпуск пробиотиков в порошках, жидкой, таблеточной и других лекарственных формах (ЛФ), упакованных во вмещающие большое количество доз емкости, что позволит применять эти препараты для терапии и профилактики инфекционных заболеваний, разных видов сельскохозяйственных животных и птиц [413].

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 [17, 91, 143, 145, 208, 247, 256, 280]

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

Для достижения указанной цели решены следующие задачи:

1. Изучить эпизоотическую ситуацию по инфекционным энтеритам телят в хозяйствах Республики Таджикистан и северо-восточном регионе Украины.

2. Отобрать и изучить морфологические, культуральные, биохимические, физиолого-биологические свойства, патогенность и антагонистиче-

скую 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 пробиотического препарата Субтилбен и Лаксубтил 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 антимикробные свойства в отношении тест-культур микроорганизмов в низких концентрациях (3,9 – 31,2 млн м.к./мл) и характеризующиеся типичными для *Bac. subtilis* физиолого-биологическими свойствами, которые обуславливают более широкий диапазон действия при сочетанном применении этих штаммов.

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

Разработаны составы и технологии производства пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26. Изучены антагонистическая активность, токсикологические свойства, проведены доклинические исследования этих препаратов. Предложены методы контроля пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил, изучена их стабильность.

В эксперименте отработана рациональная схема применения пробиотиков Субтилбен в форме гранул и таблеток и Лаксубтил, в форме суспензии при профилактике и терапии инфекционных энтеритов телят. При производственных испытаниях, сконструированных препаратов, установлена их высокая лечебно-профилактическая и экономическая эффективность, которая превосходит таковую у препаратов-аналогов.

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 *Bac. subtilis* в технологическом процессе при выращивании молодняка крупного рогатого скота, начиная с первых дней жизни, что повы-

сит уровень неспецифической резистентности, иммунный статус, сохранность телят и прирост живой массы.

Материалы работы используются в учебном процессе на кафедре «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 *Bac. subtilis*, отобранных для производства на их основе пробиотиков.

3. Результаты изыскания эффективной питательной среды для культивирования *Bac. subtilis*.

4. Технология сушки биомассы *Bac. subtilis* контактно-сорбционным методом.

5. Технология изготовления пробиотического препарата Субтилбен и результаты изучения его свойств.

6. Технология изготовления пробиотика Лаксубтил и результаты исследования его свойств.

7. Результаты доклинических исследований пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил.

8. 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 – 2011 гг.); республиканских научно-

практических конференциях и семинарах-совещаниях (Душанбе, 2006 – 2011 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) Фотиной Татьяне Ивановне за консультационную, методическую и практическую помощь в проведении исследований.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Распространение и ущерб от инфекционных энтеритов телят

Желудочно-кишечные и респираторные болезни бактериальной и вирусной этиологии у телят занимают ведущее место в этиологии болезней крупного рогатого скота. При традиционной технологии скотоводства на долю желудочно-кишечных болезней приходится 55 – 70%, при промышленной – до 100%, всех случаев заболевания телят. На долю болезней дыхательной системы соответственно – 33,2 – 44,0% и свыше 60% всех случаев заболеваний телят. В настоящее время, желудочно-кишечные и респираторные болезни вирусно-бактериальной этиологии КРС, широко распространены в мире [1, 10, 96, 149, 191, 229, 362, 384, 386, 389].

Заболеваемость и отход молодняка, особенно в первом месяце жизни, наносят большой ущерб, несмотря на значительные успехи, достигнутые наукой и производственной практикой в разработке эффективных лечебно-профилактических средств. Около 15 – 20% молодняка КРС хозяйств, который в первые дни жизни гибнет из-за желудочно-кишечных и легочных заболеваний, не поступает на мясоперерабатывающие предприятия. Обычно на крупных комплексах отход телят больше, чем на малых фермах [2, 3, 31, 37, 66, 108, 139, 154, 248, 254, 270, 290, 291, 343, 479].

Экономический ущерб, причиняемый инфекционными энтеритами вирусно-бактериальной этиологии, очень велик. В отдельных хозяйствах гибель телят в совокупности с вынужденным убоем достигает до 70%. Приросты у больных и переболевших животных снижаются в 2 – 3 раза. При дальнейшей эксплуатации у переболевших животных не всегда полностью развивается функциональная деятельность репродуктивных органов и молочной железы. В 8% случаев у них отмечается бесплодие и снижение молочной продуктивности, вследствие гипогалактии, атрофии или индурации вымени, что в конечном итоге приводит к преждевременной выбраковке до 60% коров. Кроме этого, лечение инфекционных энтеритов

телят и их последствий связано с большими затратами. Болезни этой группы могут приводить к снижению экономической эффективности скотоводства на 20 – 30% [5, 33, 35, 66, 77, 75, 78, 85, 123, 154, 277, 283, 285, 286, 353, 354, 479].

Широкое распространение инфекционных энтеритов молодняка наносит огромный ущерб сельскохозяйственному производству, сдерживает развитие животноводства, служит одной из причин снижения продуктивности и племенных качеств животных, высокого процента вынужденного убоя и падежа, больших затрат на лечение и профилактику. Летальность и вынужденный убой составляет от 5 до 70%, от количества заболевших телят [54, 88, 92, 99, 102, 111, 112, 132, 140, 142, 147, 151, 153, 335, 352, 391].

Желудочно-кишечные заболевания («диспепсия», «аутоиммунная диспепсия», «гастроэнтериты телят», «гастроэнтероколиты телят» и т.д.) протекают с клиникой профузных поносов, сгущением крови, характеризуются угнетением иммунной системы и нарушениями обменных процессов организма, обуславливают расстройства кровообращения и газообмена с нарастающей дыхательной недостаточностью и интоксикацией организма. [3, 101, 103, 275, 279, 325, 356].

Летальность среди телят в первые 3 месяца жизни по результатам исследований, проведенных на 3 фермах Туниса, составила в среднем 23,6%, а по каждой ферме – 25,9; 26,7 и 15,2%. Установлено, что 34,4% приходилось на падеж от респираторных, 24,5 – желудочно-кишечных заболеваний, 20,5 – на мертворожденных и 14,7% – из-за септицемии. В среднем, по фермам уровень падежа, в зависимости от возраста телят, составил: 4,86% – новорожденных, 0,68% – до 4 дней, 4,63% – 5 – 21-го дня, 1,16% – 22 – 30 дней и 12,27% – 31 – 90 дней [52, 266, 274, 460, 467, 471].

Анализ жизнеспособности новорожденных телят на Кубе в первые 24 часа жизни у 8133 гольштейнских коров-первотелок показал, что потери, включая и мертворожденных, достигали 6,5% [455, 481].

По данным Национальной ассоциации скотоводов голштейнской породы, в США в первые двое суток летальность новорожденных телят достигают 6,65% [454].

В странах ЕЭС значительный отход молодняка (около 12%), в результате заболеваний желудочно-кишечного тракта, вызываемых патогенными колибактериями, сальмонеллами, вирусами, отмечается в молочный период выращивания [393, 460].

В первый месяц жизни 2 из 16 телят страдают диареей, в результате чего, каждый год во Франции болеют более 2 млн телят, из которых 300 тыс. со смертельным исходом. Отход телят к 3-недельному возрасту в Германии достигает 7,3% [450, 469, 481].

В Дании, на фермах 35 хозяйств, по 8397 отделам, проанализировали смертность телят черно-пестрой, красной датской, джерсейской пород, где падеж телят за первый год жизни достигал 9,6%: в первый месяц жизни пало 4,0%, во второй – 2,4%, от 3 до 12 месяцев включительно – 3,2% [451].

В Великобритании ежегодный падеж телят, по причинам гастроэнтерита, многие из которых вызваны недостаточным потреблением молозива и содержащихся в нем антител, составляет более 100 тыс. гол. [435].

Суммарные потери (падеж, вынужденный убой) на крупных комплексах Чехии и Словакии достигали 8,7%: ежегодный падеж телят составлял 120 тыс. гол., молодняка старших возрастов – 35 – 40 тыс., вынужденный убой – соответственно 140 – 150 и 90 – 100 тыс. гол. [460].

Инфекционные энтериты обычно регистрируются среди телят с 1-го дня жизни до 6-месячного возраста, заболеваемость которых в отдельных хозяйствах достигает 65 – 100%, от числа родившихся. Два раза и более переболевают от 37,2 до 55,6% животных, что обусловлено так называемым «технологическим» возрастным иммунодефицитом [4, 5, 7, 12, 16, 19, 30, 40, 73, 138, 163, 165, 189, 196, 204, 211, 296, 338, 396, 444].

Исходя из вышеизложенного, изучение этиологии, эпизоотологические особенности инфекционных энтеритов и разработки эффективных

средств для профилактики и терапии этих болезней является актуальной задачей ветеринарной науки и практики.

## 1.2. Пробиотические и пребиотические препараты

Многочисленные исследования по разработке новых биопрепаратов и дальнейшее изучение механизма их лечебно-профилактического действия дают основание утверждать, что в XXI в. пробиотики в значительной степени потеснят на рынке традиционные и небезопасные для организма препараты, особенно применяемые с профилактической целью, поэтому Т.Р. Lyons и R.J. Fallon (1992) [446] назвали наше время называют «наступающей эпохой пробиотиков» [50].

F. Vergio (1954) [479] в монографии «Anti- and Probiotika», сравнивая различные соединения, обладающие, как антимикробными, так и позитивными эффектами на кишечную микрофлору, впервые употребил термин «пробиотики», под которым в последующем Lilly и Stillwell (1965) [444] предложили понимать живые микроорганизмы, усиливающие рост других микроорганизмов. Для обозначения живых микроорганизмов и продуктов их ферментации, проявляющих антагонистическую активность в отношении патогенной микрофлоры, Л. Ричард и Р. Паркер [463, 465] использовали термин «пробиотик» [292].

T. Riise (1981) [465] предложил под названием пробиотик понимать «...увеличение количества полезных микроорганизмов в пищеварительном тракте животного-хозяина путем введения больших количеств желательных бактерий, для переустановления и поддержания идеальной ситуации в кишечнике», а R.Fuller (1989) [423, 424, 426] – «живую микробную кормовую добавку, которая оказывает полезное действие на животное-хозяина путем улучшения его кишечного микробного баланса». В научной литературе, до настоящего времени, принято последнее определение, которое подчеркивает обязательность живых микробных клеток в качестве необходимого компонента эффективного пробиотика и устраняет беспорядок,

создаваемый использованием слов «субстанции» или «вещества», имеющих очень широкое значение и включающих антибиотики и другие антибактериальные химиотерапевтические средства [313].

М. Vanbelle et al. (1990) [218, 237] определяют «пробиотики», как антоним антибиотиков, то есть «промотор жизни», в отличие от которых пробиотики не оказывают отрицательного воздействия на нормальную микрофлору, в связи с чем широко применяются для профилактики и лечения дисбактериозов. При лечении некоторых острых кишечных инфекций эти биопрепараты характеризуются выраженным клиническим эффектом, способны повышать противoinфекционную устойчивость организма, оказывать в ряде случаев антиаллергенное действие, регулировать и стимулировать пищеварение.

По определению G.R. Gibson, M.B. Robertroid (1995) [430], пробиотики – это микробиологические пищевые добавки, благотворно влияющие на хозяина, через улучшение микробиологического баланса его кишечника.

Биопрепараты из нормальной микрофлоры, используемые для профилактики и лечения дисбактериозов, А.А. Воробьев с соавт. [73] называют эубиотиками, к которым относят препараты, содержащие бифидо- и лактобактерии, *E.coli*, споровые формы бактерий.

Однако Б.А. Шендеров с соавт. [378] считают, что термин эубиотики охватывает лишь часть пробиотиков. По мнению Б.А. Шендерова [378], пробиотики – это препараты и продукты питания, в состав которых входят вещества микробного и немикробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения благоприятные эффекты на физиологические функции и биохимические реакции организма хозяина, через оптимизацию его микробиологического статуса. В соответствии с этим определением, любые живые или убитые микроорганизмы, их структурные компоненты, метаболиты, а также вещества другого происхождения, оказывающие позитивное влияние на функционирование микрофлоры хозяина, спо-

способствующие лучшей адаптации его к окружающей среде в конкретной экологической нише, могут рассматриваться как пробиотики [49].

Отсутствие четкого определения пробиотических препаратов, которые большинство авторов относили к кормовым добавкам, по-видимому, можно объяснить недостаточной изученностью их фармакодинамики [198, 222].

Другие исследователи [198] считают, что пробиотики – это лекарственные средства, которые предпочтительнее использовать для превентивной терапии и в качестве эрготропиков, созданные на основе стабилизированных культур микроорганизмов и продуктов их ферментации, оптимизирующие кишечные микробиоценозы, подавляющие рост и развитие патогенной и условно-патогенной микрофлоры, нормализующие обменные процессы и защитные реакции организма, активизирующие клеточный и гуморальный иммунитет [25, 112, 126].

Полезный эффект пробиотиков базируется на том, что безмикробные животные более чувствительны к заболеваниям, чем их сородичи с кишечной флорой [9, 14, 15, 43, 97, 218, 221, 226, 236, 240, 321].

Средства, активно влияющие на микробиоценозы человека и животных, условно подразделяют [246] на:

1) **Пробиотики** – это препараты из живых микроорганизмов, проявляющие свои позитивные свойства в организме человека и животных.

2) **Пребиотики** (в ветеринарной медицине применяют наряду с пробиотиками; термин был внедрен в научную литературу в начале 1990-х годов) – препараты немикробного происхождения (пищевые волокна, олигосахариды и другие, неперевариваемые в верхних отделах пищеварительного тракта компоненты пищи), способные к росту и развитию штаммов пробиотиков:

а) **пантотенат кальция**, участвующий в процессах ацетилирования и окисления в клетках, углеводном и жировом обмене, синтезе ацетилхолина, стимулирующий образование кортикостероидов в коре надпочечни-

ков (утилизируется бифидобактериями и способствует увеличению их биомассы);

б) *памба* (парааминобензойная кислота), способствующая росту бифидобактерий, лактобактерий и кишечной палочки;

в) *нормазе* (дюфалак, лактусан) – синтетический дисахарид, способствующий понижению рН содержимого толстого кишечника, снижению концентрации гнилостных бактерий, стимулирующий перистальтику кишечника, усиливающий рост бифидобактерий;

г) *лизоцим* – фермент белковой природы, обладающий муколитическими и бифидогенными свойствами, активный в отношении грамположительных кокковых микроорганизмов [55, 89, 373].

Среди пребиотиков наиболее популярны изолированные из природных источников, или получаемые биотехнологическим, или синтетическим методами: поли- и олигофруктаны, соевые олигосахариды, галактоолигосахариды. Предполагается, что мировое производство подобных пребиотиков, реализуемых самостоятельно в виде обогащающих добавок к разнообразным продуктам питания, а также в рациональной комбинации с пробиотическими микроорганизмами, при которой возможен максимальный позитивный эффект, достигнет сотен тысяч тонн [119, 166, 327, 378, 390, 396, 399, 409].

3) **Синбиотики**(биовестин-лакто, мальтидофильс и бифидобак) – препараты, полученные в результате рациональной комбинации пробиотиков и пребиотиков [55].

4) **Симбиотики**– это препараты, полученные в результате рациональной комбинации нескольких бактерий антагонистов. Часто это биологически активные добавки, входящие в состав функционального питания, обогащенные несколькими штаммами представителей родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* или другими полезными микроорганизмами.

5) **Бактерийные препараты, обладающие селективной антагонистической активностью.**

**б) Продукты питания с пробиотиками.**

В зависимости от природы составляющих компонентов и форм пользования, пробиотики предложено [89] классифицировать на:

а) препараты, содержащие живые микроорганизмы (как представителей только одного вида бактерий – монобиотики, так и ассоциацию штаммов нескольких видов микроорганизмов (от 2 до 30) – ассоциированные пробиотики);

б) препараты, содержащие структурные компоненты микроорганизмов – представителей нормальной микрофлоры или их метаболиты;

в) препараты микробного или иного происхождения, стимулирующие рост и активность микроорганизмов – представителей нормальной микрофлоры;

г) препараты, представляющие собой комплекс живых микроорганизмов, их структурных компонентов и метаболитов в различных сочетаниях и соединениях, стимулирующих рост представителей нормальной микрофлоры;

д) препараты на основе живых генно-инженерных штаммов микроорганизмов, их структурных компонентов и метаболитов с заданными характеристиками;

е) продукты функционального питания на основе живых микроорганизмов, их метаболитов и других соединений микробного происхождения, способных поддерживать и восстанавливать здоровье через коррекцию микробной экологии организма - хозяина [53, 67].

Основой пробиотиков служат либо представляющие нормальную микрофлору микроорганизмы, либо не характерные для нормофлоры сапрофиты, способные вытеснять патогенные микроорганизмы из просвета кишечника. Пробиотические штаммы микроорганизмов являются неадгезивными транзитными представителями микрофлоры кишечника [145, 251, 264, 332, 4559, 461].

Для создания пробиотических препаратов используют следующие микроорганизмы [70, 155, 169, 231, 307, 322, 332, 372, 394]:

- аэробы (спорообразующие бактерии рода *Bacillus*), на основе которых в настоящее время продолжается работа по созданию новых, более активных пробиотиков. Свойства некоторых штаммов этой группы бактерий настолько разнообразны и привлекательны, что только за последние годы на их основе разработано более десятка эффективных препаратов [357]. Антагонизм, в отношении широкого круга патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и самостоятельная элиминация из ЖКТ, делают конструирование лечебно-профилактических препаратов из пробиотических бацилл особенно перспективным [134,175,323].

- анаэробы (спорообразующие бактерии рода *Clostridium*);

- бактерии, продуцирующие молочную кислоту (энтерококки, бифидобактерии, лактобактерии);

- дрожжи.

Культуры для приготовления пробиотиков должны соответствовать следующим требованиям:

- должны быть нормальными обитателями желудочно-кишечного тракта здоровых животных, непатогенными и нетоксичными;

- должны быть метаболически активными в системе рубца (в случае их приготовления для жвачных), переносить пассаж через желудок и метаболизировать в кишечнике моногастальных животных и птиц, увеличивая их рост или резистентность к заболеванию;

- должны обладать способностью к адгезии на эпителии, и приживлению в пищеварительном тракте, где связанная с перевариванием корма ферментативная активность высокая, а среда - агрессивная;

- должны быть стабильными и способными длительное время оставаться жизнеспособными при хранении в производственных условиях [337–339].

С учетом действующего начала, пробиотики подразделяют [134] на:

а) *аутопробиотики* – действующим началом являются выделенные от конкретного животного штаммы нормальной микрофлоры, которые применяют для обеспечения нормального микробиоценоза только животного этого вида;

б) *гомобиотики* – действующим началом являются штаммы, выделенные от конкретного вида животных, и для них использующиеся.

в) *гетеропробиотики*, которые предназначены для животных и человека, применяют без учета видовой принадлежности хозяина, первоначального носителя штамма пробиотических бактерий.

По направленности действия пробиотики предлагают [186, 222, 233, 373] классифицировать на:

а) обеспечивающие функциональное питание животных;

б) используемые для реабилитационной терапии и нормализации микробиоценоза после длительного применения антимикробных средств (антибиотики, сульфаниламиды, нитрофураны и др.);

в) применяемые для коррекции иммунитета, стимуляции роста и развития молодняка, повышения качества продукции;

г) используемые для терапии при заболеваниях бактериальной и вирусной этиологии.

В медицине выделяют 4 поколения пробиотиков. В состав представителей *1-го поколения* входят бактерии только одного вида (в бифидумбактеринах – бифидобактерий, в лактобактерине – лактобактерий). Препараты *2-го поколения* (бактисубтил и флоривин) содержат не встречающиеся в нашем кишечнике микроорганизмы – выведенные искусственно - мутантные бактерии, агрессивно относящиеся к микроорганизмам. Такие препараты применяют в тяжелых случаях, обычно сочетая их с пробиотиками, содержащими типичные для кишечника микроорганизмы. Пробиотики *3-го поколения* (бифацидобактерин, лактобифадол, биосептин) содержат несколько различных бактерий, совместно проявляющие антагонистическую активность в отношении патогенной флоры. Бифидумбактерин

форте, относящийся к 4-му поколению, содержит 50 млн бактерий, эффект от которых в несколько раз больше, чем от полмиллиарда (500 млн) микроорганизмов в классических бифидумбактеринах: бактерии в бифидумбактерин форте, фиксированные на сорбенте, который прикрепляется к стенке кишечника, лучше выживают и быстрее заселяют кишечник [109, 160, 168, 378].

Анализ данных литературы показывают, что в борьбе с инфекционными болезнями преимущественную роль отводится пробиотикам.

### **1.3. Отбор микроорганизмов**

#### **в состав пробиотиков ветеринарного назначения**

При конструировании пробиотиков в настоящее время используют два методологически различающихся принципа выбора микроорганизмов [24, 239, 255, 330, 442].

Первый, наиболее распространенный, исходит из представления о нормомикрофлоре, характерными представителями которой считаются бифидобактерии, колибактерии, лактобактерии, бактероиды. Эти микроорганизмы колонизируют слизистую оболочку кишечника, образуя на ней, за счет присущих им адгезивных свойств, своего рода защитную «биопленку». На сегодня достаточно широко изучены и описаны в литературе изменения микробиоценоза при инфекционных и других заболеваниях, дисбактериозах. Так, характерно, что при острых кишечных инфекциях (например, колибактериозе, сальмонеллезе и др.) и дисбактериозах обнаруживают участки слизистой оболочки кишечника, лишенные защитной «микробной пленки». Поэтому, коррекция подобных нарушений посредством так называемого «повторного заселения» кишечника представителями нормомикрофлоры с помощью пробиотиков теоретически логична и практически оправдана [114, 225].

Другой принцип заключается в применении в качестве пробиотиков непатогенных аэробных спорообразующих бактерий. Микроорганизмы ро-

да *Bacillus* широко распространены во внешней среде и обладают более широким спектром антагонистической активности, по сравнению с бифидо-, коли- и лактобактериями. Бациллы выделяются от здоровых людей и животных не постоянно, в относительно невысоких концентрациях и относятся к экзогенной составляющей микробиоценоза организма [39, 105, 145, 221, 247, 255, 305, 308].

Пробиотики – препараты, в состав которых входят живые микроорганизмы – естественные обитатели кишечного тракта теплокровных или сапрофиты, обитающие во внешней среде, в последние годы широко используют в медицине и ветеринарии, при терапии и профилактике инфекционных заболеваний и стрессе. Повышенный интерес к пробиотикам вызван, с одной стороны, ростом контингента лиц, требующих коррекции аутофлоры, а с другой – прогрессом в изучении микрофлоры. Совершенно безвредные, экологически чистые и не имеющие противопоказаний для применения пробиотические препараты могут стать альтернативой антибиотикам [247].

Основными требованиями, предъявляемыми к штаммам для пробиотических препаратов, являются [467]:

- важный селекционный критерий – продуцирование биологически активных субстанций – не только органических кислот, но и бактериоцинов, ингибиторов адгезии для других микроорганизмов и некоторых антимикробных субстанций. Однако, необходимо учитывать, что продукция многих из этих субстанций показана на лабораторных средах *in vitro*, а эффективность *in vivo* остается неопределенной;
- неинвазивность, неканцерогенность и непатогенность, отсутствие антагонистической активности в отношении организмов нормальной флоры человека;
- способность сохранять жизнеспособность и свои свойства в продукте и различных видах пищи;
- устойчивость к желчи, фенолу, основным антибиотикам;

- транзит через желудок и тонкий кишечник штаммов, не являющихся представителями нормальной флоры.

Начальный скрининг должен включать: стабильность фенотипа и генотипа, включая плазмидную стабильность, показатели углеводной и белковой утилизации, устойчивость, выживаемость и рост в кислотах и желчи, метаболизм желчи, способность к адгезии к кишечному эпителию, продукцию БАВ (антимикробных субстанций и др.), устойчивость к антибиотикам, способность ингибировать рост патогенов, иммуногенность [467].

Пробиотики, на основе микроорганизмов нормофлоры человека, должны обладать способностью колонизировать кишечник, обладать выраженными адгезивными свойствами к клеткам млекопитающих [467]. Одним из важных селекционных критериев для пробиотиков, на основе штаммов нормальной микрофлоры, является способность к адгезии на слизистой кишечника, которая важна не только для создания колонизационной резистентности макроорганизма, но и для стимуляции иммунной системы [461].

Производственные штаммы должны быть стабильными по биологической активности и удовлетворять технологические требования [55].

В состав пробиотического препарата целесообразно включать несколько штаммов, свойства которых взаимно дополняют друг друга, и которые не проявляют взаимного антагонизма [294].

Функциональные свойства бактерий, которые могут измениться в результате длительного использования стартовых культур для производственных целей, важно проверять во время производства и хранения [32].

При разработке новых препаратов-пробиотиков необходимо учитывать наличие у селекционируемых штаммов нежелательных свойств, в том числе повышенной метаболической активности, способности синтезировать промежуточные биополимеры, выраженной способности к транслока-

ции из кишечника во внутренние органы, а также индукцию молекулярной мимикрии и другие факторы [144, 145].

Разработаны [24, 61, 80, 83, 84, 85, 87, 93, 100, 143, 216, 242, 246, 263, 272, 280, 343] критерии отбора в состав пробиотиков микроорганизмов:

- 1) безопасность,
- 2) устойчивость к литическим ферментам слюны (лизоцим) и пищеварительным ферментам (пепсин, липаза),
- 3) жизнеспособность в течение нескольких часов при низких значениях рН (1,8 – 3,2), регистрируемых в желудке,
- 4) устойчивость к желчи, к соку поджелудочной железы,
- 5) адгезивная активность и колонизационная резистентность (для бактерий, образующих биопленки – лактобациллы, бифидобактерии),
- 6) антимикробная активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов,
- 7) иммуномодулирующая и иммуностимулирующая активность,
- 8) технологичность при производстве,
- 9) жизнеспособность в составе препарата при длительном хранении.

Спектр и выраженность лечебно-профилактической эффективности конкретного пробиотика обуславливает совокупность свойств, реализованных в фенотипе бактерий-компонентов пробиотиков, а также биологически активных продуктов их метаболизма. Поэтому первостепенное значение имеет выбор наиболее активных бактерий-продуцентов, которые определяют основные требования, предъявляемые к микроорганизмам, используемым в составе пробиотиков (табл. 1) [203, 208, 216].

## Требования, предъявляемые к микроорганизмам, используемым в составе пробиотиков

Показатель		Требование
<b>Монокультура и/или ассоциация микроорганизмов</b>		монокультура или ассоциация микроорганизмов различных родов, видов и/или штаммов с взаимодополняющими свойствами
<b>Безвредность для макроорганизма</b>		отсутствие вирулентности и токсигенности, безвредность и ареактогенность даже при неоднократном введении десятикратных доз
<b>Изменчивость бактерий</b>		устойчивый генотип, контролируемое изменение фенотипа
<b>Антагонистическая активность</b>		широкий спектр бактерицидного и/или бактериостатического действия на микроорганизмы – возбудители острых кишечных инфекций и токсикоинфекций. Антагонизм должен обеспечиваться комплексом продуцируемых микроорганизмами БАВ и индуцируемых в макроорганизме факторов неспецифической защиты, высокой метаболической активностью и скоростью размножения бактерий.
<b>Влияние на</b>	<b>нормо-микрофлору ЖКТ и слизистых оболочек</b>	отсутствие ингибиции бактерии – представители нормального микробиоценоза, или же отрицательного влияния на их колонизирующую способность.
	<b>защитные реакции макроорганизма</b>	безопасность при многократном и продолжительном применении, отсутствие алергизации и гиперсенсibilизации макроорганизма; изученное и контролируемое иммуномодулирующее действие
<b>Устойчивость к факторам внешней среды и технологическим стадиям производства</b>		высокая резистентность к действию неблагоприятных факторов и выживаемость при значительных изменениях реакции среды, температуры и влажности
<b>Отношение к кислороду</b>		аэробы, факультативные аэробы и анаэробы; возможна ассоциация аэробов и факультативных аэробов (анаэробов) для обеспечения лечебно-профилактического действия препарата во всех отделах ЖКТ

Научно обоснованы подходы к селекции штаммов микроорганизмов, которые можно использовать в качестве пробиотиков, и определены основные требования к ним [86, 161, 245, 361, 398, 471]:

**1. Жизнеспособность.** Пробиотический препарат должен содержать живые, антагонистически активные бактерии в высокой концентрации.

**2. Оптимальное количество в кишечнике.** Использование штаммов, которые быстро колонизируют кишечник, что может быть достигнуто либо селекцией штаммов, размножающихся со скоростью большей, чем скорость их элиминации из кишечника, либо использованием штаммов, прикрепляющихся к поверхности кишечника и не вымывающихся при продвижении содержимого ЖКТ.

**3. Кислотоустойчивость и продукция кислот.** Бактерии пробиотиков должны прикрепляться к эпителиальным клеткам ЖКТ, секретировать адекватное количество молочной кислоты для снижения рН химуса до 4 – 5, быстро расти и размножаться в присутствии различных интактных и частично переваренных пищевых веществ и продвигаться в толстый отдел кишечника. Лактобациллы и бактерии рода *Bacillus* удовлетворяют этим требованиям.

**4. Толерантность к желчи,** которая свойственна для большинства штаммов лактобацилл, выделенных из тощей кишки телят.

**5. Видоспецифичность.** Пробиотические штаммы бактерий должны обладать факторами колонизации, позволяющими им прикрепляться к кишечному содержимому и к слизистой оболочке ЖКТ конкретного вида животных.

**6. Ингибирование роста кишечных патогенов.** Бактерии-компоненты пробиотиков должны обладать широким спектром антагонистической активности в отношении грамположительных и грамотрицательных условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

Пробиотики, содержащие живые бактерии, как *in vitro*, так и *in vivo* должны ингибировать рост и размножение энтеропатогенных микроорга-

низмов; обладать энзиматической активностью; связывать холестерин; усиливать рост и развитие полезных бактерий. Чтобы выживать и размножаться в ЖКТ животных, микроорганизмы с такими свойствами должны быть устойчивы к желудочному соку, низкому рН и желудочным ферментам, воздействию желчи, вытеснять из кишечника условно-патогенные и патогенные бактерии, присутствовать в разных отделах кишечника в количествах, оказывающих лечебно-профилактический эффект [93].

Для отбора микробных культур в состав пробиотика, должны быть проведены многосторонние исследования их безопасности и специфической активности. Многие, полученные *in vitro* данные могут свидетельствовать о соответствии штамма этим критериям. Так, Conway R. et al, (цитир. по Collius M., 309) показал [169], что *L.acidophilus* более устойчивы к желудочному соку, чем *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. От типа использованного для экспериментов буфера и от вида корма (например, молока), зависела устойчивость к низким значениям рН. Полученные данные были подтверждены исследованиями *in vivo* – выживаемость *L.acidophilus* в двенадцатиперстной и тощей кишке животных была выше, чем у *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* [180, 271, 288].

Определенная *in vitro* антагонистическая активность культуры, также является важным показателем, характеризующим регистрируемую *in vivo* ее специфическую активность. На основании полученных *in vitro* данных, опыты *in vivo* могут быть проведены только с теми штаммами, которые уже отвечают определенным критериям. Разработана схема проведения исследований безопасности штаммов лактобацилл и других бактерий, которые предполагаются для использования в качестве пробиотиков, однако, и эти исследования не могут дать окончательного ответа на вопрос: какими свойствами не должны обладать отобранные микроорганизмы [415].

Входящие в состав пробиотиков штаммы бифидобактерий и лактобацилл, должны обладать адгезивными и ростовыми свойствами, позволяющими этим штаммам быстро колонизировать слизистую ЖКТ [278, 367].

Поэтому, при отборе пробиотических штаммов, необходимо обладать сведениями, показывающими значимость отдельных физиологических характеристик штамма, интродуцируемого в кишечник животного (табл. 2) [93].

Для изготовления пробиотических препаратов ветеринарного назначения разработаны [135, 233] критерии отбора производственных штаммов лактобацилл, при целенаправленной селекции которых необходимо учитывать:

- принадлежность штамма к доминирующей по численности в ЖКТ типовой и видовой группе лактобацилл, типичность культуральных, морфологических и биохимических свойств;

- устойчивость к соединениям, влияющим на осмотическую резистентность клетки (хлористый натрий), вызывающим денатурацию клеточных оболочек (0,4% фенола), а также к желчи, высокому и низкому значениям pH среды;

- функциональные биологические свойства штаммов, направленные на поддержание колонизационной резистентности кишечника: способность штамма к адгезии на поверхности эпителиальных клеток животных разных видов, антагонистическая активность, кислотообразующая активность, способность к продукции антимикробных субстанций и соединений, вызывающих снижение колонизационного и персистентного потенциала у условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

Изменение условий среды обитания человека и животных, качества продуктов питания и кормов (консервирование, термическая обработка, стерилизация и пастеризация, хлорирование питьевой воды и др.), повлекло за собой обеднение или утрату экзогенной части нормомикробиоценоза кишечника. Поэтому, для восполнения экзогенных компонентов нормомикробиоценоза, необходимо разрабатывать и использовать в современной медицинской и ветеринарной практике пробиотики из метаболиче-

## Регуляторные функции метаболитов бифидобактерий и лактобацилл, включаемых в состав пробиотиков

Механизм действия	Биологический эффект
<i><b>Молочная кислота</b></i>	
Синергизм сочетания с уксусной, пропионовой, масляной кислотами. Синтез внутри- и внеклеточного лактоферрина.	Ингибция роста условно-патогенных микроорганизмов. Снижение синтеза токсинов у плесневых грибов корма. Ингибирование роста железозависимых бактерий.
<i><b>Углекислый газ</b></i>	
Поддержание анаэробных условий и высокого парциального давления. Акцептор водорода при биосинтезе ацетата из гексозы.	Снижение дыхательного потенциала у аэробных кишечных бактерий и подавление процессов размножения.
<i><b>Перекись водорода</b></i>	
Образование гипотиоцината в бактериальных клетках. Повышение лактопероксидазной активности молока и молозива. Истощение ферментной системы у каталазо-зависящих микроорганизмов. Инактивация клеточных энзимов.	Токсическое действие на каталазоположительную микрофлору. Повышение активности колострального иммунитета. Снижение синтеза белков, ограничение передачи генетической информации, торможение образования факторов адгезии у грамотрицательных бактерий.
<i><b>Лизоцим</b></i>	
Связывание антилизозимного фактора у энтеропатогенных бактерий. Разрушение межклеточных связей у грамотрицательных микроорганизмов.	Повышение фагоцитарной активности макрофагов. Неспецифическая стимуляция макрофагального иммунитета. Снижение колонизационной активности у грамотрицательных бактерий. Лизис клеточных стенок грамположительных бактерий.
<i><b>Бактериоцины</b></i>	
Ограничение синтеза белков. Нарушение процессов транспорта через клеточную мембрану, снижение синтеза ДНК, уплотнение ядерного материала, изменение рибосом и лизосом.	Бактериостатическое и бактерицидное действие. Сдерживание процессов деления бактерий, нарушение передачи наследственной информации. Деструкция рецепторных связей.

высокоэффективных непатогенных аэробных бацилл, предназначенных для применения в тех случаях, когда препараты на основе эндогенных микроорганизмов мало или же совсем неэффективны (при тяжелых формах острых кишечных инфекций, высокой антибиотикорезистентности возбудителей и др.) [81, 280].

Следует отметить, что при отборе штаммов, для включения в состав пробиотиков, не всегда представляется полная характеристика этих микробных культур, недостаточно отработаны методы контроля качества пробиотиков (особенно на основе бацилл), нет систематизированных данных о механизмах действия существующих пробиотиков из аэробных спорообразующих бактерий.

Самостоятельное, внутри хозяйства, культивирование спорных форм, для применения животным, может быть опасно, так как необходима квалифицированная дифференциальная диагностика различных микроорганизмов, среди которых есть с похожей структурой вегетативной и спорной форм, но со свойствами патогенов [183].

Некоторые пробиотики на основе *Bac. subtilis* включают генетически модифицированные штаммы микроорганизмов (ГММО), использование и интродукция которых в окружающую среду, в том числе и путем использования таких ГММО в составе пробиотических препаратов, должны быть крайне осторожными, что прежде всего обусловлено вопросами биобезопасности. Наиболее уязвимым звеном экосистемы, при интродукции в нее ГММО, считаются микробные ассоциации, в которых может происходить вытеснение «аборигенных» микроорганизмов интродуцируемым, а также возможно качественное видоизменение микробной ассоциации, из-за неконтролируемой передачи гетерологичной генетической информации от ГММО к «аборигенным» микроорганизмам. Кишечный микробиоценоз – сложная экосистема, в состав которой входит более 400 видов микроорганизмов. Возможные изменения в этой ассоциации микроорганизмов при внесении в нее ГММО, последствия влияния такой измененной ассоциации

на макроорганизм остаются фактически не изученными. Очевиден и тот факт, что ГММО из кишечника животных быстро попадают в окружающую среду и могут представлять потенциальную опасность и для других природных экосистем [17, 144].

Для предотвращения вышеназванных рисков, специальной комиссией Национальной академии наук США в 1989 г. были сформулированы единые принципы, основными из которых являются минимальная выживаемость во внешней среде и ограниченная способность к распространению ГММО. Вряд ли спорообразующие бактерии рода *Bacillus* можно отнести к микроорганизмам с малой выживаемостью во внешней среде [20].

Работа с рекомбинантными штаммами микроорганизмов (ГММО) в Российской Федерации регулируется Законом «О Государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (1998 г.) и регламентируется Межведомственной комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности. Однако, до настоящего времени, не конкретизированы критерии безопасности, нет ясного понимания того, как осуществлять испытания экологической безопасности ГММО и контролировать эти испытания. Исходя из этого, пробиотические препараты на основе ГММО, которые были предложены для ветеринарной практики, до настоящего времени официально не зарегистрированы в стране. Имеется лишь разрешение для их широких производственных испытаний [145].

Таким образом, проведенные исследования показывают, что бактерии –антагонисты, прежде всего, должны быть безопасными, устойчивыми, адгезивными и бактериоцидными.

## **1.4. Производство пробиотических препаратов**

### **1.4.1. Пробиотики из бифидо- и лактобактерий**

Для производства пробиотиков вначале использовали неспорообразующие бактерии, выделяющие при сбраживании углеводов молочную, уксусную, пропионовую и другие кислоты. В нормальной микрофлоре те-

плесневых преобладает ацидофильная палочка, поэтому в качестве пробиотика стали использовать ацидофильную бульонную культуру (АБК) [44].

В дальнейшем для улучшения качества, расширения сферы применения к АБК стали добавлять пропионово-кислые бактерии, обогащающие препарат витаминами группы В. Этот препарат стали выпускать под названием ПАБК. Применение АБК и ПАБК повышало общую устойчивость животных и нормализовывало пищеварение, профилактировало развитие инфекционных заболеваний, излечивало желудочно-кишечные заболевания, стимулировало рост молодняка, а также улучшало течение беременности [197].

На основе живых бифидо- и лактобактерий созданы различные препаративные формы (лактобактерин, бифидумбактерин, ацидофилин, колибактерин и др.), которые до настоящего времени широко используются для восстановления нормальной микрофлоры и лечения желудочно-кишечных заболеваний [292, 380, 404]. Бифидо- и лактобактерии, преобладающие в нормальной микрофлоре животных, путем закисления среды обитания и наработки антибиотических веществ, подавляют размножение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Попадая в ЖКТ, присутствующие в этих препаратах микроорганизмы размножаются, синтезируют многие БАВ (органические кислоты, липиды, витамины, антибиотики, иммуномодуляторы и т.п.) и повышают неспецифическую резистентность организма-хозяина [218].

В процессе жизнедеятельности бифидобактерий, предупреждающих развитие дисбактериоза, образуются витамины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> и К, а также молочная и уксусная кислоты. Кислая среда способствует лучшему всасыванию жиров, витаминов, железа и кальция, задерживает размножение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [335, 405].

Со временем спектр используемых для получения пробиотиков микроорганизмов расширялся. Разработка комбинированных препаратов яви-

лась следующим этапом в создании пробиотиков. Так, совместное культивирование ацидофильной палочки с бифидобактериями совместимо и обеспечивает их сохранение. При сочетании бифидобактерий и ацидофильной палочки антагонистический эффект в отношении кишечной палочки значительно выше, чем при использовании каждой культуры в отдельности. Ацидофильная палочка стимулирует накопление бифидобактериями специфических антибиотических веществ [267, 412].

Комплексные бактериальные препараты бифилак и бифимол, обладая высокой эффективностью в профилактике желудочно-кишечных болезней телят, оказывают стимулирующее действие на их рост и развитие в раннем возрасте. Эти пробиотики следует растворять непосредственно перед выпаиванием теплой (37°C) водой и применять за 30 – 60 мин до кормления молозивом в течение 5 сут [126, 135].

Лактобациллы используются для производства пробиотиков, как в виде монокультур, так и в ассоциациях двух штаммов. В состав серийно выпускаемых пробиотиков, в разных странах мира, наиболее часто включают такие бифидобактерии, как *B. globosum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *B. infantis*, *B. suis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve* (табл. 3) [41, 84, 86, 87, 259, 315, 419] и такие лактобациллы, как *L. acidophilus*, *L. plantarum* и *L. fermentum* (табл. 4) [9, 32, 84, 86, 105, 116, 175, 369, 402, 464].

Таблица 3

### Пробиотики на основе бифидо- и лактобактерий

Препарат	Вид микроорганизма
<i>1</i>	<i>2</i>
АБК (Россия)	<i>L. acidophilus</i>
Ацидолакт (Россия)	<i>L. plantarum</i>
Ацилакт (Россия)	<i>L. acidophilus</i>
Аципол (Россия)	<i>L. acidophilus</i>
Биоград, лактоприв, лактана-Б (Германия)	<i>L. acidophilus</i>
Биосан (Россия)	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. buchneri</i>

1	2
Бифидер, биофермин (Япония)	B. thermophilus, B. pseudolongum
Бифидиген, лиобифидус (Франция)	B. longum, B. bifidum
Бифидумбактерин (Россия)	B. bifidum
Бифидумбактерин (Россия)	B. bifidum, B. globosum
Бифидумбактерин ветеринарный (Россия)	B.adolescentis, B.bifidum, B. longum
Бифидум-СХЖ (Россия)	B.bifidum, B. longum, B.infantis,
Бифидумбактерин – форте (Россия)	B. bifidum
Бифийогурт (Германия)	B. bifidum
Бифилайф (Россия)	B.adolescentis, B.breve
Бифилиз (ВИГЭЛ) (Россия)	B. bifidum с ферментной добавкой (лизоцим)
Бифилонг (Россия)	B. bifidum, B. longum
Бифинорм (Россия)	B. adotescentis
Галлиферм (Россия)	L.acidophilus
Гастрофарм (Болгария)	L.fcidophilus, L.bulgaricus
Гефилак, бактолак (Финляндия)	L.rhamnosum, L.casei
Зоноорм (Россия)	B. bifidum
Иммунобак (Россия)	B.adolescentis, B. globosum
Иокульт, лакрис, лактофед (Япония)	L. rhamnosum, L. casei, L. sporogenes, L. acidophilus
Лактоамиловорин (Россия)	L.amylovorus
Лактобактерин (Россия)	L. acidophilus, L.delbruecki
	L.fermentum (шт. 90-ТС-4)
	L. fermentum, L. plantarum
	L. plantarum (шт. 8А-Р3)
Лактоферон (Россия)	B.adolescentis, B. globosum
Продукты класса йогуртов (повсеместно)	B. bifidum, B. fongum
Протексин, припалак (Голландия)	L. acidophilus
Синелак, биолакталь (Франция)	L. bulgaricus, L. Acidophilus
Энтеробифидин (Россия)	B.adolescentis

После оценки штаммов бифидо- и лактобактерий по устойчивости к антибиотикам, в качестве производственных отобраны B.adolescentis В-1 и L.acidofilum ЛГ-1, на основе которых разработана технология изготовления и налажено серийное производство пробиотического препарата лактоби-

фадола (бифацидобактерин). Отличительной особенностью технологии изготовления этого препарата является получение сухой формы препарата не лиофилизацией или распылительной сушкой, а контактно-сорбционной сушкой биомассы. Этот метод более экономичен и технологичен, позволяет получать сухую биомассу бифидо- и лактобактерий с минимальными изменениями их биологических свойств [117, 187].

Вопрос о возможной патогенной роли микроорганизмов нормофлоры человека, до настоящего времени является спорным. Однако есть сведения о возможной транслокации и регистрации бактериемии [249]. Описана, вызванная бифидобактериями бактериемия у новорожденных, способность этих бактерий вызывать гнойно-воспалительные процессы, случай менингита, обусловленный *Bifidobacterium adolescentis*. Имеется сообщение о глюкозидазной активности бифидобактерий, способствующей, при изменении диеты, развитию опухолей толстой кишки [145].

Полагают, что метаболиты некоторых бактерий в кишечнике адсорбируются на слизистой, вызывая ответ путем простой или индуцируемой молекулярной мимикрии, что ведет к увеличению проницаемости слизистой, нарушению ее барьерной функции в отношении различных молекул и токсинов. На стрептококках различных групп широко изучена антропогенная активность для интактных бактериальных клеток и пептидогликановых полисахаридных полимеров, изолированных из *Enterococcus faecium*, *Peptostreptococcus productus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Eubacterium contortum*, *Bifidobacterium* др. [247].

Хотя литературные данные свидетельствуют, что представители нормальной микрофлоры, даже такие апатогенные как бифидобактерии и лактобациллы, способны вызывать разнообразные формы локальных и генерализованных инфекций, в основном у лиц с вторичными иммунодефицитами, но невозможно отказаться от использования бактериальных препаратов (эубиотиков, пробиотиков), являющихся более физиологичными, чем химиотерапевтические этиотропные вещества и антибиотики [247].

Разработка и применение в ветеринарной практике пробиотических препаратов на основе бифидобактерий и лактобацилл затрагивают широкий круг проблем: коррекцию кишечного биоценоза, иммунной, гормональной и ферментативной систем животных; поддержание колонизационной резистентности кишечника; повышение физиологического статуса организма новорожденных животных; стимуляция роста и развития макроорганизма. Для практики немаловажное значение имеют вопросы, связанные с переменным эффектом применения пробиотиков из бифидобактерий и лактобацилл и разработкой способов повышения их активности, а также удлинения сроков хранения готовой лекарственной формы [126, 201].

#### **1.4.2. Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus***

*Bac. subtilis* (сенная палочка) – широко распространенный в окружающей среде аэроб, который растет и размножается при доступе молекулярного кислорода, образует споры. Относится к транзитным (проходящим с кормовыми массами) просветным микроорганизмам. Несмотря на то, что в тонком отделе кишечника низкий уровень кислорода, а в толстом отделе в норме, свободного молекулярного кислорода нет, *Bac. subtilis* присутствует в фекалиях всех животных в больших количествах [39, 48, 105, 125, 145, 311, 316].

Экологически чистые живые культуры спорообразующих аэробных бактерий из рода *Bacillus* привлекают внимание исследователей различных направлений и являются перспективными для использования в животноводстве, в качестве основы для разработки лечебно-профилактических препаратов, что наряду с полной безвредностью, обусловлено высокой антагонистической активностью этих культур в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, продукцией БАВ [24, 143].

Количество антибиотиков, продуцируемых аэробными спорообразующими бактериями рода *Bacillus*, приближается к 200, а видом *Bac. subtilis* – 70 (микобациллин, субтилилин, бацилизин, бациломицин, субтили-

зин, субспорин и др.). *Bac. subtilis* используют в промышленности при производстве антибиотиков класса полимиксины (с бактерицидным действием в отношении грамотрицательных бактерий). Имеют выраженные ферментативные свойства, улучшают переваримость корма.

Установлено, что *Bac. subtilis* [313] обладает целым рядом позитивных свойств:

- антагонизм в отношении патогенной и условно-патогенной флоры (стафилококков, стрептококков, сальмонелл, дрожжевых грибов, протей), благодаря продуцируемым антибиотикам и способности закислять среду обитания;

- продукция ферментов, удаляющих продукты гнилостного распада тканей;

- синтез ряда аминокислот, витаминов и биологических иммуноактивных факторов.

При пероральном введении споры бацилл прорастают, и начинается размножение вегетативных бактериальных клеток, в результате чего в верхних отделах ЖКТ образуются зоны антагонистического ингибирования патогенных микроорганизмов и снижается их количество, вплоть до полного исчезновения. Эти штаммы существенно повышают неспецифическую резистентность организма, а некоторые индуцируют наработку эндогенного интерферона. Кроме того, они действуют в кишечнике как биокатализатор, продуцируя ферменты, витамины и аминокислоты [217, 225].

Полезные свойства аллохтонных, по отношению к микрофлоре кишечника человека и животных, пробиотических штаммов бацилл делают их важным арсеналом пополнения полезных для организма биопрепаратов. Особенно перспективным, конструирование лечебно-профилактических препаратов из пробиотических бацилл, представляют их антагонизм в отношении широкого круга патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, самостоятельная элиминация из ЖКТ, стимулирующее влияние на пищеварение, противоаллергенное, антитоксическое, saniрующее и обще-

укрепляющее воздействие на организм [220, 247].

Для создания пробиотиков наиболее перспективными оказались бактерии видов *Bac. subtilis*, *Bac. pumilus*, *Bac. polymyxa*, которые стабильно выделяются из разнообразных биотопов, в том числе из организма и тканей теплокровных, насекомых и растений, и для которых характерны высокая устойчивость к неблагоприятным условиям внешней среды, ферментативная и антагонистическая активность [250, 304 – 314].

Способность спорообразующих бактерий оказывать пробиотическое действие привела к разработке на их основе препаратов, отнесенных к поколению так называемых «самоэлиминирующихся антагонистов». На основе представителей рода *Bacillus* и других спорообразующих микробов российскими учеными заявлены около 25 наименований препаратов, часть из которых производится для нужд медицины и ветеринарии [250, 361, 363].

Свойства некоторых штаммов бактерий рода *Bacillus* настолько разнообразны и привлекательны, что только за последние годы на их основе разработано более десятка эффективных препаратов:

- медицинские: бактиспорин, гинеспорин, споробактерин, флонивин, энтерогермин (*Bac. subtilis*), бактисубтил, цереобиоген (*Bac. cereus*);

- ветеринарные: БПС-44, ветом 1.1, ветом 1.23, ветом 1.29, ветом 3, ветом 3.22, биоспорин (*Bac. subtilis* + *Bac. licheniformis*), ветоцил, зимун 1.23, зимун 3.22, прималас, протектин, эндоспорин, энтеробактерин (*Bac. subtilis*); ветом 4 (*B. licheniformis*), ветом 4.24, зимун 4.24 (*B. licheniformis*); глоген-8 (*B. natto*); бактерин-СЛ, биосептин, ветом 2, ветом 2.25, ветом 2.26, ветомгин, зимун, зимун 2.25 (*B. subtilis*, *B. licheniformis*) [8, 39, 221, 273, 310].

Сравнительно недавно пробиотики на основе штаммов спорообразующих бактерий стали применяться в ветеринарии. Подавляющее большинство представителей рода *Bacillus* безвредны для теплокровных животных, проявляют антагонистическую активность к широкому спектру

патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, устойчивы к литическим ферментам, технологичны в производстве, стабильны при хранении, экологически безопасны. Однако, многие механизмы действия пробиотиков на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* остаются недостаточно изученными, а лечебный и профилактический эффект требует дальнейшего подтверждения [338].

Штамм *Bac. subtilis* 534, у которого, установлено наличие не менее 2-х протеолитических ферментов (к альбумину и казеину), является действующим началом препарата споробактерин, способного при пероральном применении проникать из ЖКТ в очаг воспаления и подавлять патологический процесс, или препятствовать его развитию. В организме людей, животных и птиц бактерии выделяют неидентифицированное антибактериальное вещество белковой природы широкого спектра действия, подавляющее развитие патогенной микрофлоры, грибов, стафилококков, эшерихий, протей, сальмонелл, неклостридиальных анаэробов, актиномицетов и др. Споробактерин по своим свойствам часто более эффективен, чем современные антибиотики [106, 328].

Ветом 1.1, ветом 2, ветом 3, ветом 4, ветомгин, ветоцил, субалин и другие имеют высокую эффективность при заболеваниях бактериальной, а ряд препаратов и вирусной этиологии. Этот положительный эффект обусловлен подавлением развития многих видов условно-патогенной и патогенной кишечной микрофлоры, за счет способности продуцировать антибиотические вещества и более высокого биологического потенциала к размножению, а также участием в процессах пищеварения и обмена веществ в организме хозяина, способностью продуцировать БАВ, обеспечивающие нормализацию и повышение неспецифической резистентности организма животных [216 – 228].

В экологически чистом районе Сибири из почвы выделены штаммы ВКПМ В 7048 и ВКПМ В 7038, соответственно бактерий *Bac. subtilis* и *Bac. licheniformis*. Из *Bac. subtilis* штамм ВКПМ В 7048 получена *Bac. subtilis*

штамм ВКПМ В 7092 путем модификации плазмидой рВМВ 105, способной продуцировать интерферон 2-альфа-лейкоцитарный человеческий. При вирусной инфекции, или в ответ на индукцию синтетическими полирибонуклеотидами в организме человека лейкоцитами и лимфобластами продуцируется этот тип интерферона, который, являясь фактором неспецифической резистентности организма, играет контрольно-регуляторную роль в сохранении гомеостаза в организме и обладает такими видами активности, как противовирусная, подавляющая рост и развитие внутриклеточных инфекционных агентов невирусной природы (хламидии, рикетсии, бактерии, простейшие), антипролиферативная, антитуморогенная, антимутогенная, антитоксическая, радиопротективная, стимуляция макрофагов и усиление фагоцитоза, цитотоксического действия сенсibilизированных лимфоцитов на клетке-мишени, формирование поверхностных антигенов, усиление активности ряда клеточных ферментов, усиление цитотоксического действия двуниевых РНК, усиление продукции антител, активация естественных киллерных клеток, стимуляция освобождения гистамина базофилами, усиление синтеза простагландинов, формирования антигенов гистосовместимости, подавление гиперчувствительности замедленного типа [38, 65, 216].

*Bac. subtilis* и *Bac. licheniformis*, не являющиеся элементами нормофлоры в микробных сообществах человека и животных, обладают свойствами, которые обеспечивают в организме поддержание микробиоциноза на уровне экологически естественного, оптимизируют обмен веществ и снабжение организма биологически активными и строительными веществами, обеспечивают качественное переваривание пищи. В природных условиях бактерии этих видов в ЖКТ, на кожу и ее поврежденные участки, слизистые оболочки человека и животных всегда попадали из окружающей среды с пылью, при съедании растительной пищи, с питьевой водой. В настоящее время известно более 3000 бактерий этих видов, из которых по признаку максимальной полезности для организма человека и животных

выбраны промышленные штаммы бактерий *Bac. subtilis* штамм ВКПМ В 7048 и *Bac. licheniformis* штамм ВКПМ В 7038, свойства которых контролируются и поддерживаются на неизменном уровне в процессе наработки бактерий в технологическом цикле [145, 280, 308].

При попадании в ЖКТ бактерии живут в нем не более 30 дней, после чего выводятся естественным путем. В споровом виде бактерии этого вида обладают высокой устойчивостью к воздействию желудочного сока, поэтому не погибают в желудке, во рту, тонком и толстом отделах кишечника трансформируются в вегетативную форму, размножаются и продуцируют в окружающую среду БАВ, под воздействием которых подавляется рост и развитие гнилостной, патогенной и условно-патогенной микрофлоры, восстанавливается численность популяций бифидо- и лактобактерий, кишечной палочки и других микроорганизмов, составляющих нормофлору ЖКТ и обеспечивающих его оптимальное функционирование. Преимущественно за счет нарабатываемых полиеновых антибиотиков (бацитрацины и лихениформины), бактерии этих видов реализуют способность подавлять рост и развитие сторонней для ЖКТ микрофлоры, путем прямого антагонизма относительно инфекционных агентов и опосредованно через оптимизацию функционирования иммунитета животных. Зарегистрировано наличие прямого антагонизма относительно большей части представителей инфекционных микроорганизмов из коллекции НИФ «Исследовательский центр»: *St.aureus*, *E.coli*, *S.enteritidis*, *Salmonellasp.*, *S.choleraesuis*, *Ps. aeruginosa*, *Pr.vulgaris*, *C. albicans*, *Kl. pneumonia*, *Citrobacterfreundii*, *Morganellamorganii*, *Yersiniaenterocolitica*, *Shigellasonnei*, *Enterobacteragglomerans* [222].

При пероральном применении генетически модифицированные бактерии *Bac. subtilis* Inf<sup>+</sup> синтезируют интерферон, проявляющий иммуностимулирующее, антивирусное и противоопухолевое действие на основании результатов экспериментов на теплокровных и на модели водных микробиологических систем (микроекосмах), относящиеся к экологически

безопасным микроорганизмам. По своему позитивному эффекту продуцирующие интерферон генно-инженерные бактерии являются обнадеживающими, в плане использования в качестве лечебно-профилактических препаратов-пробиотиков [45, 53, 145].

С осторожностью следует относиться к препаратам, обладающим протеолитическими свойствами (особенно, если отмечены нарушения со стороны печени). Известно, что основоположник идеи об использовании живых микроорганизмов для восстановления пищеварения И.И. Мечников установил, что с возрастом в нижних отделах кишечника увеличивается число микроорганизмов с протеолитическими свойствами (то есть гнилостных), которые продуцируют азотсодержащие субстраты с токсическим эффектом. Именно такие микроорганизмы И.И.Мечников в 1907 г. предложил вытеснять с использованием транзиторно или постоянно обитающих в кишечнике живых молочнокислых бактерий [185, 299, 346, 373].

Не всегда фармакологически корректно для вытеснения патогенных микроорганизмов вместо антибиотиков применять препараты на основе *Bac. subtilis*, антагонистическая активность которых зависит от свойств используемых штаммов продуцировать определенный спектр антибиотиков, который, как и у синтетических антибиотиков, не абсолютен [114, 225].

Пробиотические препараты не стандартизируются по антимикробной активности, зависящей от условий культивирования, питательной среды. Поэтому, в производственных условиях часто получают переменный эффект (разная концентрация антибиотиков – трудно точно определить необходимую дозу). Иногда такие препараты проявляют активность, даже в отношении патогенных штаммов, которые утратили чувствительность к обычным антибиотикам. Если нет глубокого нарушения микробиоценоза и слизистой кишечника, то нормальная микрофлора может восстановиться после применения пробиотиков, содержащих *Bac. subtilis*, самопроизвольно. В некоторых случаях, иногда при длительном применении, такие пре-

параты сами могут провоцировать развитие дисбактериозов, привыкание и селекцию устойчивых патогенных штаммов, поражающих как кишечник, так и другие органы (легкие, суставы и т.д.) [218, 375].

Патогенный потенциал *Bac. subtilis* обычно описывается как низкий или несуществующий. В соответствии с принятой классификацией причин смертности, в статистике смертности ВОЗ данные по *Bac. subtilis* не отслеживаются. Только несколько случаев инфекции *Bac. subtilis* описано в литературе. Однако, есть риск для иммунокомпрометированных лиц с иммунодефицитами, при лечении фармацевтическими продуктами, содержащими живые микроорганизмы (особенно полиантибиотикоустойчивыми) [459].

Одним из преимуществ штаммов *Bacillus* является их технологичность: способность к росту на простых по составу (не требуют добавления в среду культивирования каких-либо витаминов или аминокислот), недорогих средах, высокий выход готового продукта, стабильность при хранении, что позволяет создавать высокоэффективные технологии. Бактерии рода *Bacillus* широко применяются для производства ферментов, биопрепаратов, средств защиты растений и т.п. Наличие разработанных технологий и сред для культивирования бацилл, а также доступные знания физиологии и генетики этих микроорганизмов значительно облегчают разработку и выбор оптимальных условий получения новых биопрепаратов на их основе [145, 255].

Анализ литературных данных показывают, что штаммы *Bac. subtilis* являются наиболее активными по сравнению с другими бактериями, исходя из этого, применение монобиотиков и поливалентных пробиотиков на основе штаммов *Bac. subtilis* оказывают высокую лечебно-профилактическую эффективность при инфекционных энтеритах телят.

### 1.5. Лекарственные формы пробиотиков

Перспективными направлениями научных исследований являются не только создание новых пробиотиков, но и разработка оптимальных лекарственных форм, обеспечивающих сохранение лечебных свойств препаратов и удобство их применения для разных видов животных [45, 69, 363].

Развитие лиофилизационной техники позволило выпускать пробиотики в виде сухих препаратов, лиофильно высушенных микроорганизмов в чистом виде или в технической форме с питательной средой. В качестве наполнителей для сухих препаратов используют сухое молоко, сахарозу, а для технической формы – кукурузную, рыбную или другую муку. Такие формы наиболее удобны (в отличие от жидких) при групповом назначении животным с кормом [363].

Создание сухих форм позволило расширить сферу применения и выпускать более стандартизованные пробиотические препараты, сохраняющие свои свойства длительное время. Так, высокую эффективность показали применяемые для профилактики и лечения у телят желудочно-кишечных заболеваний твердые формы бифидобактерина (лиофилизированная биомасса активных бифидобактерий) и лактобактерина (смесь двух штаммов лактобактерий) [65, 233].

Для более длительного сохранения физико-химических и лечебных свойств, пробиотики 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 [21, 100, 280, 468]: высокие затраты на индивидуальную и транспортную тару (ампулы, флаконы, ящики и коробки); 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 (вскрытие ампул / флаконов, регидратация их содержимого) и др. [233].

Поэтому серийный выпуск пробиотиков в порошках, жидкой, таблеточной и других лекарственных формах (ЛФ), упакованных во вмещающие большое количество доз емкости, исключит большинство недостатков, свойственных производству пробиотиков в ампулах или флаконах, и позволит применять эти препараты для терапии и профилактики разных видов животных и птиц [413].

Технологии бинарных или многокомпонентных, полидисперсных лекарственных порошкообразных биопрепаратов, дозированными веществами, включают многостадийную переработку исходных компонентов, трудоемки и энергозатратны [100, 194, 224, 228, 378]. Для промышленного животноводства и птицеводства требуются большие объемы пробиотиков, поэтому порошки, обладающие сыпучестью, в отличие от лиофильно высушенных пробиотиков в ампулах и флаконах, можно фасовать в различную экономичную тару (пакеты и мешки), что снижает расходы на упаковку и транспортировку биопрепаратов и позволяет легко их дозировать [199, 209].

Весьма актуальна разработка энергомассосберегающих технологий порошкообразных препаратов. Традиционная технология получения порошков включает отдельно проводимые операции с использованием различного оборудования: высушивание биомассы, смешивание компонентов, подсушивание и др. Разработана технология приготовления порошков в СТМ-сушилке термолабильных материалов, предназначенной для одновременной сушки, измельчения и смешения сухих и жидких материалов. Время измельчения компонентов до частиц вещества размером от 1 до 15 мкм (гранулометрический состав порошков (смесей) влияет на их физико-химические и технологические свойства) составило 20, смешения – 7 мин. Разработанный способ, в сравнении с традиционными технологиями, в 3 – 4 раза снижает энергозатраты на единицу продукта, в 4 – 5 – потери компонентов, в 5 раз – себестоимость препарата [195, 215].

В связи с недостаточным сроком хранения, пробиотики из эндогенных бактерий (бифидобактерий, лактобацилл и др.) в жидкой форме для ветеринарной практики промышленным способом не производятся [100].

Однако, в свиноводстве и птицеводстве наиболее удобна в применении именно жидкая ЛФ пробиотиков, которая наряду с невысокой стоимостью не требует предварительной подготовки перед дачей животным и птицам, равномерно смешивается с водой, молоком, сухим и жидким кормами и др. [178, 359, 396, 458].

При производстве, на основе живых микроорганизмов, в жидкие биопрепараты добавляют стабилизаторы, которые, с одной стороны, не должны разрушать биологические компоненты, а с другой – должны поддерживать жизнеспособность бактерии антагонистов и стерильность препарата [95, 280].

Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus*, устойчивых к факторам внешней среды, в том числе и к различным химическим веществам, рассматривают как перспективные, в плане создания жидких ЛФ [39, 48, 273, 324].

Производители многих препаратов на основе *Bac. subtilis* заявляют, что их можно подвергать нагреванию и гранулированию. Следует иметь в виду, что при 100°C гибнет вегетативная форма любого микроорганизма, разрушаются все ферменты, продуцируемые микроорганизмами [48, 145, 221].

При нагревании сохраняются только споры. Но для этого необходимо, чтобы препарат был изготовлен с достаточным выходом спор. Так как *Bac. subtilis* по свойствам аэроб, условия в толстом отделе кишечника животных и птиц, где молекулярный кислород отсутствует, не являются для него оптимальными. Споры в составе гранулированного корма требуют для активизации достаточного времени. Это надо учитывать, например, если пассаж по кишечнику значительно увеличен в связи с диареей. Но высокую температуру при гранулировании хорошо выдерживают антибиотики,

которые в большом количестве продуцирует *Bac. subtilis*. Известно, что в прошлом широко применяли кормовые антибиотики, где микроорганизм был убит нагреванием, а антибиотические продукты жизнедеятельности сохранялись. Они влияли на проницаемость клеток ЖКТ и, увеличивая ее, стимулировали прирост [144, 221].

В номенклатуре ветеринарных и фармацевтических средств, выпускаемых в большинстве стран, значительную часть составляют таблетки – одна из наиболее перспективных ЛФ, производство которой является достаточно рентабельным и масштабным. Выпуск таблеток, в настоящее время, составляет около 80% всех готовых лекарственных средств, однако число таблеточных бактериальных препаратов ограничено несколькими видами применяемых в ветеринарной практике вакцин и пробиотиков. О недостаточной изученности этой проблемы свидетельствует имеющаяся литература, в которой представлено незначительное число работ, описывающих состав, технологию получения и свойства таблеток биопрепаратов [263, 300, 304, 370, 469].

К числу преимуществ таблеточных ЛФ препаратов относятся: возможность более точной дозировки; стабильность физико-химических и биологических свойств сухих компонентов таблеток; возможность обеспечения высокой степени стандартизации по физико-химическим и биологическим свойствам; удобность упаковки, хранения, транспортировки и применения; доступность для массового выпуска и экспрессность применения [209, 263, 300, 304, 370, 441].

Качество таблеток в основном определяется активностью субстанции, идентичностью состава, механической прочностью, скоростью распада, внешним видом и гигроскопичностью таблеток. При производстве таблетированных препаратов, на основе живых микроорганизмов, должны учитываться эти взаимосвязанные показатели качества, находящиеся в тесной зависимости от состава таблетлируемого препарата и режима работы технологических машин-автоматов, влияющие на эффективность сразу же после

изготовления и даже непродолжительного хранения [210, 220, 269, 370]. Как правило, пробиотики в таблетированной форме содержат 1 – 5 лечебно-профилактических доз и имеют срок годности 1-3 год при температуре хранения не выше 6°C [22].

Основными причинами незначительного объема производства пробиотиков в таблетках являются высокие уровни инактивации вегетативных клеток бактерий на стадиях сушки, измельчения, гранулирования, прессования и хранения [370].

Требуемые для процесса прессования физические и технологические свойства (сыпучесть, прессуемость, гранулометрический состав, плотность) порошкам позволяет придать грануляция, которая включает в себя измельчение, увлажнение связующими веществами, протирание массы через сито, ее высушивание и повторное протирание через сито [34, 300, 304, 370, 468].

В то же время, негативное влияние на лабильные лекарственные субстанции и микроорганизмы может оказывать увлажнение и высушивание гранулята, жестких требований к гранулометрическому составу которого в литературных источниках [45, 69, 209, 252, 262, 273, 363] нет. Технологическими свойствами гранулятов, размерами таблеток, а также техническими параметрами дозирующих устройств, применяемых на таблетировочных машинах, определяется использование гранул размером 0,05 – 1,5 мм.

На стадиях технологического процесса таблетирования пробиотиков на основе спорных форм микроорганизмов правомерно ожидать высокую сохраняемость бацилл (не менее 50% зрелых спор). Однако следует отметить, что реализация потенциально высокой пригодности биокомпонентов «спорных» пробиотиков к таблетированию практически не изучена и может быть осуществлена в технологии лишь при выполнении ряда условий и ограничений. Минимум инактивирующего действия факторов внешней среды на биокомпоненты и удовлетворительные физико-химические свой-

ства таблеток должна обеспечить оптимизация технологических параметров.

### **1.6. Механизм действия пробиотиков**

В пищеварительный тракт животных с первых минут жизни поступает множество разнообразных групп микроорганизмов, однако не все они приживаются в кишечнике, в котором в процессе эволюционного развития сформировался определенный микробиоценоз, обусловленный постоянной нормальной, или резидентной, микрофлорой [51, 56, 212, 219, 238, 243, 321, 287, 289, 333].

Антигенно чужеродная микрофлора заселяет кишечник животных, кишечная иммунная система которого, тем не менее, сохраняет нормальный гомеостаз и фактически толерантна к большинству кишечных микроорганизмов, обеспечивающих организм хозяина некоторыми питательными веществами, включая короткоцепочные жирные кислоты, а также витаминами К и группы В, аминокислотами [319, 373, 483]. Полагают [321], что нормофлора, колонизирующая ЖКТ и постоянно присутствующая в нем, обеспечивает основную защитную функцию макроорганизма.

Сообщают [230, 235], что основные представители микробиоценозов кишечника – молочнокислые, и бифидобактерии, популяции которых расположены на поверхности оболочки слизистой, примыкая к мембранам энтероцитов, или локализованы в непосредственной близости от поверхности эпителия, в слое муцина, покрывающего мембраны эпителиальных клеток. Микроорганизмы, ассоциированные со слизистой оболочкой, составляют мукозную микрофлору (М-флору), а локализующиеся в просвете – полостную (П-микрофлору) [347], состав которых в зависимости от рациона кормления и внешних воздействий, может существенно различаться по количественной и качественной характеристикам и по-разному изменяться [159, 260].

Отмечают, что резидентные микроорганизмы, адгезированных на

стенке кишечника, предотвращают размножение патогенов, их внедрение в энтероциты и прохождение через кишечную стенку, защищают хозяина от патогенов, а также формируют переднюю линию слизистой защиты. Бактерии кишечника, успешно конкурируя за необходимые питательные вещества или за эпителиальные сайты прикрепления, предотвращают кишечную колонизацию патогенными микроорганизмами, образуя антимикоробные соединения, энергозависимые жирные и химически модифицированные желчные кислоты, создают локальную неблагоприятную для развития патогенных микроорганизмов окружающую среду, стимулируют восстановление иммунных клеток подслизистого слоя (*Lamina propria*), которые образуют второй слой защиты [377, 470].

Выживаемость цыплят, при замедленном формировании микробиоцинозов пищеварительного тракта, зависит от санитарного состояния кормов, воды, окружающей среды. Желудочно-кишечные болезни (диспепсия, гастроэнтерит, энтероколит, клоацит и токсико-септические инфекции) возникают в результате микробиологических изменений. Поэтому применение пробиотиков, многогранно воздействующих на микробиологию пищеварительного тракта и занимающих ведущее место среди средств для формирования нормобиоза и колонизационной резистентности, необходимо включать в систему профилактических мероприятий [9, 28, 237, 243, 246, 334, 383].

Образование антибактериальных веществ, конкуренция за питательные вещества и место адгезии, изменение микробного метаболизма (увеличение или уменьшение ферментативной активности), стимуляция иммунной системы, противораковое и антихолестеринемическое действие являются наиболее важными аспектами взаимодействия пробиотических штаммов с микрофлорой кишечника и организмом животного [338].

Положительный эффект пробиотиков, обладающих разносторонним фармакологическим действием, обусловлен их участием в процессах пищеварения и метаболизма организма-хозяина, биосинтезом и усвоением

белка и многих других БАВ, обеспечением резистентности макроорганизмов. В значительной степени нормальная деятельность многих систем и органов животных зависит от видового состава и межвидового соотношения микроорганизмов, с момента рождения заселяющих их [56, 294, 400].

Одной из основных функций симбионтных микроорганизмов является участие в белковом питании. Микроорганизмы, в результате сложных биохимических процессов, протекающих в ЖКТ хозяина, усваивают поступающие питательные вещества, размножаются, растут и быстро увеличивают свою биомассу, а отмирая, перевариваются и усваиваются организмом, являясь источником белка [334].

Благодаря ферментационной активности (амилолитической, протеолитической, целлюлозолитической и др.) симбионтная флора способна синтезировать многие БАВ (органические кислоты, спирты, липиды, витамины, особенно группы В, соединения тетрапирольной структуры), многие из которых, всасываясь в кровеносное русло, активно участвуют в энергетическом и витаминном обменах, играя важную роль в жизнеобеспечении организма хозяина [226, 240].

Органические кислоты, усиливая перистальтику и секрецию кишечника, способствуют перевариванию корма и повышают резорбцию кальция и железа. Полифосфаты бактерий принимают участие в переносе сахаров в клетку, выполняя функцию гексокиназ [267].

Вместе с тем симбионты способны синтезировать метаболиты, обладающие антитоксическим действием. Так, болгарская палочка вырабатывает вещество, способное нейтрализовать энтеротоксин кишечной палочки, патогенной для свиней. Пробиотическая микрофлора принимает участие и в инактивации избытка некоторых пищеварительных ферментов, детоксикации отдельных экзогенных и эндогенных веществ [23, 56, 257, 298].

Защита от патогенной микрофлоры, которая обеспечивается разными механизмами, является другой функцией симбионтных микроорганизмов.

От патогенных бактерий и вирусов, обладающих генетически детерминированными инвазионными свойствами, неспецифическую защиту кишечника местная микрофлора выполняет путем создания антагонистического барьера, так называемой колонизационной резистентности кишечника. Микрофлора кишечника, вступая в тесный контакт со слизистой оболочкой кишечника и покрывая его поверхность толстым слоем, механически предохраняет ее от внедрения патогенных микроорганизмов [312, 358]

Антибактериальная активность симбионтов обусловлена способностью продуцировать спирты, перекись водорода, молочную, уксусную и другие органические кислоты, синтезировать лизоцим и антибиотики широкого спектра действия (лактолин, низин, ацидофилин, лактоцид и др.). За счет более высокого биологического потенциала, быстрого размножения и достижения М-концентрации, более короткой lag-фазы, изменения рН или окислительно-восстановительного потенциала среды, симбионты могут угнетать рост других видов [23, 56, 257, 298, 397, 421].

Симбионтные серотипы кишечной палочки обладают перекрестными антигенными свойствами с патогенными, поэтому макроорганизм, вырабатывая иммуноглобулины по отношению к первым, приобретает механизм защиты и к патогенным серотипам, хотя и никогда не имел с ними контакта [23].

Важной проблемой, требующей пристального внимания исследователей, является бактериоциногенез в экосистеме пищеварительного тракта животных и птиц [98].

Антагонизм кишечной палочки обеспечивается также продукцией бактериоцинов (колицинов) [168]. У *L. acidophilus* обнаружили несколько бактериоцинов, описали два бактериоцина: лактацин В и лактацин F [168, 169], первый из которых ингибировал бактерии видов *L. leuchmanii*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. lactis*, а второй в дополнение к указанным – *L. fermentum* и *Streptococcus faecalis* [410, 452, 473, 478].

Пропорционально концентрации возрастало бактерицидное действие

лактацин В. Очищенный препарат – белок с молекулярной массой 6000 – 6500 Да – имел такой же спектр антагонистической активности, что и «сырой» препарат. Лактацин F представляет собой пептид, состоящий примерно из 56 аминокислот [456].

Бактериоцины, продуцируемые *L. brevis* В 37 и *L. casei* В 80, получили названия соответственно бревицин 37 и казеинин 80, первый из которых проявлял антагонистическую активность в отношении многих молочнокислых бактерий и *Nocardia corallina*, тогда как второй ингибировал лишь один штамм *L. casei* В 109 [460].

Кроме лактобацилл, бактериоцины образуют грамотрицательные кишечные бактерии, энтерококки, стрептококки и многие другие систематические группы микроорганизмов. Бактериоциногену среди бактерий рубца обнаружили у *Streptococcus bovis* и анаэробов рода *Butyrivibrio* [42].

Неясен механизм продукции молочнокислыми бактериями противоопухолевой активности, которая, предполагается, обусловлена гликопептидами. Лабильностью активного начала у молочнокислых бактерий, особенно *L. bulgaricus*, могут быть частично объяснены варьирующие результаты противоопухолевой активности [331, 340].

Показано [431], что кишечный микробиоциноз может изменять уровень холестерина в сыворотке крови. У содержащихся, на обогащенных холестерином рационах, у безмикробных животных аккумулируется приблизительно в 2 раза больше холестерина в крови, чем у животных с обычной микрофлорой, которые экскретируют холестерин в фекалиях больше, чем безмикробные животные: вероятно, кишечная микрофлора препятствует его всасыванию из кишечника.

Выявлено [432, 433], что чистые культуры лактобацилл, бифидобактерий, молочнокислых стрептококков и эшерихий способны ассимилировать холестерин. Установлено, что *L. acidophilus* в присутствии желчи и в анаэробных условиях активно удаляла холестерин из лабораторных сред.

За счет активации ферментов слюны и поджелудочной железы, а

также секретируют желёз желудка и кишечника, деконъюгации солей желчных кислот - симбионты могут проявлять губительное действие на патогенные микроорганизмы. Симбионтная микрофлора способствует повышению общей неспецифической резистентности организма - хозяина, активно участвуя в обменных процессах и поставляя ему жизненно важные пластические вещества [23, 298].

У ацидофильных бактерий, бифидобактерий, молочнокислого стрептококка и др. антагонистическая активность выражена в наибольшей степени [126, 157].

Для профилактики дисбактериозов молодняка сельскохозяйственных животных и птиц широко применяются пробиотики. Ошибочно рассматривать дисбактериозы, как механический процесс чрезмерного развития условно-патогенной микрофлоры под воздействием внешних факторов, без учета реакций организма-хозяина. Основной предпосылкой развития кишечных дисбактериозов со стороны макроорганизма является иммунодефицитное состояние, обусловленное сочетанным эффектом эволюционных особенностей развития иммунного ответа, в раннем постнатальном периоде, и воздействием внешних иммунодепрессивных факторов, таких как технологический стресс, лекарственная и антибиотиковая терапия, чрезмерная нагрузка антигенами при плановых вакцинациях, дефицит белков и витаминов, нарушение молозивного иммунитета и др. Последствия иммунологической депрессии многогранны, но в первую очередь, они проявляются сдвигом регуляторной функции макроорганизма, которая поддерживает баланс между нормальной и условно-патогенной кишечной микрофлорой [109].

Недооценка особенностей иммуногенеза дисбактериозов приводит к тому, что пробиотики, содержащие штаммы бифидобактерий или лактобацилл с высокой колонизационной активностью, теряют свою адгезивную связь с рецепторами клеток кишечника, и препараты становятся малоэффективными в профилактике дисбактериозов [126, 157].

Применение пробиотиков не всегда сопровождается положительным эффектом. По-видимому, противоречивость результатов ряда исследований обусловлена недостаточной изученностью этих препаратов, неудачным подбором входящих в их состав штаммов бактерий, технологическими проблемами при их производстве и применении, и другими причинами [145, 158].

Большой интерес, как в научном, так и в практическом отношении представляет изучение фармакологических свойств пробиотиков и влияние их на микробиоценозы пищеварительного тракта. При естественном способе введения пробиотики, за счет оптимизации и стабилизации функции микробиоценоза кишечника, оказывают положительное влияние на физиологические, биохимические, иммунные реакции организма хозяина. Одним из важнейших свойств пробиотиков считается их способность к фиксации на эпителиоцитах слизистой оболочки кишечника, что обеспечивает устойчивую колонизацию кишечника нормальной микрофлорой. Так, действие *E. coli* M-17 осуществляется в результате колонизации толстого кишечника путем адгезии и вытеснения патогенов [255, 436].

Схожий механизм действия имеют все препараты на основе спор бактерий *Bac. subtilis*, споры которых прорастают в вегетативную форму в тонкой кишке. Максимум этот процесс достигает в илеоцекальной области. При прорастании спор высвобождаются ферменты, способствующие расщеплению белков, жиров и углеводов, а также образуется кислая среда, препятствующая процессам гниения и росту патогенных бактерий. Кроме того, ферменты вызывают непосредственный лизис клеточных стенок протей, кишечной палочки, патогенного стафилококка. Поскольку, полученные искусственным путем, штаммы бацилл не являются физиологическим компонентом биоценоза кишечника, при назначении препаратов из спорообразующих микроорганизмов рекомендуется осторожность: применение таких препаратов короткими курсами и при слабом эффекте от предшествующего использования бактериальных препаратов-эубиотиков [255].

В отличие от антибиотиков механизм действия пробиотиков направлен не на уничтожение, а на конкурентное исключение условно-патогенных бактерий из состава кишечного микробиотопа, чтобы предотвратить усиление и передачу факторов вирулентности в популяции условно-патогенных бактерий [218, 312, 338].

Бактерии-пробионты обеспечивают опережающее заселение кишечника новорожденных животных нормальной микрофлорой и создают биологический барьер, преграждающий доступ к нему условно-патогенных бактерий. В процессе жизнедеятельности бактерии-пробионты вырабатывают комплекс биологически активных соединений, избирательно воздействующих на условно-патогенные микробы [57, 169, 174, 262, 313].

Обмен сигнальными молекулами бактерий-пробионтов с иммунокомпетентными клетками слизистой кишечника усиливает продукцию секреторного иммуноглобулина А, комплемента, лизоцима, блокирующих прикрепление энтеропатогенных бактерий к поверхности слизистой. Регуляторное влияние молочнокислых бактерий на микрофлору кишечника установил еще И.И. Мечников (1903 – 1905), а первые попытки использовать пробиотики были связаны с поиском путей профилактики сальмонеллеза и колибактериоза в промышленном птицеводстве, без применения антибиотиков [82, 236, 253].

Механизм действия пробиотиков, в достаточно полной форме, обоснован многими авторами [48, 114, 264, 273, 298, 302, 320, 332, 346, 347, 348, 374, 378, 383]. При введении в организм пробиотики ведут себя как своеобразный «биореактор», осуществляющий синтез БАВ с последующей их «доставкой» к сайтам-мишеням макроорганизма.

После приема препарата начинают выделяться БАВ и функционировать системы микробных клеток, оказывающие, как прямое действие на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, так и опосредованное – через активацию специфических и неспецифических систем защиты макроорганизма. В этот же период, бактериальные клетки пробиотика, кото-

рые могут рассматриваться как биокатализаторы многих жизненно важных процессов в пищеварительном тракте, активно продуцируют ферменты, аминокислоты, антибиотические вещества и другие физиологически активные субстраты, дополняющие комплексное лечебно-профилактическое действие [157, 333, 365].

Последние данные по изучению механизма действия пробиотиков из бацилл свидетельствуют о том, что помимо локального действия во внутренних открытых полостях макроорганизма, где потенциальными мишенями являются клетки, выстилающие слизистые, бациллы могут в течении 5 – 10 мин, персистировать в крови, проникая в органы и ткани, осуществляя к ним доставку БАВ, в частности пептидных антибиотиков [313, 358].

По данным ряда авторов [323, 461, 477], в качестве вектора доставки и экспрессии белков, с фармакологической или иммунологической активностью, могут использоваться некоторые виды *Bacillus*, являющиеся неотъемлемыми компонентами микрофлоры организма и отличающиеся от других ее представителей (молочнокислые бактерии, бифидобактерии и др.) рядом преимуществ:

- безвредностью для макроорганизма, даже в концентрациях, значительно превышающих рекомендуемые для применения (за исключением *B. anthracis* и *B. cereus*);

- способностью существенно повышать неспецифическую резистентность макроорганизма при пероральном применении;

- более выраженной антагонистической активностью к широкому спектру патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, чем у других представителей экзогенной и эндогенной микрофлоры;

- высокой ферментативной активностью, позволяющей существенно регулировать и стимулировать пищеварение, оказывать противоаллергенное и антитоксическое действие [323];

- технологичностью в производстве и стабильностью при хранении. Доступные знания генетики и физиологии этих микроорганизмов облегча-

ют разработку контролируемых систем экспрессии генов и их адаптацию к крупномасштабной ферментации. Образование спор – наиболее устойчивой формы жизни, обнаруженной на земле, гарантирует сохранность штаммов, даже в жестких условиях внешней среды (способность к быстрому росту на простых, недорогих средах) [422, 477];

- экологической безопасностью, имеют статус GRAS (generally regarded as safe) [323].

Общим состоянием, и в первую очередь, состоянием пищеварения и обмена веществ, обеспечиваются рост и развитие животных, важнейшими регуляторами которых являются специфические продукты физиологической микрофлоры ЖКТ [98, 130, 175, 181, 334, 339].

Благодаря своим ферментативным свойствам микроорганизмы ЖКТ, перерабатывают значительное количество органических веществ, синтезируют высококачественный белок, аминокислоты, витамины, антибиотические вещества и другие ценные метаболиты. Кроме того, нормальная микрофлора выполняет защитные функции. В этом случае большое значение имеют обменные микробы, способные образовывать бактерицидные вещества и препятствовать проникновению и развитию посторонних нежелательных и патогенных бактерий [202, 336, 440].

В животноводстве, при применении микробных препаратов, повышается качество и использование кормов, ускоряется рост животных, их продуктивность, а также снижается себестоимость продукции и резко уменьшается число случаев заболеваний и падежа [18, 79, 216, 219, 221, 226, 227, 236, 240, 318, 449].

Пробиотики многогранно воздействуют на микроэкологию пищеварительного тракта и организм животного в целом. Образование антибактериальных веществ, конкуренция за питательные вещества и места адгезии, изменение микробного метаболизма (увеличение или уменьшение ферментативной активности), противораковое и антихолестеринемическое действие являются наиболее важными аспектами взаимодействия пробиотиче-

ских штаммов с микрофлорой кишечника. Размножаясь, бактерии выделяют в процессе жизнедеятельности ферменты-протеазы, лизирующие вещества, несвойственные организму животного. При этом, нейтрализуются и уничтожаются бактериальные токсины, дефектные клетки; повышаются фагоцитарная активность лейкоцитов крови, иммунный статус и устойчивость организма к вирусным и бактериальным заболеваниям; происходит стабилизация аллергической устойчивости организма, усиливаются регенеративные процессы в тканях, нормализуется обмен веществ. Выработываемый в процессе своей жизнедеятельности, входящими в состав пробиотиков бактериями, интерферон активизирует гуморальные факторы иммунного ответа [36, 74, 87, 174, 224].

Исходя из вышеизложенного видно, что антагонизм пробиотиков основан на образовании антибактериальных веществ и изменении метаболизма патогенов.

### **1.7. Лечебно-профилактическая эффективность пробиотиков**

Изучена терапевтическая и профилактическая эффективность энтеробифидина и лактобактерина при диспепсии у новорожденных телят. Для стимуляции роста полезной микрофлоры ЖКТ молодняка КРС использовали симбиотический препарат на основе лактулозы и молочнокислых бактерий. Противобактериальное действие в отношении представителей микробного биоценоза кишечника телят проявляет лактобрил. Споролакт повышает резистентность и стимулирует рост и развитие молодняка сельскохозяйственных животных; на пищеварение и ростовесовые показатели влияет пробиотический препарат Pi [6, 20, 24, 46, 59, 62, 83, 164, 188, 265, 306, 379, 482].

В составе микрофлоры кишечника, у страдающих диареей новорожденных животных, преобладают эшерихии и грамположительные кокки, а лактобактерии и бифидобактерии составляют лишь 11,8%. Резкому снижению количества *E. coli* способствовало подселение в кишечник пробиоти-

ков-бифидобактерий, которые обеспечивали терапевтический и профилактический эффект. Поэтому, с целью раннего становления «нормального» кишечного микробиоценоза, в первые 5 – 7 дней жизни, животным необходимо применять пробиотические препараты (первый прием – после первой порции молозива) [10, 94, 115, 137, 150, 167, 208, 281, 326].

Ряд авторов [68, 87, 119, 120, 121, 128, 132, 203, 205, 239, 258, 268, 317, 427, 442, 476] сообщает о применении пробиотиков для профилактики и лечения болезней молодняка животных. Рассмотрены различные эффективные способы профилактики и терапии диареи новорожденных телят [162, 357]. Эффект микробных препаратов при профилактике диарейных болезней телят отмечен у бифидо-, лакто- и пропионовокислых бактерий (в комплексе) [90, 118, 129, 152, 172, 173, 184, 417, 437, 457, 475]. При диспепсии телят применяли сухой и жидкий бифидумбактерин [58, 179, 474]. При лечении колибактериоза телят бифидобактерином получен положительный эффект [11, 122]. При экспериментальном энтеробактериозе телят применение Т-, В-активина и пробиотического препарата лактобактерина снижало воспалительные и некротические процессы в органах, усиливая метаболические и иммунные процессы [110]. Для профилактики и терапии желудочно-кишечных болезней телят разработано высокоэффективное пробиотическое средство Ветом-1.1 [84, 142]. Предложен пробиотик с пролонгированным действием [131, 141].

Установлено, что Лактоамиловорин имеет высокую профилактическую и лечебную эффективность при болезнях ЖКТ [113, 427]. Для коррекции дисбактериоза телят с симптомокомплексом диареи использовали пробиотический препарат РАС на основе штамма *Bac. subtilis* 534 (споробактерин), который впрофилактической (1 мл) и терапевтической (4 мл) дозах вводили телятам из канюли шприца в корень языка, до второй выпойки молозива и далее ежедневно перед утренним кормлением. Животным контрольной группы назначали противомикробные и иммуностимулирующие препараты (энрофлокс, цитоден, климоксил, триметосун). Час-

тота возникновения болезни в контрольной группе была выше на 57,8% по сравнению с опытной (n=9), в которой заболели 8 (длительность болезни – 1 день), повторно – 4 теленка (длительность болезни – 1 – 2 дня). В контрольной группе (n=9) эти показатели составили, соответственно 9 и 7 (1 – 6 дней). На 11-й день в этой группе 4 теленка оставались больными. В опытной группе за 10 дней прирост массы тела составил 7, в контрольной – 4 кг, среднесуточный прирост в месячном возрасте составил, соответственно 240 и 110 г. Устойчивый к антибиотикам пробиотик РАС может применяться в комплексе с антибактериальной терапией [28, 170, 177, 182, 200, 206, 207, 234, 297, 436].

Первичные и вторичные иммунодефициты колострального иммунитета у молодняка, антибиотикотерапия, нарушение условий содержания и кормления матери и потомства, вакцинация являются основными причинами, вызывающими сдвиги в кишечном биоценозе [164, 190, 193, 213, 301, 341, 342, 344, 345, 351, 392]. Для лечения и профилактики сдвигов кишечного биоценоза разработаны и внедрены (ВГНКИ совместно с Екатеринбургской НИВС, НПФ «ЦМЭИ» и др.) лактицид (1992), локам (1995), интестевит (1996), фокосон (1996), реалак (1997), применение которых нормализует биохимические показатели сыворотки крови животных, восстанавливает кальций-фосфорное отношение, снижает активность щелочной фосфатазы, быстро восстанавливает кишечный биоценоз, стимулирует иммунологический статус, сокращает заболеваемость, падеж, повышает прирост массы тела [154, 209, 303, 329].

В РФ хорошо зарекомендовали себя - галлиферм, энтерацид, лакто-вит, биосан, бифидумбактерин, ацидофилин и другие пробиотики. Эти пробиотики, как правило, предназначены для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний, а их применение способствует повышению сохранности и прироста живой массы у молодняка. Скармливание пробиотиков позволяет ускорить рост молодняка и уменьшить его отход

[36, 63, 64, 79, 136, 156, 157, 192, 216, 219, 221, 226, 227, 236, 240, 276, 282, 332, 338, 340, 376, 381].

Таким образом установлено, что пробиотики играют большую роль в профилактике и лечении инфекционных болезней животных. Разработка эффективных методов применения пробиотиков на основании бактериологической дифференциации возбудителей, обеспечивает успех лечебно-профилактических мероприятий.

### **1.8. Перспективы использования пробиотиков в ветеринарии**

В ветеринарной медицине возрос интерес к пробиотическим препаратам, которые способствуют формированию биологического статуса, иммунного ответа, повышают эффективность вакцинаций, снижают заболеваемость, улучшают процессы пищеварения, обмен веществ, продуктивность животных, повышают экономические результаты производства за счет сокращения фармакологических обработок и связанных с ними материальных издержек, обеспечивают экологическую безопасность и биологическую полноценность продуктов животноводства, что обусловлено данными о природе аллергических, онкологических и других заболеваний, способах поддержания качества жизни и долголетия населения [29, 71, 76, 127, 133, 183, 256, 284].

Безопасности продуктов питания уделяет особое внимание, что наиболее ярко проявилось в отказе от использования антибиотиков – стимуляторов роста в странах Европейского Союза. При определенных условиях продукты убоя животных могут быть источником возникновения не только типичных инфекционных и инвазионных болезней у людей, но и различных пищевых заболеваний, к которым относят пищевые токсикоинфекции и токсикозы, возбудители которых создают особый риск для здоровья человечества [26, 148, 278, 350, 471].

В условиях промышленного животноводства и птицеводства, пробиотики являются неотъемлемым компонентом организации фармакологического обеспечения, как современных предприятий, которые используют

новейшие технологии, так и восстанавливаемых производств со старыми оборудованием и технологиями. В обоих случаях отмечается действие факторов, участвующих в нарушении нормальной микрофлоры у сельскохозяйственных животных и птиц:

1) использование новых пород, высокопродуктивных с интенсивным обменом веществ животных и птиц, более требовательных к условиям содержания и кормления. В различных системах и органах, под действием патогенетических факторов происходят функциональные срывы;

2) отрицательное влияние крупномасштабного производства с высокой концентрацией поголовья на ограниченных территориях, что приводит к необходимости многочисленных вакцинаций и высокой антигенной нагрузке;

3) вакцинальный и технологический стресс, резко снижающий резистентность, способствующий персистенции условно-патогенной микрофлоры в желудочно-кишечном тракте и других биотопах (легкие, мочеполовые пути, кожный покров);

4) применение живых аттенуированных вакцин (особенно из так называемых «горячих» штаммов), которое приводит к прямой колонизации клеток кишечника, респираторной и других систем, и к поствакцинальным сдвигам в микрофлоре соответствующих областей;

5) фармакологическая нагрузка на животных и птиц: микробиоценоз могут нарушать не только антибиотики, антигельминтики и кокцидиостатики, но и избыточно назначаемые кормовые добавки;

6) ухудшение экологической ситуации, в которой воздух, вода и корма могут быть дополнительными источниками токсических веществ, пестицидов, нарушающих слизистую оболочку различных полостей, прямо влияющих на микробиоценоз;

7) широкое распространение кормовых микотоксикозов [13, 32, 385].

Действующий комплекс факторов нарушает естественные защитные свойства нормальной пристеночной микрофлоры. Животные, питающиеся

гранулированными, часто термически обработанными кормами, в замкнутых помещениях, лишены контакта с естественными донорами нормальных микроорганизмов (почва, насекомые, растения). В окружающей среде, в связи с циклическими дезинфекциями, бессистемным и длительным использованием антибиотиков, особенно широкого спектра действия, происходит селекция резистентной к антибиотикам микрофлоры. Такую ситуацию можно сравнить с так называемой стационарной «госпитальной инфекцией» в медицине. Как остро, так и латентно без высокой смертности протекают ассоциированные инфекции, приводящие к резкому снижению производственных показателей. Естественно, при соответствующих показаниях, нельзя отказаться от вакцинаций, дезинфекций, применения антибиотиков, антигельминтиков, кокцидиостатиков, но необходимо восстановить нормальную микрофлору после их применения. Эффективное производство невозможно, если нарушена слизистая пищеварительного тракта: пищевые компоненты корма просто не усваиваются [176].

Применяемые в сельском хозяйстве пробиотические культуры являются естественной альтернативой традиционных антибиотиков. Однако, при выборе пробиотика, необходимо учитывать его фармакологические свойства. Процессы взаимодействия пробиотиков с организмом животного намного сложнее, чем простое выдавливание болезнетворных микроорганизмов. Положительный эффект пробиотиков на основе живых микроорганизмов, осуществляется через нормализацию микробной экологии организма - хозяина:

а) ингибированием роста потенциально вредных микроорганизмов в результате продуцирования антимикробных субстанций, конкуренции с ними за рецепторы адгезии и питательные вещества, активации иммунокомпетентных клеток;

б) стимуляцией роста представителей эндогенной флоры в результате продукции витаминов и других ростостимулирующих факторов, нормализации рН, нейтрализации токсинов;

в) изменением микробного метаболизма, проявляющегося в повышении или снижении активности ферментов [169, 313, 373, 378, 403, 413, 423, 441, 444, 445, 462, 465, 469, 471, 481].

Даже в концентрациях, значительно превышающих рекомендуемые для применения, пробиотические препараты безвредны для макроорганизма, неспецифическую резистентность которого некоторые штаммы способны существенно повышать [29, 42, 44, 49, 159, 160, 223]. Антагонистическая активность ко многим патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, высокая ферментативная активность, позволяющая существенно регулировать и стимулировать пищеварение, противоаллергенное и антитоксическое действие характерны для некоторых штаммов бацилл [202, 216, 297, 221, 226, 225, 236, 240].

В отличие от антибиотиков, пробиотические препараты не оказывают отрицательного воздействия на нормальную микрофлору, поэтому их широко применяют для профилактики и лечения дисбактериозов. При лечении острых кишечных инфекций эти биопрепараты характеризуются выраженным клиническим эффектом. Пробиотики повышают противoinфекционную устойчивость организма, регулируют и стимулируют пищеварение [294, 321, 375].

Из-за возможности реальной угрозы распространения инфекции на все поголовье, с резким снижением производственных показателей, нельзя полностью отказаться от антибиотиков. При лечении отдельных инфекций эффективны сильные антагонисты на основе *B. subtilis*. Включающие лакто- и бифидобактерии препараты могут быть не эффективны, если производятся на основе медицинских или фармакологически не активных в кишечнике животных и птиц штаммов микроорганизмов. Препаратами на основе дрожжей невозможно нормализовать приембранное пищеварение. При отрицательном результате применения пробиотиков необходимо проанализировать все обстоятельства, так как только при грамотном планировании всего комплекса ветеринарных мероприятий удастся получить эко-

номический результат от применения пробиотических препаратов [146, 221].

Возможности использования пробиотиков в ветеринарии затрагивают довольно широкий круг проблем, начиная от коррекции кишечного биоценоза и распространяясь на коррекцию иммунной, гормональной и ферментативной систем молодняка. Это определяет необходимость внедрения пробиотиков в систему выращивания животных, для профилактики неинфекционных желудочно-кишечных заболеваний молодняка, поддержания колонизационной резистентности кишечника, повышения физиологического статуса организма новорожденных животных, стимуляции роста и развития, получения качественной продукции, безопасной в ветеринарно-санитарном отношении [220, 226, 234, 244, 355].

Показано, что включение пробиотических препаратов различного видового состава в систему выращивания молодняка животных, снижает заболеваемость желудочно-кишечными болезнями, повышает естественную резистентность молодняка и сохранность, корректирует кишечный биоценоз, стимулирует откорм, сокращает продолжительность выращивания, уменьшает затраты кормов [60, 61, 312, 338].

Для профилактики массовых инфекционных энтеритов полифакторной этиологии, стимуляции роста и развития животных, восстановления нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта, в животноводстве и ветеринарии широко используют пробиотики с разносторонним фармакологическим действием. Положительный эффект этих препаратов обусловлен подавлением развития многих видов условно-патогенной и патогенной микрофлоры, за счет продуцирования антибиотических веществ (полипептиды, бактериоцины, полисахариды, пептидогликаны и т.д.) и более высокого биологического потенциала к размножению, а также участием в процессах пищеварения и метаболизма организма-хозяина с биосинтезом белков и многих БАВ, обеспечивающих нормализацию и повышение его физиологического состояния [14, 157, 226, 434].

Полная безвредность и многостороннее биологическое действие (высокая антибиотическая активность, стимуляция естественной резистентности, индукция эндогенного интерферона, продукция ферментов и др.) пробиотиков из живых культур открывают широкие возможности в совершенствовании схем и методов их применения, а также в создании на этой основе новых высокоэффективных лечебно-профилактических препаратов, способствующих снижению отхода животных и повышению их продуктивности [97, 273, 364, 368, 387].

При несоблюдении условий выращивания молодняка (ограничение контакта с матерями, нарушение кормления и содержания), приводящем к развитию дефицита облигатных бактерий в микрофлоре кишечника, возникает потребность в применении пробиотиков [104, 236, 240, 293, 321].

Нормальная кишечная микрофлора предохраняет животных от заболевания, резистентность и устойчивость которых, к действию неблагоприятных факторов внешней среды, уменьшается при применении антибиотиков. Введение в рационы антибактериальных ростовых стимуляторов часто повышает выживаемость сальмонелл в кишечнике птицы, носительство которых в кишечнике, устраняют дачей суточным цыплятам суспензии из фекалий взрослых птиц [49, 413, 418, 423, 425].

Пробиотические препараты применяют для стимуляции неспецифического иммунитета, профилактики и лечения смешанных инфекционных энтеритов, расстройств пищеварения алиментарной этиологии (дисбактериозы, острые молочнокислые ацидозы и др.), возникающих вследствие резкого изменения состава рациона, нарушения режимов кормления, технологических стрессов и других причин [146, 156, 219, 224, 225, 228, 232, 241, 261, 249, 366, 371, 388].

В клинической практике пробиотики используют для стимуляции неспецифического иммунитета [113, 174], профилактики и лечения смешанных желудочно-кишечных инфекций [27, 124, 134, 201, 338], восстановления расстройств пищеварения алиментарной этиологии (дисбактериозы,

острые молочно-кислые ацидозы и др.), возникающих вследствие резкого изменения состава рациона, нарушений режимов кормления, технологических стрессов и других причин [72, 309]; для переустановления микрофлоры пищеварительного тракта, после лечения антибиотиками и другими антибактериальными химиотерапевтическими средствами [42, 79, 107]; замены антибиотиков в комбикормах для молодняка животных, улучшения процессов пищеварения [11, 13, 80]; ускорения адаптации животных к высокоэнергетическим рационам и небелковым азотистым веществам [72]; повышения эффективности использования корма и продуктивности животных [26, 106, 114].

Установлены позитивные эффекты пробиотиков при лечении ревматоидного артрита, некоторых инфекций мочеполовых путей, гнойно-воспалительных осложнений в хирургической практике, а также при гинекологических заболеваниях инфекционной природы и многих других [337, 338, 339].

В ветеринарии пробиотики широко используют для стимуляции роста и развития молодняка животных, профилактики желудочно-кишечных заболеваний, восстановления кишечного биоценоза при стрессах, антибиотикотерапии, послеотъемном периоде. При длительном и регулярном применении пробиотики, являясь экологически чистыми препаратами, не оказывают побочного эффекта и, в общей схеме неспецифической профилактики желудочно-кишечных заболеваний, могут заменить антибиотики [107, 114, 160, 349, 382].

### **Заключение**

Для современного животноводства в Республике Таджикистан, главным условием рационального ведения хозяйства, является повышение продуктивности животных и обеспечение экологической безопасности производимой продукции. Исходя из этого, очевидна актуальная необходимость повышения устойчивости животных к различным инфекциям.

Установлено, что в возникновении инфекционных энтеритов молодняка сельскохозяйственных животных, большую роль играют патогенные бактерии, как в отдельности, так и в сочетании. В большинстве случаев эти микроорганизмы устойчивы к многим химиотерапевтическим препаратам.

Жесткие требования к качеству продукции животноводства и низкая эффективность лечебно-профилактических мероприятий заставляют нас изыскать альтернативные методы и средства. Уменьшение или исключение антибиотиков из производства является сложной проблемой, так как связана с сохранностью поголовья животных и их продуктивностью.

Поэтому одним из перспективных направлений в повышении лечебно-профилактических мероприятий болезней молодняка животных является разработка эффективных пробиотических препаратов на основе *Bac.subtilis* и других полезных микроорганизмов.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2006 – 2011 гг. в лаборатории микробиотехнологии ТАУ 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 зоогигиены СНАУ (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. Мукармова – Исфаринский р-н; ПК им. Дж. Расулова – Бободжон-Гафуровский р-н) и Хатлонской областей (ОАО «Баракат», УПХ ТАУ – Яванский р-н) РТ.

#### 2.1. Диагностические исследования

Бактериальные заболевания 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.

При бактериологической диагностике микроскопировали мазки крови и мазки-отпечатки внутренних органов, на элективные питательные среды высевали выделенные из патологического материала культуры, для определения, патогенности которых заражали лабораторных животных, затем культуры идентифицировали и типизировали серологическим методом.

Чувствительность выделенных культур к антибиотикам определяли методами серийных разведений, диффузии в агар (Навашин С. М., Фомина И. П., 1982), оценивая результаты, соответственно, по задержке роста (МБсК) / гибели (МБцК) и величине зоны задержки роста микроорганизмов.

**Животные.** Эксперименты проводили на 650 белых мышах (массой 18 – 20 г), 280 кроликах породы шиншилла (массой 2,5 – 2,7 кг), 120 телятах черно-пестрой породы (массой 33 – 35 кг), производственные испытания – 582 телятах черно-пестрой породы (массой 33 – 35 кг).

Разброс в экспериментальных группах по исходной массе тела не превышал 10%.

## 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. Биологические свойства пробиотиков

### 2.3.1. Антимикробная активность

Антагонистические свойства Субтилбена в форме порошка, гранул, таблеток и Лаксубтил в форме суспензии на основе штаммов *Bac. subtilis*, изучали методом серийных разведений [Егоров Н. С., 1979; Степаненко П. П., 1999] на мясопептонном бульоне (МПБ). Из исследуемых проб готовили последовательные двукратные разведения в МПБ в объеме 2 мл, в которые вносили суспензию штаммов и выделенных изолятов тест-культур в изотоническом растворе натрия хлорида в количестве 500 млн м.к. / мл среды. Посевы инкубировали при  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 24 ч, по истечении которых учитывали результат. Минимальной бактериостатической (МБсК) считали концентрацию, которая вызывала задержку роста культуры, минимальной бактерицидной (МБцК), определявшуюся при пересеве на МПА, – гибель тест-культур (отсутствие роста, наблюдали только грамположительные палочки *Bac. subtilis*). Параллельно ставили контроли на МПБ и МПА.

### 2.3.2. Токсикологические свойства

Проверку безвредности продуктов микробиологического синтеза и ЛФ на их основе (Субтилбен в форме порошка, гранул, таблеток и Лаксубтил суспензия), осуществляли методом с использованием сухой культуры инфузории *Colpoda steinii* (ТУ 9388-001-885-95. Культура *Colpodastenii* для эколого-токсикологических исследований. – М.: Стандартиформ. – 15 с), на которую согласно требованиям ГОСТа Р 52337-2005 воздействовали исследовавшимися субстанциями на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 и лекарственными формами из них, оценивая результаты биотеста по гибели стилохоний.

Для культивирования инфузорий и суспендирования субстанций и ЛФ на основе штаммов *Bac. Subtilis*, использовали раствор Лозина-Лозинского, состоящий из NaCl (0,01%), KCl (0,001%), CaCl<sub>2</sub> двуводного

(0,001%),  $MgCl_2$  шестиводного (0,001%),  $NaHCO_3$  (0,002%). В часть раствора, применявшуюся для культивирования инфузорий, вносили свежие высушенные хлебопекарные дрожжи (12 мг на 100 мл), которые предварительно тестировали на токсичность.

Использовали суточную культуру стилохоний, находившихся в фазе экспоненциального (активного) роста, для чего за сутки до опыта цисты и споры культуры пересаживали в новую питательную среду со свежим кормом и помещали в термостат при температуре 22 – 24°C.

Для приготовления рабочей суспензии испытуемых образцов, брали навеску массой  $1000 \pm 10$  мг (или объемом  $1000 \pm 10$  мкл), вносили ее в колбу вместимостью 25 мл, заливали 10 мл раствора Лозина-Лозинского и на 20 мин колбу помещали в аппарат для встряхивания жидкостей. Затем, раствор в течение 5 мин, центрифугировали с частотой вращения 1000 об/мин и использовали надосадочную жидкость.

Каждую пробу исследовали в пяти повторах. Пересадку и подсчет стилохоний проводили под микроскопом, при увеличении  $2 \times 8$  или  $2 \times 14$ . Сначала автоматической пипеткой отбирали по 20 мкл среды со стилохониями и помещали в каждую лунку двух рядов блока микроаквариумов (5 лунок в ряду). Через 2 мин учитывали в каждой лунке количество живых стилохоний. Затем в пять (опытных) лунок первого ряда добавляли по 20 мкл полученной суспензии, а в 5 лунок второго ряда (контроль) – такое же количество дистиллированной воды. Спустя 3 ч в лунках опытного и контрольного рядов снова проводили подсчет количества активных стилохоний и сопоставляли результаты. Выживаемость стилохоний каждого ряда (N, %) вычисляли по формуле:

$$N = N_2 : N_1 \times 100,$$

где  $N_1$  – среднеарифметическое (из пяти) значение количества активных стилохоний в начале опыта, экз.;

$N_2$  – среднеарифметическое (из пяти) значение количества активных стилохоний в конце опыта, экз.

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

**Острую токсичность** 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 для каждого порошка на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26.

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:

- порошки, 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.

- Лаксубтил в форме суспензии: 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.

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

Белым мышам всех групп через 6 ч после введения пробиотиков давали корм и переводили их на обычный режим кормления. За лабораторными животными наблюдали в течение 15 сут, учитывая их общее состояние, внешний вид, поведенческие реакции, прием пищи и воды, ритм и частоту сердцебиения, количество дыхательных движений.

В течение первых суток опыта за клиническим состоянием белых мышей наблюдали в течение первых шести часов, потом – через каждые 3 ч, в последующие 14 дней – ежесуточно три раза, учитывая начало и динамику развития клинических проявлений отравления, время гибели опытных животных или симптомы улучшения их физиологического состояния.

**Хроническую токсичность** порошков, гранул и таблеток Субтилбен и суспензии Лаксубтил, изучали в опытах по скармливанию препаратов один 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 (Лаксубтил – 5,0 мл/кг, Субтилбен 0,3 г/кг массы тела). Животные контрольной группы (n=10) препарат не получали. За лабораторными животными наблюдали во время всего опыта, по окончании которого их усыпляли и проводили патологоанатомическое вскрытие.

**Раздражающее действие** порошков, гранул и таблеток Субтилбен и 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 см<sup>3</sup> в течение 26 сут, учитывая реакцию кожи (гиперемия, болезненность, утолщение кожной складки, расчесы) и клиническое состояние организма лабораторных животных.

Повторное местное раздражающее действие порошков исследовали на белых мышях (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 порошков на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 в течении, соответственно 14 и 21 дня. Животным контрольных групп (n=6) по той же методике наносили подсолнечное масло. Наблюдение за белыми мышами вели в течении 30, за кроликами – 60 дней.

**Переносимость** суспензии Лаксубтил, гранул и таблеток Субтилбен исследовали общепринятыми методами на МТФ им. Л. Муродова Гиссарского района. По принципу аналогов, для каждого препарата сформирова-

ны 4 группы (n=11; опытные – 1 – 3-я, контрольная – 4-я), новорожденных телят черно-пестрой породы массой 31 – 33 кг. В опытных группах Лаксубтил и Субтилбен применяли соответственно из расчета 5,0; 10,0 и 15,0 мл/кг и 0,3; 0,6 и 0,9 мг/кг массы тела (условно-терапевтическая, двух- и трехкратная дозы от условно-терапевтической) в течение 20 сут.

За телятами наблюдали во время опыта и в течении 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-ий, 5-ый, 10-ый, 15-ый и 20-ый дни применения Лаксубтила и Субтилбена проводили биохимические исследования крови.

#### *Испытание на токсичность*

##### Аппаратура, материалы, реактивы:

весы лабораторные общего назначения, ГОСТ 24104-88, 2 класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

шприц медицинский, ГОСТ 22967-92;

ступка фарфоровая, ГОСТ 9147-80;

цилиндр мерный вместимостью 100 мл, ГОСТ 1770-74;

стаканчик для взвешивания СВ 14/8, ГОСТ 25336-82;

крахмал растворимый, ГОСТ 10163-76;

вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72 или ГФ X (с. 73);

мышы белые клинически здоровые, массой 18 – 20 г.

##### Подготовка к испытанию

Навеску 2,0 г крахмала, взвешенную с погрешностью не более 0,01 г, переносили в ступку, растирали с 5 мл дистиллированной воды. Эту смесь вливали в 95 мл кипящей воды и кипятили 2 – 3 мин при помешивании. Раствор охлаждали до комнатной температуры.

##### Проведение испытания

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

## 2.4. Методы стандартизации действующих веществ в форме порошков и лекарственных препаратов на основе *Bac. subtilis*

### 2.4.1. 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 (pH)* 10% водной суспензии определяли потенциометрически (ГФ XI, вып. 1, с. 175).

Для *определения массовой доли влаги* (порошки, Субтилбен в форме гранул и таблеток) по ГОСТ 24061-89 пробы, отобранные по ГФ XI (вып. 2, с. 15), помещали в заранее подготовленные и взвешенные бюксы. Анализ проводили на трех параллельных пробах. Закрытые бюксы с препаратом взвешивали с точностью до 0,1 мг и переносили в нагретый до 100°C сушильный шкаф, где их открывали. Пробы оставляли в сушильном шкафу при 100°C в течение 1 ч. По истечении этого срока бюксы плотно закрывали крышкой и переносили в эксикатор с хлористым кальцием на 30 мин для охлаждения до температуры 18 – 24°C, после чего их снова взвешивали.

Определение массовой доли в процентах ( $X$ ) проводили по формуле:

$$X = \frac{m - m_1 \cdot 100}{m},$$

$m$  – масса препарата до высушивания, г;

$m_1$  – масса препарата после высушивания, г.

За окончательный результат принимали среднее арифметическое трех определений.

#### 2.4.2. Биологические свойства

Подсчет количества микробных клеток *Bac. subtilis*. Пробы (Субтил-бен в форме гранул и таблеток измельчали), 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) порошков или ЛФ на основе *Bac. subtilis*, добавляли 9 см<sup>3</sup> стерильного физиологического раствора, после тщательного перемешивания, 0,5 см<sup>3</sup> суспензии переносили во вторую пробирку с 4,5 см<sup>3</sup> физиологического раствора, из которой 0,5 см<sup>3</sup> разведенной суспензии – в третью, из третьей – в четвертую, из четвертой – в пятую, из пятой – в шестую пробирку с 4,5 см<sup>3</sup> физиологического раствора.

Из последней (шестой) пробирки по 0,5 см<sup>3</sup> суспензии пипеткой засеивали в шесть чашек Петри с картофельным агаром, колебательными движениями распределяя суспензию по всей поверхности агара. Культивировали 36 ч при (37±0,5)°С, после чего учитывали результаты исследования (определяли количество больших и малых по диаметру колоний).

Для проверки на *стерильность* (ГОСТ 28085-89) пробы, отобранные по ГФ XI (вып. 2, с. 15), разводили в 4 мл стерильного физиологического раствора или раствора Хенкса и делали посевы в объеме 0,2 мл в две пробирки с МПБ, МПА, мясопептонным печеночным бульоном (МППБ) под вазелиновым маслом, среду Сабуро и в объеме 1 мл в два флакона с МПБ. Посевы на среде Сабуро выдерживали при 22 – 24, а остальные – 37°С.

Для исключения *контаминации микоплазмами* по ГФ XI (вып. 2, с. 15) отбирали пробы порошков или ЛФ на основе *Bac. subtilis*, которые разводили в 5 мл стерильного физиологического раствора, центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость каждого образца препарата вносили в объеме 0,5 мл в 3 пробирки со средой Эдварда (жидкой, полужидкой и твердой), обогащенной 20% сывороткой крови лошади, 10%

дрожжевого экстракта, 0,5% глюкозой с добавлением фенол-рота в конечной концентрации 0,001%. Посевы выдерживали при  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  с инкубированием 7 дней. Проводили три последовательных пассажа.

*Антагонистические свойства* определяли методом двукратных серийных разведений, в жидкой и плотной питательной средах, в отношении *S. dublin*.

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

## 2.5. Определение стабильности

Образцы экспериментальных серий лекарственных препаратов на основе *Bac. subtilis* методами «ускоренного старения», при повышенных температурах (37 и  $50^\circ\text{C}$ ) и естественного хранения. Образцы экспериментальных серий препарата 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. Оценку качества препаратов проводили по основным показателям: внешний вид и цвет; наличие механических примесей, плесени; концентрация водородных ионов (рН) 10% водной суспензии; массовая доля влаги; однородность; количество м.к. *B. subtilis*; количество жизнеспособных клеток *B. subtilis*; контаминация бактериальной и грибной микрофлорой; контаминация микоплазмами; антагонистические свойства в отношении *E. coli*; токсичность.

**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

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

В результате изучения эпизоотических ситуаций 12 животноводческих хозяйств районов республиканского подчинения, Хатлонской и Согдийской областей РТ, исследования 700 проб патологического материала (фекалии, кровь, паренхиматозные органы) от новорожденных телят, из 12 животноводческих хозяйств районов республиканского подчинения, Хатлонской и Согдийской областей РТ наибольшее количество больных инфекционными энтеритами телят (42,0%) выявлено в хозяйствах РРП, наименьшее (25,0%) – Хатлонской области (табл. 4).

В 97 (76,3%) пробах выделены моновозбудители, 30 (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*.

**Результаты бактериологического исследования  
патологического материала от новорожденных телят (2006 – 2011 гг.)**

			РРП	Область	
				Согдийская	Хатлонская
Кол-во	хозяйств	Всего	7	2	3
			12		
		Неблагополучных	7	2	2
			11		
	проб	Всего	420	126	154
			700		
Положительных		176 (42,0)	42 (33,0)	39 (25,0)	
		257 (40,3)			

**Примечание.** В скобках указано процентное значение.

**3.2. Эпизоотическая ситуация  
в хозяйствах северо-восточного региона Украины**

Результаты 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. multocida* – 1,8% случаев).

### **3.3. Факторы, способствующие возникновению инфекционных энтеритов телят**

Результаты эпизоотологических исследований показывают, что в исследуемых хозяйствах существуют условия для циркуляции, пассажирования и повышения вирулентности условно-патогенных микроорганизмов из-за отсутствия соответствующих родильных отделений и профилакториев для содержания новорожденных телят, нарушения параметров доения коров и ветеринарно-санитарных правил содержания и выращивания телят.

Проведенные статистические исследования за 2006-2011 гг. (табл. 5), в животноводческих хозяйствах Таджикистана, дают возможность судить об общем числе КРС, заболевших в течении последних лет. Большую часть больных составляет молодняк, причем болезни органов пищеварения и дыхания имеют ту же преобладающую долевую тенденцию, которая была отмечена при анализе причин падежа животных.

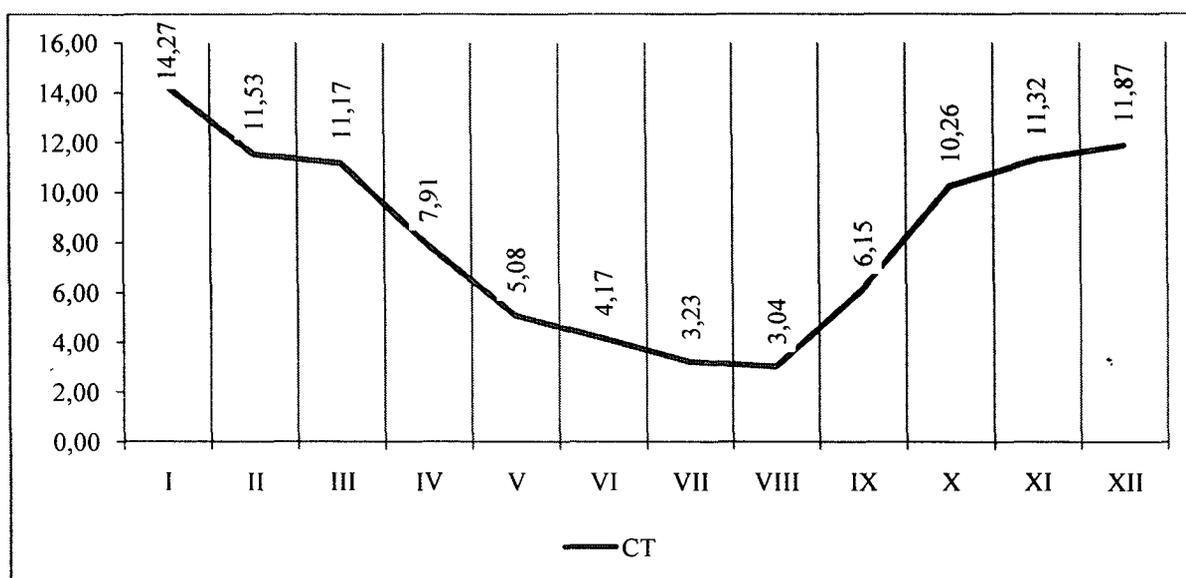
## Рождаемость, заболеваемость и падеж новорожденных телят

Ре- гионы	Годы	Кол-во коров и нетелей, гол.	Родилось телят, гол.	Заболеваемость, гол.				Смертность (Пало и вынужденно убито), гол.			
				ЖКЗ	Колибак- териоз	Сальмо- неллез	РЗ	ЖКЗ	Колибак- териоз	Сальмо- неллез	РЗ
СТ	2006	1120	850	311	115	52	36	42	32	10	8
	2007	965	760	268	106	24	113	32	13	8	12
	2008	882	443	111	84	18	94	15	9	2	8
	2009	754	384	93	43	22	85	12	7	3	6
	2010	721	411	115	46	14	76	15	6	3	7
	2011	707	434	118	38	11	44	13	5	2	9
ЦТ	2006	1250	963	385	130	22	163	36	9	4	11
	2007	1145	634	253	124	12	113	26	7	3	9
	2008	1341	1011	384	112	62	112	43	28	5	12
	2009	996	680	240	118	34	78	28	14	3	8
	2010	1020	754	268	94	43	123	34	23	8	9
	2011	938	700	253	123	17	112	27	11	4	8
ЮТ	2006	712	431	103	49	43	62	23	16	3	9
	2007	860	460	112	54	54	74	12	7	4	6
	2008	653	423	96	36	36	48	15	8	2	5
	2009	721	441	85	38	38	53	17	9	3	3
	2010	713	443	97	42	42	47	12	6	2	2
	2011	705	483	102	37	37	62	15	7	2	6

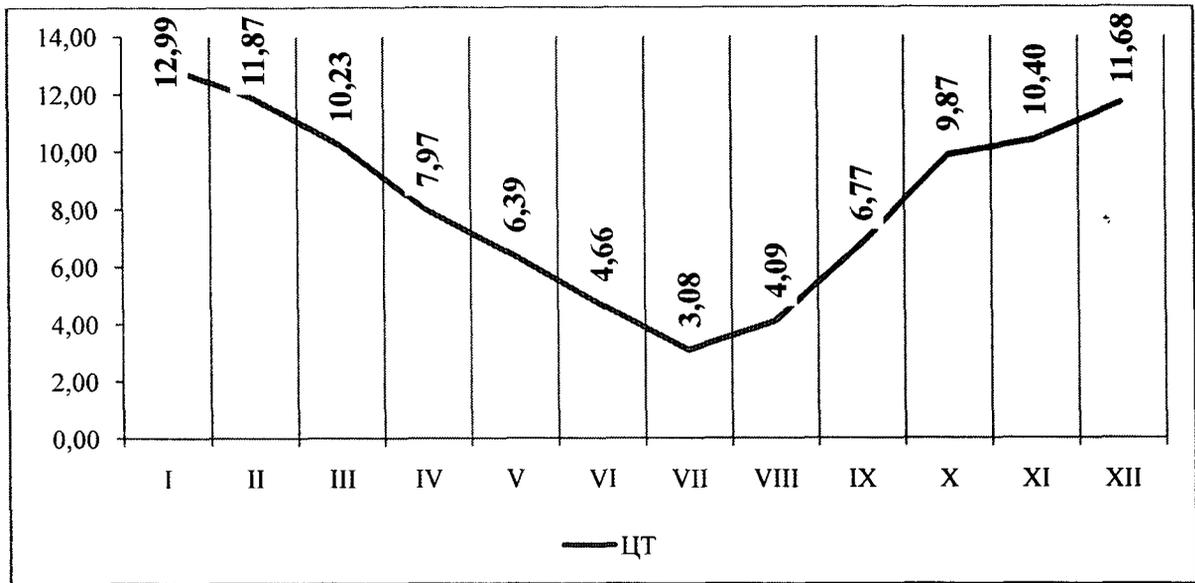
Примечание. СТ – Северный Таджикистан, ЦТ – Центральный Таджикистан, ЮТ – Южный Таджикистан.

По причине поражения органов пищеварения пало 54,1% голов, из них молодняка до 4-х месяцев – 87,8%, в том числе от инфекционного энтерита – 49,4 %. Доля других заболеваний, приведших к падежу животных, составляла 19,3%, — заболевания органов дыхания, 18,8% – болезни обмена веществ, отравлений – 0,6%, травм – 2,8%, болезней органов размножения – 4,4%. Также стоит акцентировать внимание на том, что достаточно высокий процент болезней, связанных с обменом веществ, особенно у маточного поголовья, может являться причиной высокой заболеваемости и падежа молодняка от желудочно-кишечных болезней

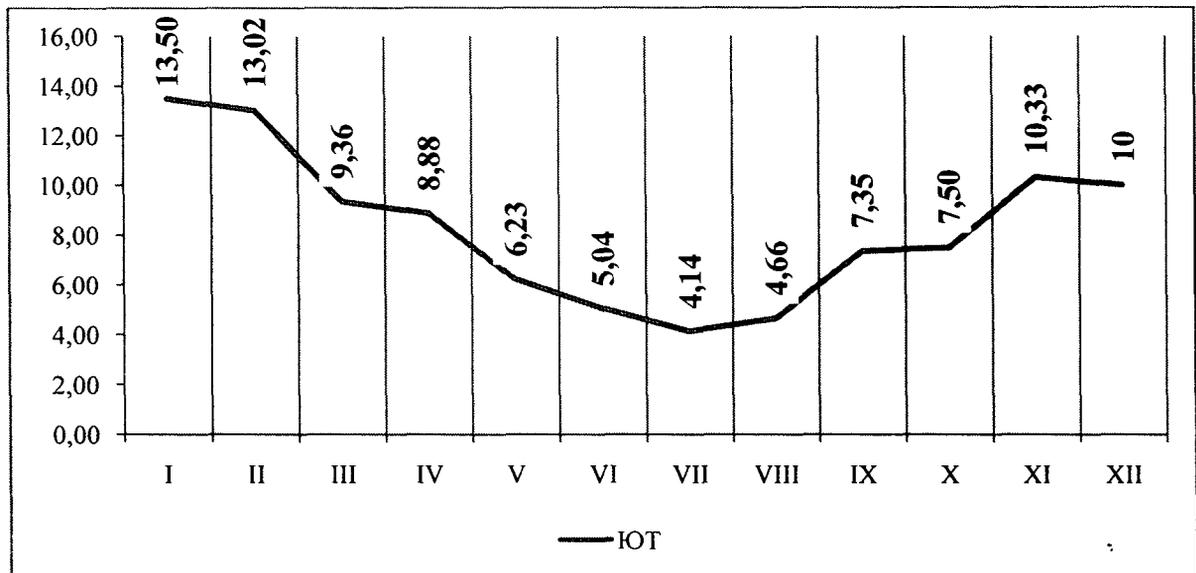
При определении рождаемости телят по месяцам, в животноводческих хозяйствах установлено, что наибольшая рождаемость телят приходится на ноябрь, декабрь, январь и февраль месяцы (рис. 1 - 4)



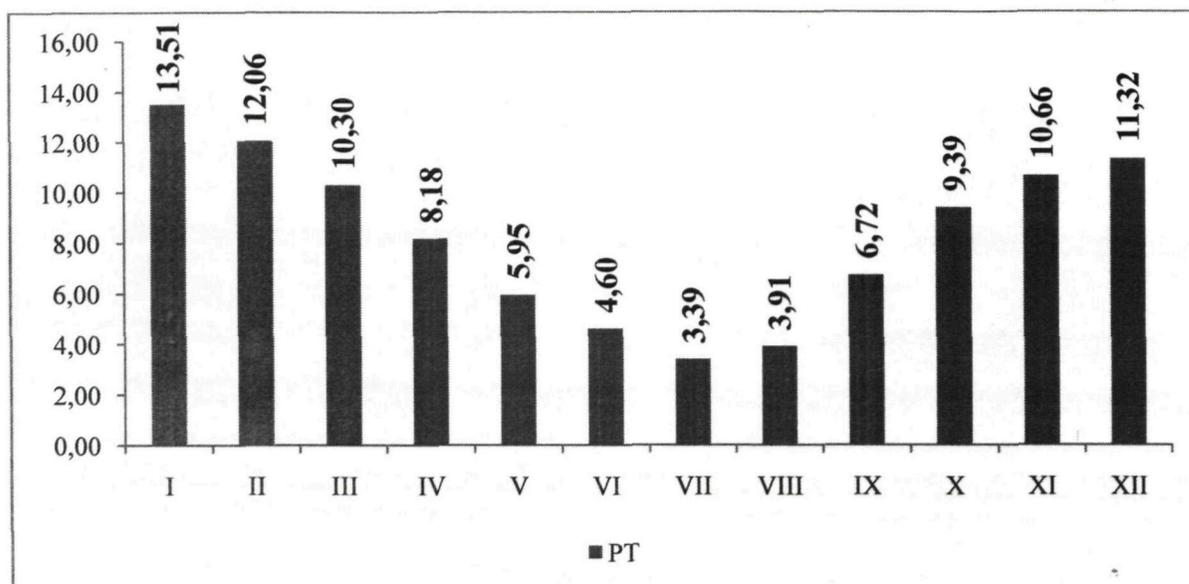
**Рис. 1. Распределение отелов в хозяйствах Северного Таджикистана.**



**Рис. 2. Распределение отелов в хозяйствах Центрального Таджикистана.**

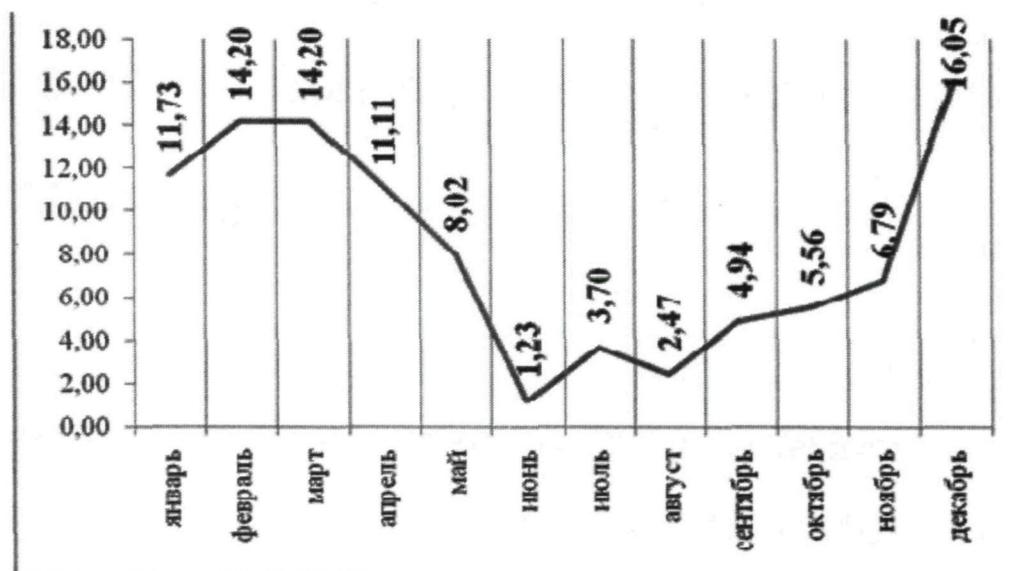


**Рис. 3. Распределение отелов в хозяйствах Южного Таджикистана.**



**Рис. 4. Распределение отелов в хозяйствах Таджикистана.**

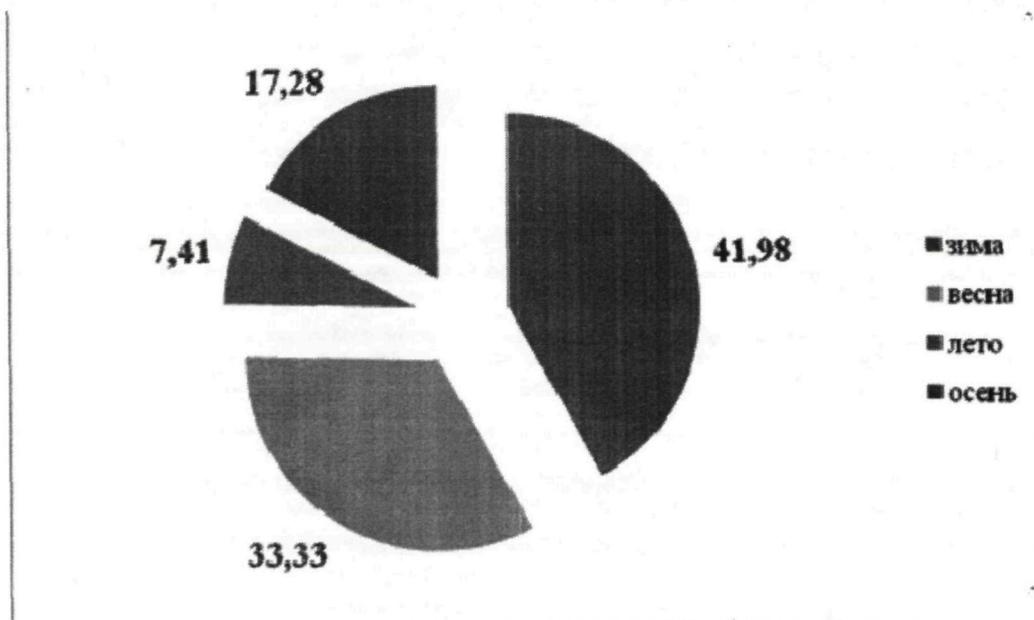
Высокий процент рождаемости телят в осенний и зимний периоды приводит к увеличению количества больных и падежу телят в эти месяцы (рис. 5.).



**Рис. 5. Динамика заболеваемости молодняка КРС инфекционным энтеритом на молочно-товарных фермах Таджикистана, %.**

При проведении круглогодичных отелов, телята заболевали на протяжении всего года с некоторыми колебаниями по месяцам. Наибольшее количество больного молодняка КРС регистрировали в декабре (пик –

16,05%), феврале и марте (по 14,20%), затем заболеваемость постепенно снижалась до 1,23% в июне, и снова повышалась до декабрьского уровня (рис. 6).



**Рис. 6. Сезонность заболеваемости молодняка КРС инфекционным энтеритом на молочно-товарных фермах Таджикистана, %.**

На зимне-весенний период приходилось 75,31% (зима – 41,98, весна – 33,33%), от общего количества заболевших за год телят (рис. 3). Летом заболеваемость составляла 7,41%, а осенью – 17,28%, от общегодового количества.

В целом, наибольший падеж животных, в помесечной структуре, приходился на декабрь, январь, февраль, март, затем, с мая по октябрь, отмечалось плавное снижение падежа животных, после чего вновь наблюдался подъем до максимума.

Из числа павших, от болезней органов пищеварения и органов дыхания животных, молодняк составляет также преобладающее количество.

Все хозяйства были благополучными по туберкулёзу, лейкозу, криптоспоридиозу, инфекционному ринотрахеиту, парагриппу и другим инфекционным заболеваниям, но в них регистрировали эндометриты (10,8 –

20,0%), маститы (5,6 – 21,2%) у коров, а также желудочно-кишечные (20 – 50 %) и респираторные (10 – 25%) болезни новорожденных телят (табл. 6).

Таблица 6

**Благополучие хозяйств по инфекционным заболеваниям**

		Заболевание	СТ	ЦТ	ЮТ	СВУ
Кол-во	коров	Туберкулез	–	–	–	–
		Лейкоз	–	–	–	–
		Криптоспоридиоз	–	–	–	–
		Инфекционный ринотрахеит	–	–	–	–
		Парагрипп	–	–	–	–
		Другие инфекционные заболевания	–	–	–	–
		Эндометрит	18,6 – 24,7	20,0 – 30,0	10,8 – 15,0	15,9 – 29,2
	Мастит	11,2 – 20,0	15,3 – 21,2	5,6 – 10,0	12,5 – 13	
	телят	Желудочно-кишечные	25 – 35	30 – 50	20 – 30	18,3 – 50,2
		Респираторные	12 – 17	17 – 25	10 – 15	6,7 – 11,5

*Примечание.* СТ – Северный Таджикистан, ЦТ – Центральный Таджикистан, ЮТ – Южный Таджикистан, СВУ – Северо-Восточный регион Украины.

Период заболеваемости репродуктивной системы у коров, в исследуемых регионах, существенно не изменяется и находится в пределах 8,5 – 11,7% с тенденцией снижения (на 27,1%) к 2010 г. Отмечается резкое сокращение падежа, обусловленного данной патологией. За анализируемый период он снизился на 45,28% или в 1,8 раза. В противоположность этому в 2011 г. в 9,1 раза возросло количество вынужденно убитых животных, по сравнению с 2010 г. Этот факт можно, объяснить тем, что возрастает количество патологий репродуктивной системы, трудно поддающихся лечению, вследствие хронизации процесса, или недостаточной эффективности используемых лекарственных препаратов.

Наши исследования показали, что заболеваемость коров послеродовым эндометритом достигает 36,36 – 90%. Количество коров, многократно осеменяемых и оплодотворяющихся только после третьего-восьмого осеменения, составляет 8,63 – 70,99%.

При бактериологическом исследовании слизи матки у коров больных эндометритом, чаще изолировали *E. coli* (24,1%), *Pr. vulgaris* (15,1%), *Ps. aeruginosa* (14,6%), *St. aureus* (13,6%), на долю остальных микроорганизмов приходилось 45,6%. При изучении микробного пейзажа вымени коров больных маститом установлено, что заболевание вызывали ассоциации микроорганизмов – *St. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, реже – *Pr. vulgaris*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. pyogenes*, *Str. uberus*, *Str. pneumoniae* (табл. 7).

Таблица 7

**Результаты бактериологического исследования  
маточно-влагалищных выделений коров, больных эндометритом**

Возбудитель	Таджикистан			Северо-Восточный регион Украины
	Северный	Центральный	Южный	
<b><i>E. coli</i></b>	8,4	12,1	4,3	24,1
<b><i>P. vulgaris</i></b>	1,8	3,9	0,6	15,1
<b><i>Pr. aeruginosa</i></b>	3,8	8,2	2,6	14,6
<b><i>Staph. aureus</i></b>	3,5	7,8	2,3	13,6
<b>Другие микроорганизмы</b>	8,8	23,3	8,6	32,6
	26,3	55,3	18,4	100

Данные таблицы свидетельствуют о преимущественном выделении эшерихий, псевдомона, протей и стрептококков, Реже высеваются культуры диплококков и стафилококков, *Bacillus subtilis* и других микроорганизмов.

Во всех случаях изолировали ассоциации микроорганизмов, состоящие из 2 – 8 монокультур. Сочетание эшерихий со стрептококками и протейями встречалось наиболее часто – 40 и 50% случаев соответственно. Ас-

социации стрептококками и стафилококками в 50% проб.

Патогенность была выражена в ассоциациях стафилококки, диплококки, эшерихии, протей. Монокультуры йерсений, *Bacillus subtilis* были непатогенны для белых мышей.

При бактериологическом анализе 316 проб молока коров, больных клиническими формами мастита (серозный, серозно-катаральный), выделяли условно патогенную микрофлору, представленную различными ассоциациями, в которых преобладали стрептококки (30%), стафилококки (28,2%), псевдомона (16, 2), эшерихий (9,1)

Таблица 8

**Результаты бактериологического исследования  
проб молока от коров, больных маститом**

Возбудитель	Таджикистан			Северо-Восточный регион Украины
	Северный	Центральный	Южный	
<b>Staph. aureus</b>	24 (7,6)	43 (13,6)	22 (7,0)	28
<b>E. coli</b>	9 (2,8)	12 (3,8)	8 (2,5)	15
<b>Ps. aeruginosa</b>	13 (4,1)	34 (10,8)	4 (1,3)	10
<b>Pr. vulgaris</b>	12 (3,8)	23 (7,3)	-	-
<b>Str. agalactiae</b>	27 (8,5)	55 (17,4)	13 (4,1)	47
<b>Str. dysgalactiae</b>	-	-	-	-
<b>Str. pyogenes</b>	2 (0,7)	8 (2,5)	1 (0,3)	-
<b>Str. uberis</b>	-	6 (1,9)	-	-
<b>Str. pneumoniae</b>	-	-	-	-
<b>Итого</b>	87 (27,5)	181 (57,3)	48 (15,2)	100

В ассоциации преимущественно изолировали следующие ассоциации:

- эшерихий, стрептококки, стафилококки, диплококки;
- стрептококки, стафилококки, диплококки;
- стафилококки, диплококки, эшерихии, клостридии, йерсени;
- стрептококки, стафилококки, диплококки, лактобациллы, *Bacillus subtilis*.

Выделенная микрофлора была высоко чувствительна к мастисану-А,

тетрациклину и пенициллину. Ассоциация культур стрептококки, стафилококки проявляла чувствительность к большинству антибактериальных препаратов. К тетрациклину, неомицину, гентамицину была проявлена чувствительность только в двух случаях. Установлена слабая чувствительность выделенных культур к эритромицину.

При изучении этиологии данных заболеваний, мы пришли к выводу, о том, что условно патогенная микрофлора играет определенную роль в развитии патологии репродуктивной системы у коров и постнатальных болезней у телят.

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.pneumoniae* – 4,6, *Str. pyogenes* – 3,4, *Str. epidermidis* – 2,6, *St. pyogenes* – 2,2, *P. multocida* – 1,8% случаев) (табл. 9).

Таблица 9

**Результаты бактериологического исследования  
больных и павших телят**

Возбудитель	Таджикистан			Северо-Восточный регион Украины
	Северный	Центральный	Южный	
<b><i>E.coli</i></b>	25 (16,2)	105 (68,2)	24 (15,6)	23,1
<b><i>Ps. aeruginosa</i></b>				17,6
<b><i>S. enteritidis</i></b>	4 (10,0)	7 (17,5)	2 (5,0)	13,7
<b><i>S. dublin</i></b>	7 (17,5)	9 (22,5)	5 (12,5)	10,5
<b><i>S. typhimurium</i></b>	2 (5,0)	3 (7,5)	1 (2,5)	8,8
<b><i>Pr. vulgaris</i></b>	4 (15,4)	18 (69,2)	4 (15,4)	6,1
<b><i>Str. aureus</i></b>				5,6
<b><i>Str. pneumonia</i></b>				4,6
<b><i>Str. pyogenes</i></b>				3,4
<b><i>Str. epidermidis</i></b>				2,6
<b><i>Staph. pyogenes</i></b>				2,2
<b><i>P. multocida</i></b>				1,8

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%) (табл.10), не типировались – 24,9% и сальмонелл – *S. enteritidis* (55,7%); *S. dublin* (23,5%), *S. typhimurium* (20,8%) (табл.11).

Таблица 10

Результаты серотипизации *E. coli*

Серовар	Таджикистан			Северо-Восточный регион Украины
	Северный	Центральный	Южный	
O101	3,8	5,4	3,6	11,4
O8	3,5	4,8	2,7	16,9
O26	4,0	5,0	3,0	11,1
O115	1,1	3,3	0,5	10,1
O86	7,2	9,5	3,3	9,8
O137	2,4	3,0	2,8	8,5
O117	4,1	8,0	2,1	7,3
O118	2,0	4,3	1,3	24,9
O119	0,8	2,9	1,1	
O82	1,4	3,0	1,1	
Итого	30,3	49,2	21,5	100

Таблица 11

## Результаты серотипизации сальмонелл

Серовар	Таджикистан			Северо-Восточный регион Украины
	Северный	Центральный	Южный	
<i>S. enteritidis</i>	4 (10,0)	7 (17,5)	2 (5,0)	55,7
<i>S. dublin</i>	7 (17,5)	9 (22,5)	5 (12,5)	23,5
<i>S. typhimurium</i>	2 (5,0)	3 (7,5)	1 (2,5)	20,8
Итого	13 (32,5)	19 (47,5)	8 (20,0)	100

Таким образом, инфекционные энтериты телят вызываются бактериальной флорой, которая циркулирует в хозяйствах и выделяется от коров больных эндометритами, маститами, и клинически здоровых коров бактерионосителей. Чаще всего, этиологическим фактором этих заболеваний являются эшерихии, сальмонеллы, протейи 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*

#### 4.1.1. Морфологические, культуральные и биохимические свойства

В результате изучения морфологических и культуральных свойств штаммов *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 ГАУ, установлено (табл. 12), что культуры представляют собой грамположительные спорообразующие палочки с закругленными концами. Размер клеток – 3 – 6 × 0,9 – 1 мкм; в мазках 18-часовой культуры клетки расположены одиночно, попарно, реже – в цепочку. Споры овальной формы в клетке расположены центрально, размер спор – 0,6 – 1,2 мкм.

На твердых питательных средах при температуре (37±0,5)°С через 24 ч наблюдали рост бацилл в виде кремово-белых складчатых сухих колоний с кратерообразным центром, вязкой консистенции, края колоний изрезанные.

Испытанные культуры восстанавливали нитраты до нитритов, образовывали каталазу, кислоты из D-глюкозы, L-арабинозы, D-ксилозы и D-маннита, окисляли глюкозу с образованием ацетоина (ацетилметилкарбинола), расплавляли крахмал, желатин и казеин (табл. 13).

Изученные штаммы бацилл, на основании морфологических, культуральных и биохимических свойств отнесены к виду *Bac. subtilis*.

Морфологические и культуральные свойства штаммов *Bac. subtilis*

Штамм	Окраска по Граму	Размер, мкм		Рост на	
		Клеток	спор	МПА	МПБ
BS TJ 06	+	3 – 4 × 0,9 – 1	0,6 – 0,9	кремово-белые складчатые сухие колонии с крате- рообразным цен- тром, вязкой кон- систенции, края колоний изрезан- ные	культура образу- ет равномерную муть, через 36 ч на поверхности среды появляется морщинистая пленка
BS TJ 07	+	3 – 4 × 0,9 – 1	0,6 – 0,9		
BS TJ 08	+	3 – 5 × 0,9 – 1	0,6 – 0,9		
BS TJ 09	+	4 – 5 × 0,9 – 1	0,6 – 1		
BS TJ 10	+	3 – 4 × 0,9 – 1	0,6 – 0,9		
BS TJ 11	+	4 – 5 × 0,9 – 1	0,6 – 0,9		
BS TJ 12	+	4 – 5 × 0,9 – 1	0,6 – 1		
BS TJ Д 24	+	4 – 5 × 0,9 – 1	0,6 – 1		
BS TJ Д 26	+	4 – 6 × 0,9 – 1	1 – 1,2		

Ферментативные свойства штаммов *Bac. subtilis*

Свойство		Штамм									
		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	
Восстановление нитратов до нитритов		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Образование	Каталазы		-	-	-	-	-			-	-
	кислоты из	D-глюкозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		L-арабинозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		D-ксилозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		D-маннита	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Окисление глюкозы с образованием ацетона		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Расплавление	Крахмала		+	+	+	+	+	+	+	+	
	Желатина		+	+	+	+	+	+	+	+	
	Казеина		+	+	+	+	+	+	+	+	

Примечание. «+» – наличие ферментативного свойства, «-» – отсутствие такового.

#### 4.1.2. Патогенность и антагонистические свойства

При пероральном введении кроликам, телятам и парентеральном (внутрибрюшинная инъекция) введении белым мышам смывов суточной агаровой культуры штаммов *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) в концентрациях соответственно 9 млрд и 100 млн м.к./кг массы тела в объемах 0,6 (кролики), 10,5 (телята) и 0,3 мл (белые мыши), признаки заболевания и другие физиологические отклонения, у опытных животных, не отмечали, что свидетельствует об отсутствии патогенности у испытанных штаммов.

Результаты изучения антагонистической активности показали (табл. 14), что МБсК штаммов BS TJ 08, BS TJ 09, BS TJ 10, BS TJ Д 24, BS TJ Д 26 в отношении тест-культур *E. coli*, *S. dublin*, *Pr. vulgaris* составляет 3,9 – 31,2 млн м.к./мл, соответствующая концентрация штаммов BS TJ 11, BS TJ 12 – 15,6 – 124,8 млн м.к./мл. Штаммы BS TJ 06, BS TJ 07 подавляют рост тест-культур в высоких концентрациях (500 млн м.к./мл) (рис. 7).

Таблица 14

#### Противомикробная активность штаммов *Bac. subtilis*, млн м.к./мл

Штамм	Тест-культура	МБсК	МБцК
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<b>BS TJ 06</b>	<i>E. coli</i>	500	–
	<i>S. Dublin</i>	500	–
	<i>Pr. vulgaris</i>	500	–
<b>BS TJ 07</b>	<i>E. coli</i>	500	–
	<i>S. Dublin</i>	500	–
	<i>Pr. vulgaris</i>	500	–
<b>BS TJ 08</b>	<i>E. coli</i>	15,6	31,2
	<i>S. Dublin</i>	7,8	15,6
	<i>Pr. vulgaris</i>	15,6	31,2
<b>BS TJ 09</b>	<i>E. coli</i>	7,8	15,6
	<i>S. Dublin</i>	7,8	15,6
	<i>Pr. vulgaris</i>	15,6	31,2

1	2	3	4
BSTJ 10	E. coli	7,8	15,6
	S. Dublin	7,8	7,8
	Pr. vulgaris	15,6	31,2
BSTJ 11	E. coli	31,2	62,4
	S. Dublin	15,6	31,2
	Pr. vulgaris	31,2	62,4
BS TJ 12	E. coli	62,4	124,8
	S. Dublin	31,2	62,4
	Pr. vulgaris	62,4	124,8
BSTJ Д 24	E. coli	3,9	7,8
	S. Dublin	3,9	7,8
	Pr. vulgaris	15,6	31,2
BSTJ Д 26	E. coli	7,8	15,6
	S. Dublin	7,8	15,6
	Pr. vulgaris	7,8	15,6

Примечание: «-» – отсутствие антибактериальной активности.

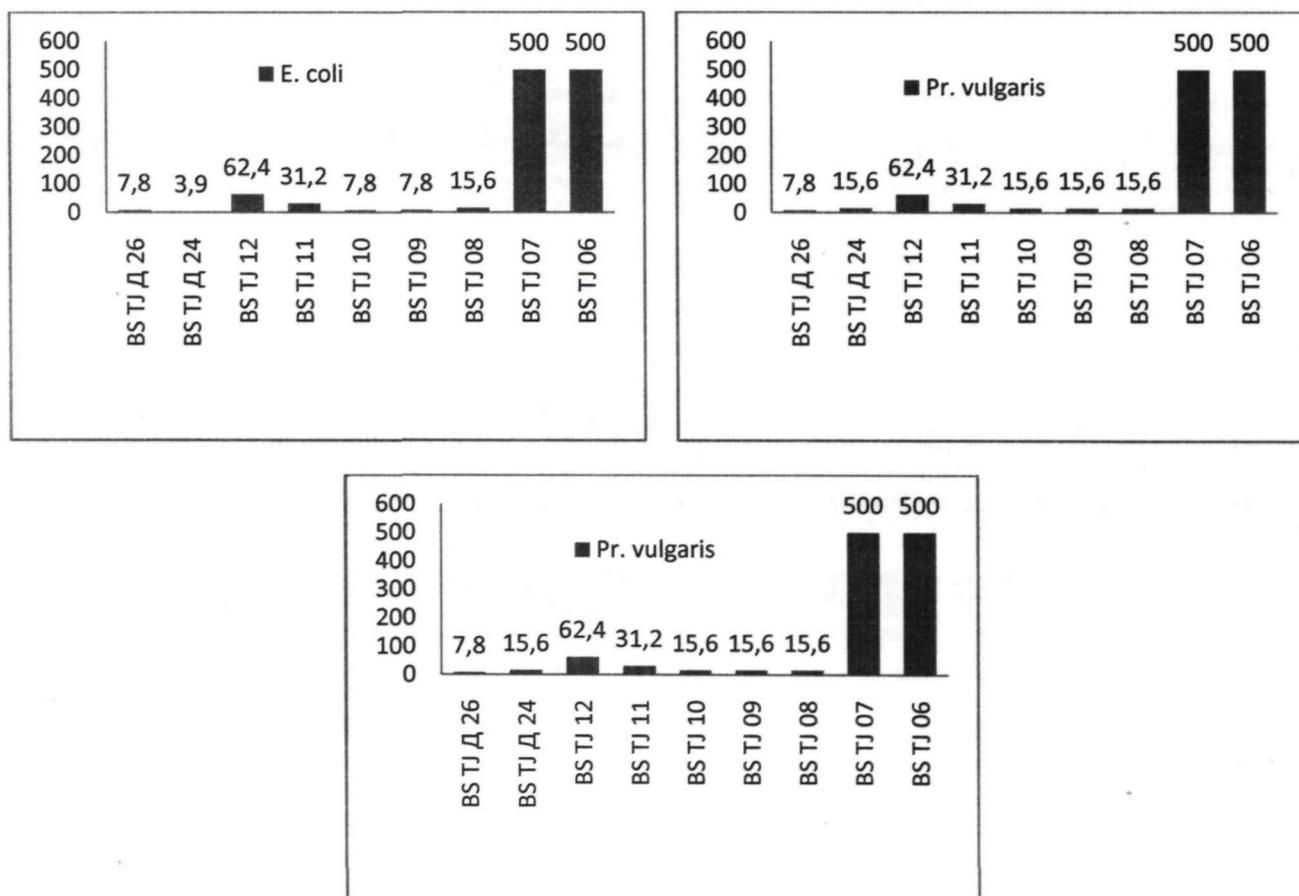
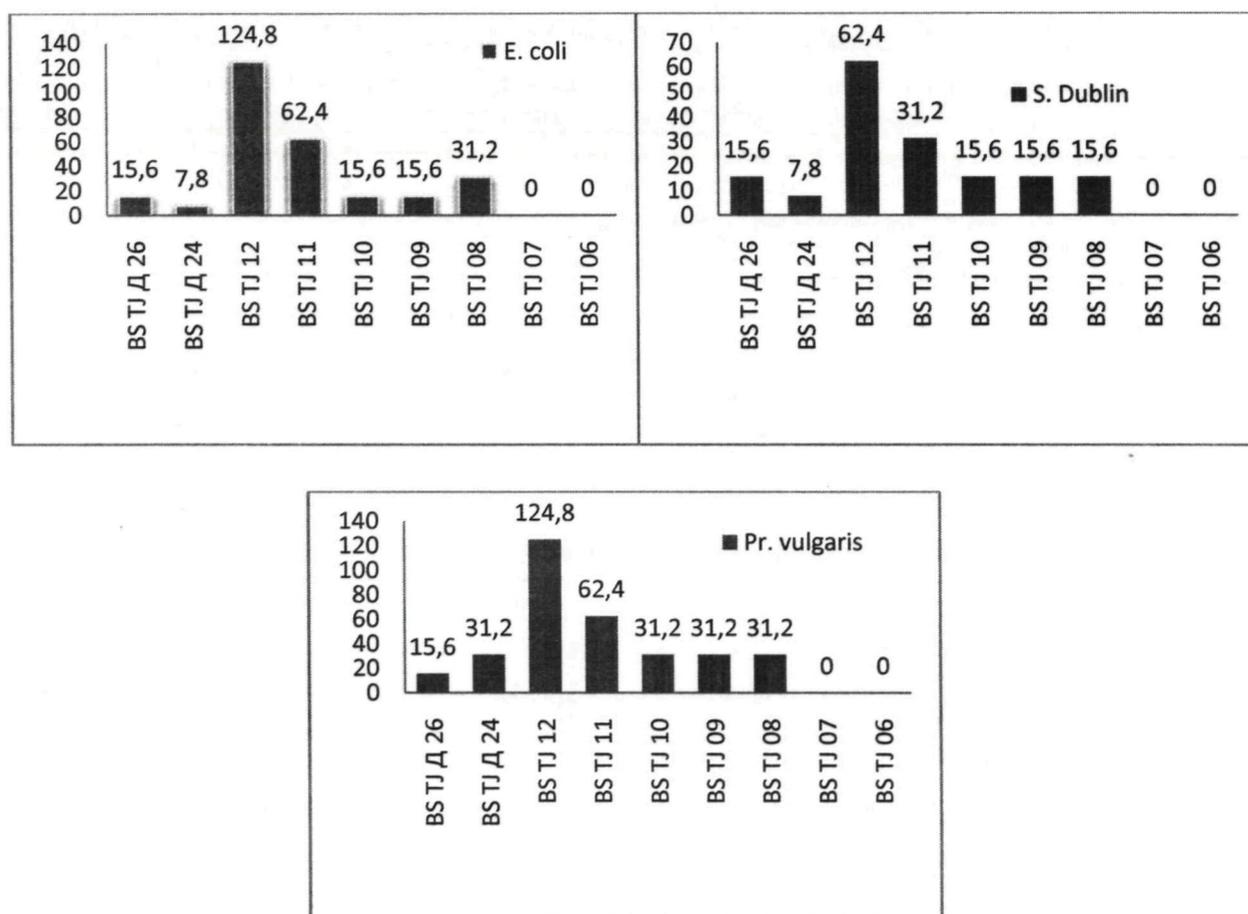


Рис. 7. МПК изученных штаммов *Bac. subtilis*, млн м.к./мл.

Исходя из полученных результатов, для производства пробиотиков отобраны наиболее перспективные штаммы *Bac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, проявляющие антимикробные свойства в отношении культур микроорганизмов в низких концентрациях (3,9 – 31,2 млн м.к./мл) (рис. 8).



**Рис. 8.** МБцК изученных штаммов *Bac. subtilis*, 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 (табл. 15).

**Основные физиолого-биологические признаки штаммов *Bac. subtilis*,  
отобранных для производства пробиотиков**

Свойство		Штамм		
		BS TJ 09	BS TJ Д 24	BS TJ Д 26
Рост в	анаэробных условиях	–	–	–
	присутствии 7%-ной NaCl	+	+	+
Утилизация	Пропионата	+	+	+
Гидролиз	Крахмала	+	+	+
	Мочевины	–	–	–
Активность	Лецитиназная	–	–	–
	Гиалуронидазная	–	–	–
	Лизоцимная	+	+	+
	Гемолитическая	–	–	–
Антагонистические взаимоотношения при совместном культивировании		–	–	–

*Примечание.* «+» – наличие свойства, «–» – отсутствие такового.

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*

Технологии производства пробиотиков, при поверхностном культивировании микроорганизмов, сопряжены со значительными материальными затратами и являются высокотрудоемкими, из-за большого числа операций с применением ручного труда. Существенно повысить производственные возможности предприятий микробиологической промышленности, по выпуску готовой продукции и их рентабельность - глубинное выращивание микроорганизмов. Однако, большинство применяемых для глубинного культивирования *Bac. subtilis* питательных сред из растительных и химических веществ неэффективны, из-за невозможности получить достаточное количество микробных клеток бактериальной массы.

Для выращивания *Bac. subtilis* рекомендуют картофельные среды, но получаемая концентрация бацилл в бактериальной суспензии не превышает 1-3 млрд/мл и не достаточна для изготовления пробиотиков.

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

1) элективной питательной среде, 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%.

В колбах Эрленмейера (объемом 1,5 л), наполненных не более 1 л, среды стерилизовали при 0,8 атм. в течение 15 – 20 мин, гидроокисью калия рН доводили до 7,0 – 7,2. На каждую питательную среду подсеивали штаммы BS TJ 09, BS TJ 24, BS TJ 26(10 млн.к./см<sup>3</sup>) из расчета 1 см<sup>3</sup> на 1 л, которые культивировали в условиях интенсивной аэрации, при температуре (37±0,5)°С, в течение 24 ч. Затем бактериальную суспензию проверяли на стерильность и методом серийных разведений определяли в ней количество микробных клеток *Bac. subtilis*. Из последнего разведения культуру подсеивали в картофельный агар на чашках Петри и подсчитывали количество выросших колоний.

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 суспензий, с высоким содержанием спорных форм бактерий.

С этой целью, для модификации и обогащения картофельной питательной среды, нами были использованы растительные (соевых растений), химические (натриевые, калиевые и магниевые солей) и минеральные вещества (макро и микроэлементов), которые в количественном соотношении в VI вариантах приведены в таблице 16.

Результаты определения оптимальной питательной среды для культивирования *Vac. subtilis*

вариант	пропись	Питательная среда														Результат после инкубации	Кол-во м.к., млрд	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			15
I	1	Гороховая мука	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Картофельный крахмал	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	обильный рост, помутнение с осадком	10
		Соевая мука	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
II	1	Очищенный бентонит	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Пектин	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Хлорид натрия	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
III	2	Азотнокислый натрий	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Глюкоза	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Нитрат аммония	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
III	3	Сернокислое железо	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Сернокислый магний	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Фосфорнокислый калий	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
III	4	Пептон	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Пептон	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Пептон	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
III	5	Пептон	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Пептон	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Пептон	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
III	6	Пептон	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Пептон	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3
		Пептон	0,25					0,01	1	1			0,1	0,1	0,1	0,25	слабый рост, помутнение без осадка	1-3

Окончание табл. 16

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	7		0,25				0,01		0,125	0,25 (п.о.)					слабый рост, помутнение без осадка	1-3
	8		0,25				0,01		0,125	0,5 (п.о.)					слабый рост, помутнение без осадка	1-3
IV	1	0,25	0,25				0,01		0,125						равномерный рост, помутнением и слабый осадок	1-3
	2	0,25	0,25		7	3	0,01		0,125						равномерный рост, помутнение и слабый осадок	1-3
IV	3	0,25	0,25		7	3	0,01		0,125					0,25	обильный рост, помутнение с осадком	10
V	1		0,25	0,25			0,01		0,125						равномерный рост, помутнение и слабый осадок	1-3
	2		0,25	0,25	7	3	0,01		0,125						равномерный рост, помутнение и слабый осадок	1-3
	3		0,25	0,25	7	3	0,01		0,125					0,25	обильный рост, помутнение с осадком	5
VI		0,25		7	3	0,01		0,125						0,25	обильный рост, помутнение с осадком	20

Примечание: п.о. – после остывания среды.

Определено, что эффективной питательной средой для выращивания *Bac. subtilis* (вариант VI) является состоящая из пептона, картофельного крахмала, глюкозы, хлорида натрия, бентонита и пектина (табл. 17).

Таблица 17

**Состав модифицированной картофельной питательной среды  
для культивирования *Bac. subtilis***

<b>Компонент</b>	<b>Кол-во, %</b>
<b>Пептон</b>	0,25
<b>Картофельный крахмал</b>	0,25
<b>Глюкоза</b>	0,125
<b>Хлорид натрия</b>	0,01
<b>Бентонит и пектин (3-1)</b>	10
<b>Дистиллированная вода</b>	до 100

Таким образом, морфологические, культуральные, ферментативные свойства, противомикробная активность отобранных для производства пробиотиков штаммов *Bac. 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 СУСПЕНЗИИ

##### МОДИФИЦИРОВАННЫМ КОНТАКТНО-СОРБЦИОННЫМ МЕТОДОМ

Для длительного сохранения физико-химических и лечебно-профилактических свойств пробиотики выпускают, в основном, в лиофилизированном виде в герметичных ампулах и флаконах, что обуславливает технологические и иные ограничения, приводящие к нерациональному использованию ампул (флаконов), относительно высокий процент их выбраковки, при производстве и контроле качества, специфические условия применения, отличающиеся рядом особенностей, регидратацию препарата, высокие затраты на фасовку, транспортную тару и др.

Поэтому, серийный выпуск пробиотиков в сухих лекарственных формах, позволяющих точно дозировать препарат, упакованных в емкости, вмещающие большое количество доз, исключает большинство недостат-

ков, свойственных производству пробиотиков, упакованных в ампулы или флаконы.

Нами модифицирован контактно-сорбционный метод обезвоживания биомассы, содержащей бактериальную суспензию штаммов *Vac. subtilis* (BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26) и бентонито-пектиновую смесь (бентонит месторождения «Каратаг» – Республика Таджикистан, Шахринавский р-н). Минеральный и растительный адсорбенты стимулировали рост микроорганизмов, которые продолжали культивировать 24 ч, при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . Затем производственную серию биомассы сушили при  $(50 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , в течение 48 ч.

#### 4.4. СУБТИЛБЕН В ФОРМЕ ПОРОШКА

##### 4.4.1. Состав и технология производства

Для приготовления пробиотика Субтилбен были использованы штаммы *Vac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 (таблице 18).

Таблица 18

**Композиция действующих веществ в форме порошков  
на основе штаммов *Vac. subtilis***

		Компонент	Кол-во, %	Концентрация м.к., млрд/г	
Порошок на основе штамма	BS TJ 09	Бакмасса	3	30	
		бентонито-пектиновая смесь	минеральные вещества (комплекс макро-и микро-элементов)	60	
			растительные вещества	37	
	BSTJ Д 24	Бакмасса	3	30	
		бентонито-пектиновая смесь	минеральные вещества (комплекс макро-и микро-элементов)	60	
			растительные вещества	37	
	BSTJ Д 26	Бакмасса	3	30	
		бентонито-пектиновая смесь	минеральные вещества (комплекс макро-и микро-элементов)	60	
			растительные вещества	37	

Основные технологические стадии производства пробиотика Субтилбен на основе штаммов *Bac. subtilis* в форме порошка представлены на рис. 9.

### **1. Получение первичных культур производственных штаммов**

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 суспензии 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 (рН 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**

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

### **5. Приготовление гомогената бентонито-пектиновой смеси и бактериальной суспензии производственного штамма *Bac. subtilis***

Бентонито-пектиновую смесь добавляют в бактериальную суспензию производственного штамма *Bac. subtilis* (BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26) и перемешивают.



Рис. 9. Технологические стадии производства Субтилбенз формепорошка на основе штаммов *Bac. subtilis*.

**6. II стадия культивирования бактериальной суспензии**

В течение 24ч, при температуре  $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$  смесь бактериальной суспензии с минеральными и растительными адсорбентами.

**7. Сушка производственной серии биомассы**

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

**8. Измельчение высушенной производственной серии биомассы**

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

**9. Выдержка на складе временного хранения 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**

Методом двукратных серийных разведений в жидкой (МПБ) и плотной (МПА) средах, на музейных штаммах (*E. coli*, *St. aureus*) и изолятах *E. coli*, *S. dublin*, *Pr. vulgaris*, *P. multocida*, выделенных от больных инфекционными энтеритами телят в животноводческих хозяйствах РТ, изучили антагонистические свойства действующих веществ пробиотиков на основе *Vac. subtilis* в форме порошка. При МБСК в мазках тест-культур, окрашенных по Граму, наблюдали задержку роста, МБЦК через 24 – 72 ч инкубации – только грамположительные палочки *Vac. subtilis*.

Антагонистические свойства пробиотиков на основе *Bac. Subtilis*, в форме порошка

1	2	3	4	E. coli		S. dublin (изоляты)	Pr. vulgaris (изоляты)	P. multocida (изоляты)	St. aureus (6538p)	
				АТСС- 25922	изоляты					
				5	6	7	8	9	10	
Порошок на основе штамма	06	МБсК	мг/мл							
			млрд. м.к./мл		0,5	0,5	0,5	0,5		
		МБцК	мг/мл							
			млрд. м.к./мл		–	–	–	–	–	
	07	МБсК	мг/мл							
			млрд. м.к./мл		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
		МБцК	мг/мл							
			млрд. м.к./мл		–	–	–	–	–	
	08	МБсК	мг/мл							
			млрд. м.к./мл		0,0156	0,0078	0,0156	0,0156	0,0156	
		МБцК	мг/мл							
			млрд. м.к./мл		0,0312	0,0156	0,0312	0,0312	0,0312	
	09	МБсК	мг/мл							
			млрд. м.к./мл		0,0078	0,0078	0,0156	0,0078	0,0078	
		МБцК	мг/мл							
			млрд. м.к./мл		0,0156	0,0156	0,0312	0,0156	0,0156	
BSTJ 09	МБсК	мг/мл		0,3	0,3	0,6	0,6	0,3	0,6	
		млрд. м.к./мл		0,009	0,009	0,018	0,018	0,009	0,018	
	МБцК	мг/мл		0,6	0,6	1,2	1,2	0,6	1,2	
		млрд. м.к./мл		0,018	0,018	0,036	0,036	0,018	0,036	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Порошок на основе шгамма	10	МБсК	млрд. м.к./мл		0,0078	0,0078	0,0156	0,0156		
		МБцК	мг/мл							
	млрд. м.к./мл			0,0156	0,0156	0,0312	0,0312			
	11	МБсК	мг/мл							
			млрд. м.к./мл		0,0312	0,0156	0,0312	0,0312		
	МБцК	мг/мл								
		млрд. м.к./мл		0,0624	0,0312	0,0624	0,0624	0,0624		
	12	МБсК	мг/мл							
			млрд. м.к./мл		0,0624	0,0312	0,0624	0,0624		
	МБцК	мг/мл								
		млрд. м.к./мл		0,1248	0,0624	0,1248	0,1248			
	24	МБсК	мг/мл							
			млрд. м.к./мл		0,0039	0,0039	0,0156	0,0078		
	МБцК	мг/мл								
		млрд. м.к./мл		0,0078	0,0078	0,0312	0,0156			
	BSTJ Д 24	МБсК	мг/мл		0,6	0,6	0,6	0,6	0,3	1,2
			млрд. м.к./мл		0,018	0,018	0,018	0,018	0,009	0,036
		МБцК	мг/мл		1,2	1,2	1,2	1,2	0,6	2,4
			млрд. м.к./мл		0,036	0,036	0,036	0,036	0,018	0,072
	26	МБсК	мг/мл							
			млрд. м.к./мл		0,0078	0,0078	0,0078	0,0078		
	МБцК	мг/мл								
		млрд. м.к./мл		0,0156	0,0156	0,0156	0,0312			
	BSTJ Д 26	МБсК	мг/мл		0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6
млрд. м.к./мл				0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,018	
МБцК		мг/мл		0,6	0,6	0,6	0,6	1,2	1,2	
		млрд. м.к./мл		0,018	0,018	0,018	0,018	0,036	0,036	

Установлена высокая бактериостатическая и бактерицидная активность порошков на основе штаммов *Bac. subtilis* в отношении исследованных тест-микробов. МБсК порошка, на основе штамма BS TJ 09 для *E. coli* и *P. Multocida*, составляла: 0,3, *S. dublin*, *Pr. vulgaris* и *St. aureus* – 0,6 мг/мл; BS TJ Д 24 для *P. multocida* – 0,3, *E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris* – 0,6, *St. aureus* – 1,2 мг/мл; BS TJ Д 26 для *E. coli*, *S. dublin*, *Pr. vulgaris* и *P. multocida* – 0,3, *St. aureus* – 0,6 мг/мл (табл. 19). Гибель (МБцК) тест-культур изученные порошки вызывали в концентрациях, превышающих бактериостатические в два раза.

В отношении односуточной бульонной культуры *S. dublini E. coli* (концентрация – 1 млрд м.к./мл), методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде, изучили динамику антагонистической активности порошков на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, которую оценивали через 1, 3, 6, 12, 18, 24, 36 и 48 ч.

Изменение морфологии *S. dublini E. coli* начинается спустя 6 ч после контакта с порошками на основе штаммов *B. subtilis*: клетки тест-культуры увеличивались в размере и принимали различную форму. Количество клеток *E. coli* через 12 – 18 ч начинало уменьшаться, лизис тест-культур заканчивался через 48 ч после контакта с порошками.

В контрольных пробирках (бентонито-пектиновая смесь) изменение морфологии тест-культуры не наблюдали, что свидетельствует о связи бактерицидной активности изученных порошков с выделением *B. subtilis* биологически активных веществ (БАВ).

О равной активности, в отношении различных серотипов *E. coli* свидетельствуют бактерицидные свойства (в концентрациях 0,3–1,2 мг/мл) порошков на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, в отношении наиболее часто выделявшихся от больных колибактериозом телят серотипов *E. coli* O8, O101, а также O9, O15, O55, O78, O115, O117.

Таким образом, выделение *Bac. subtilis* БАВ обуславливает высокую антагонистическую активность порошков, на основе штаммов *Bac.*

Subtilisin отношении музейных штаммов и изолятов *E. coli*, *S. dublin*, *Pr. vulgaris*, *P. multocida* и *St. aureus*.

#### 4.4.3. Токсикологические свойства

Проверку безвредности продуктов микробиологического синтеза Субтилбен в форме порошка и ЛФ на их основе (Субтилбен в форме гранул и таблеток, Лаксубтил суспензия), осуществляли методом с использованием сухой культуры инфузории *Colpoda steinii*, на которую согласно требованиям ГОСТа Р 52337-2005, воздействовали исследовавшимися субстанциями на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 и лекарственных форм из них, оценивая результаты биотеста по гибели стилохоний.

Установлено (табл. 20), что через 3 ч воздействия, исследовавшимися субстанциями и их смесью (1:1:1), активность стилохоний опытного ряда составила 89 – 98%, а в контроле – 90%.

В соответствии с требованиями ГОСТа Р 52337-2005, изученные порошки на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, а также их смесь (1:1:1) относятся к нетоксичным препаратам микробиологического синтеза, под действием которых за установленное время остаются активными свыше 80% стилохоний.

Безвредность порошков на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, 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 0,5 г/кг массы тела вводили с водой перорально в объемах соответственно 0,5; 10 и 30 мл, 2 раза в сут, в течении 7 дней.

В течении 14 сут наблюдения не было ни одного случая падежа животных, что свидетельствует о безвредности изученных порошков на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26.

Реакция стилохоний на порошки на основе штаммов *Bac. subtilis*

		№ лунки	Ряд лунок				
			Опытный				Контроль
			BS T J 09	BS T J Д 24	BS T J Д 26	BS T J Д 24 + BS T J Д 26	
<b>Кол-во активных стилохоний</b>	<b>в начале опыта</b>	1	10	8	9	8	10
		2	8	7	8	7	8
		3	11	9	9	9	12
		4	9	10	7	9	9
		5	8	9	8	10	11
		N <sub>1</sub>	46	43	43	43	50
	<b>через 3 ч</b>	1	9	7	9	7	9
		2	9	8	7	7	7
		3	10	9	8	9	10
		4	7	6	9	8	9
		5	6	10	9	9	10
		N <sub>2</sub>	41	40	42	40	45
<b>N (%) = N<sub>2</sub> : N<sub>1</sub> × 100</b>			<b>89</b>	<b>93</b>	<b>98</b>	<b>93</b>	<b>90</b>

## 4.4.3.1. Острая токсичность

Острую токсичность 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 для каждого порошка на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26.

Белым мышам порошки, 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 течении 14 дней, учитывая общее состояние, внешний вид, поведенческие реакции, прием пищи и воды, ритм и частоту сердцебиения, количество дыхательных движений.

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

Следовательно, порошки на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 относятся к нетоксичным веществам.

#### **4.4.3.2. Хроническая токсичность**

В опытах по скармливанию порошков, на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 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) порошки на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 не получали. За лабораторными животными наблюдали в течение 30 дней.

Установлено, что при длительном скармливании порошков на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, 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 порошков, на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 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 кон-

трольных животных (величины статистически не отличались). Порошки на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 не вызывали повышения температуры тела и не влияли на характер локомоторной активности, стереотипное поведение и выносливость животных.

#### **4.4.3.3. Раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки**

Влияние порошков, на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 на кожу изучали методом однократной аппликации 10% суспензии, на белых мышах (массой 18 – 20 г, n=6).

Повторное местное раздражающее действие порошков исследовали на белых мышах (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 порошков, на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, в течение, соответственно 14 и 21 дня. Животным контрольных групп (n=6) по той же методике наносили подсолнечное масло. Наблюдение за белыми мышами вели в течение 30, за кроликами – 60 дней.

При изучении раздражающих свойств порошков на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, 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 порошков, на основе штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, на слизистую оболочку глаза, которое при однократном и повторном введении выражено слабо.

#### **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 стабильно-

сти при хранении действующих веществ в форме порошков, на основе штаммов *Bac. subtilis*.

Результаты проверки качества трех экспериментальных серий показали хорошую воспроизводимость и точность разработанных качественных и количественных методов контроля (табл. 21).

Таблица 21

**Результаты определения физико-химических и биологических свойств опытных серий Субтилбен в форме порошка**

Показатель		№ серии		
		1	2	3
Внешний вид и цвет	BS TJ 09	порошок серовато-белого цвета		
	BS TJ Д 24			
	BS TJ Д 26			
Наличие механических примесей, плесени	BS TJ 09	Нет		
	BS TJ Д 24			
	BS TJ Д 26			
Концентрация водородных ионов (рН) 10% водной суспензии	BS TJ 09	6,8	7,0	6,5
	BS TJ Д 24			
	BS TJ Д 26			
Массовая доля влаги, %	BS TJ 09	10	10	10
	BS TJ Д 24			
	BS TJ Д 26			
Количество м.к. <i>Bac. subtilis</i> , млрд/г	BS TJ 09	30	30	30
	BS TJ Д 24			
	BS TJ Д 26			
Количество жизнеспособных клеток <i>Bac. subtilis</i> , %	BS TJ 09	75	75	80
	BS TJ Д 24			
	BS TJ Д 26			
Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой	BS TJ 09	отсутствует		
	BS TJ Д 24			
	BS TJ Д 26			
Контаминация микоплазмами	BS TJ 09	отсутствует		
	BS TJ Д 24			
	BS TJ Д 26			
Антагонистические свойства (МБцК в отношении тест-культуры), мг /мл	BS TJ 09	0,3	0,8	1,2
	BS TJ Д 24			
	BS TJ Д 26			
Токсичность в дозе 3,0 г/кг массы тела	BS TJ 09	нетоксичен		
	BS TJ Д 24			
	BS TJ Д 26			

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.Вас. subtilis – 30млрд/г.
7. Количество жизнеспособных клеток Вас. subtilis – 75 – 80%.
8. Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой – отсутствует.
9. Контаминация микоплазмами – отсутствует.
10. Антагонистические свойства (МБцК в отношении тест-культур) – 0,3 – 1,2 мг/мл.
11. Токсичность– нетоксичен.

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

Изучение стабильности порошков, на основе штаммов *Vac. subtilis* методом «ускоренного старения», при повышенных температурах (37 и 50°С; 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, субстанции оставались стабильными в течение срока, соответствующего 2 годам естественного хранения (табл. 22).

При естественном хранении физико-химические и биологические свойства порошков на основе штаммов *Vac. subtilis* оставались стабильными в течение 2 лет (табл. 23).

Стабильность порошка на основе штаммов *B. subtilis* при «ускоренном старении»

Показатель	№ серии	После изго- товления	Срок хранения, лет							
			0,5		1		2		2,5	
			Температура хранения, °С							
			37	50	37	50	37	50	37	50
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Внешний вид и цвет	1	порошок серовато-белого цвета								
	2									
	3									
Наличие механических приме- сей, плесени	1	Нет								
	2									
	3									
рН 10% водной суспензии	1	6,5	6,5	6,2	6,2	5,5	5,8	5,5	5,5	5,2
	2	6,3	6,4	6,0	6,0	5,2	5,5	5,2	5,2	5,0
	3	6,6	6,5	6,2	6,5	5,8	6,0	5,5	5,7	5,5
Массовая доля влаги, %	1	5,0	5,0	2,5	4,8	2,0	4,0	1,0	2,0	0,5
	2	4,5	4,5	2,0	4,5	1,8	3,5	1,0	1,5	0
	3	5,0	5,0	3,0	4,5	2,0	3,5	1,0	2,5	0,5
Однородность	1	посторонняя микрофлора отсутствует								
	2									
	3									

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Кол-во м.к. <i>B. subtilis</i>, млрд. /г</b>	1	55	55	55	55	50	55	45	50	40
	2	53	53	50	53	50	50	45	50	40
	3	50	50	50	50	45	50	40	45	30
<b>Кол-во жизнеспособных клеток <i>B. subtilis</i>, %</b>	1	85	85	85	85	80	85	75	75	60
	2	90	90	90	90	85	85	75	75	60
	3	90	90	90	90	70	85	50	75	45
<b>Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой</b>	1	Отсутствует								
	2									
	3									
<b>Контаминация микоплазмами</b>	1	Отсутствует								
	2									
	3									
<b>Антагонистические свойства (МБцК в отношении <i>E. coli</i>), млн м.к./мл</b>	1	7,8	7,8	7,8	7,8	15,6	15,6	31,2	31,2	62,4
	2	15,6	15,6	15,6	15,6	31,2	15,6	62,4	31,2	124,8
	3	15,6	15,6	15,6	15,6	31,2	31,2	62,4	62,4	124,8
<b>Токсичность в 10-кратной терапевтической дозе</b>	1	Нетоксичен								
	2									
	3									

Стабильность порошка на основе штаммов *B. subtilis* при естественном хранении ( $t = 4 - 30^{\circ}\text{C}$ )  
(5.05.2003 – 5.10.2005 г.)

Показатель	№ серии	После изготовления	Срок хранения, лет				
			0,5	1	1,5	2	2,5
1	2	3	4	5	6	7	8
Внешний вид и цвет	1	порошок серовато-белого цвета					
	2						
	3						
Наличие механических примесей, плесени	1	Нет					
	2						
	3						
рН 10% водной суспензии	1	6,5	6,5	6,5	6,5	6,3	6,0
	2	6,3	6,3	6,3	6,3	6,0	5,5
	3	6,6	6,6	6,6	6,6	6,5	6,0
Массовая доля влаги, %, не более	1	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,0
	2	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0
	3	5,0	4,5	4,5	4,0	3,0	2,5
Однородность	1	посторонняя микрофлора отсутствует					
	2						
	3						

1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Кол-во м.к. <i>B. subtilis</i>, млрд. /г</b>	1	55	55	55	55	50	50
	2	53	53	53	53	50	45
	3	55	55	55	50	50	45
<b>Кол-во жизнеспособных клеток <i>B. subtilis</i>, %</b>	1	85	85	85	80	80	75
	2	90	90	85	85	85	80
	3	90	90	90	85	80	80
<b>Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой</b>	1	Отсутствует					
	2						
	3						
<b>Контаминация микоплазмами</b>	1	Отсутствует					
	2						
	3						
<b>Антагонистические свойства (МБцК в отношении <i>E. coli</i>), млн м.к./мл</b>		7,8	7,8	7,8	7,8	15,6	15,6
		15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	31,2
		15,6	15,6	15,6	15,6	31,2	62,4
<b>Токсичность в 10-кратной терапевтической дозе</b>		Нетоксичен					

На основании полученных данных, установлен срок хранения субстанций – 2 года. Порошки на основе *Bac. subtilis* хранят по списку Б, в сухом, хорошо проветриваемом, защищенном от света и атмосферных осадков месте, при температуре не выше 30°C.

#### 4.4.5. Упаковка и маркировка

Упаковку порошка на основе штаммов *B. subtilis* осуществляют по ОСТ 08064-19-07-95.

Порошок на основе штаммов *B. subtilis* фасуют по 100, 200, 500 или 1000 г в пакеты из бумаги с полиэтиленовым покрытием, для упаковки медицинских препаратов по ТУ 13-7308001-477-85, или в двойные пакеты из полиэтиленовой пленки по ГОСТ 10354-82 марок, разрешенных для упаковки и укупорки лекарственных средств, или в пластиковые банки. Пакеты герметизируют запаиванием. Допустимое отклонение в массе упаковки по ОСТ 64-492-85.

Пакеты с порошком, на основе штаммов *B. Subtilis*, укладывают в мешки из пленки полиэтиленовой по ГОСТ 10354-82; или в мешки полиэтиленовые по ГОСТ 17811-78; или полиэтиленовые вкладыши по ОСТ 10140-88, или по ОСТ 15160-77; или мешки-вкладыши пленочные по ГОСТ 19360-74; или мешки бумажные по ГОСТ 2226-88, которые завязывают нитками швейными особо прочными по ГОСТ 6309-87 или шпагатом по ГОСТ 17308-88, или зашивают; или в короба из картона коробочного склеенного марки ККС-1 по ТУ 81-04-356-75, которые оклеивают бандеролью из бумаги мешочной по ГОСТ 2228-81, или обвязывают шпагатом по ГОСТ 17308-88.

Пластиковые банки с порошком на основе штаммов *B. subtilis* укладывают в короба, из картона коробочного склеенного марки ККС-1 по ТУ 81-04-356-75, которые оклеивают бандеролью из бумаги мешочной по ГОСТ 2228-81, или обвязывают шпагатом по ГОСТ 17308-88.

На мешки или коробка наклеивают этикетку, под которую заправляют концы тесьмы, шпагата или бандероли.

В каждый мешок или короб, вкладывают наставления по применению субтилбена в количестве, равном количеству первичных упаковок.

Упаковку в транспортную тару производят в соответствии с ГОСТ 17768-90.

Маркировку осуществляют по ГОСТ 28471-90.

На пакете из бумаги с полиэтиленовым покрытием; или на этикетке из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86, вложенной между внутренним и наружным полиэтиленовыми пакетами; или на этикетке пластиковой банки указывают: наименование предприятия-изготовителя и его товарный знак; название препарата; концентрацию микробных клеток *B. subtilis*; массу нетто единицы упаковки; надпись «Для животных»; способ применения; условия хранения; номер серии; дату изготовления (месяц, год); срок годности (месяц, год); обозначение ТУ.

На этикетке групповой тары дополнительно указывают количество упаковок в мешке или коробе. На групповой таре наносят манипуляционные знаки, имеющие значение: «Беречь от влаги», «Беречь от нагрева», и предупредительные надписи: «Хранить с предосторожностью. Список Б» и «Для животных».

Маркировку транспортной и групповой тары производят в соответствии с ГОСТ 14192-96.

## 4.5. СУБТИЛБЕН В ФОРМЕ ГРАНУЛ И ТАБЛЕТОК

### 4.5.1. Состав и технология производства

На основе адсорбированной на минеральных и растительных веществах и высушенной контактно-сорбционным методом бактериальной массы штаммов *Bac. 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, состав которого и количественное содержание компонентов приведены в таблице 24.

**Композиция пробиотического препарата Субтилбен, %**

<b>Компонент</b>		<b>Кол-во</b>
<b>Порошок, содержащий бактериальную массу (30 млрд м.к./г)</b>	<b>BS TJ 09</b>	29,0
	<b>BS TJ Д 24</b>	29,0
	<b>BS TJ Д 26</b>	29,0
<b>Крахмал</b>		5,0
<b>Сахарный сироп</b>		3,0
<b>Кальция стеарат</b>		5,0

Основаниями для использования штаммов *Bac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 при изготовлении Субтилбена явились:

- 1) морфологические, культуральные, ферментативные свойства, типичные для *Bac. subtilis*;
- 2) отсутствие патогенности (смывы суточных агаровых культур при пероральном кроликам, телятам (9 млрд м.к./кг массы тела), и парентеральном (100 млн м.к./кг массы тела) введении белым мышам, не вызывают физиологические отклонения);
- 3) высокая противомикробная активность штаммов *Bac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24, BS TJ Д 26, в отношении *S. dublin*;
- 4) физиолого-биологические свойства, типичные для *Bac. subtilis* и определяющие более широкий диапазон действия, при сочетанном применении штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, которые характеризуются отсутствием гемолитической активности, ферментов, обуславливающих патогенные свойства (лецитиназа, гиалуронидаза), наличием важных технологических свойств (растут в присутствии 7%-ной NaCl, не нуждаются в аминокислотах и витаминах, при совместном культивировании не проявляют взаимного антагонизма).

Для получения первичных культур производственных штаммов, с полужидкого агара в пробирку с модифицированным картофельным питательным бульоном(МКПБ) (0,25% пептона, 0,25% картофельного крахмала, 0,125% глюкозы, 0,01% хлорида натрия и 10% бентонита) засеивали

культуры производственных штаммов *Bac. subtilis* (BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26), которые выращивали в течение 24 ч, при температуре  $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$ . После проверки на чистоту первичные культуры засеивали в колбы Эрленмейера (объемом 1,5 л) с МКПБ (не более 2/3 объема) и инкубировали при  $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$ , в течение 24 ч.

Бактериальную суспензию изготавливали методом глубинного культивирования (I стадия), для чего чистые культуры производственных штаммов *Bac. subtilis* (BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26) 24-часового роста в количестве 10% объема (1 л) засеивавшегося МКПБ (рН 7,4 – 7,6), инокулировали в 10-литровые бутылки и выращивали в течение 48 ч, при температуре  $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$ .

Затем готовили бентонито-пектиновую смесь: пектин перемешивали с бентонитом (37:60) до получения однородной смеси, которую добавляли в бактериальную суспензию производственного штамма *Bac. subtilis* (BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26) и перемешивали.

На II стадии культивирования бактериальной суспензии, в течение 24 ч при температуре  $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$ , минеральные и растительные адсорбенты стимулировали рост микроорганизмов. Производственную серию биомассы обезвоживали контактно-сорбционным методом при  $(50\pm 0,5)^\circ\text{C}$ , в течение 48 ч и измельчали в шаровых мельницах, а порошок просеивали через сито.

Основные технологические стадии изготовления Субтилбена в форме гранул и таблеток представлены на рисунке 10 и 11.

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.).



Рис. 10. Технологические стадии изготовления Субтилбена в форме гранул.

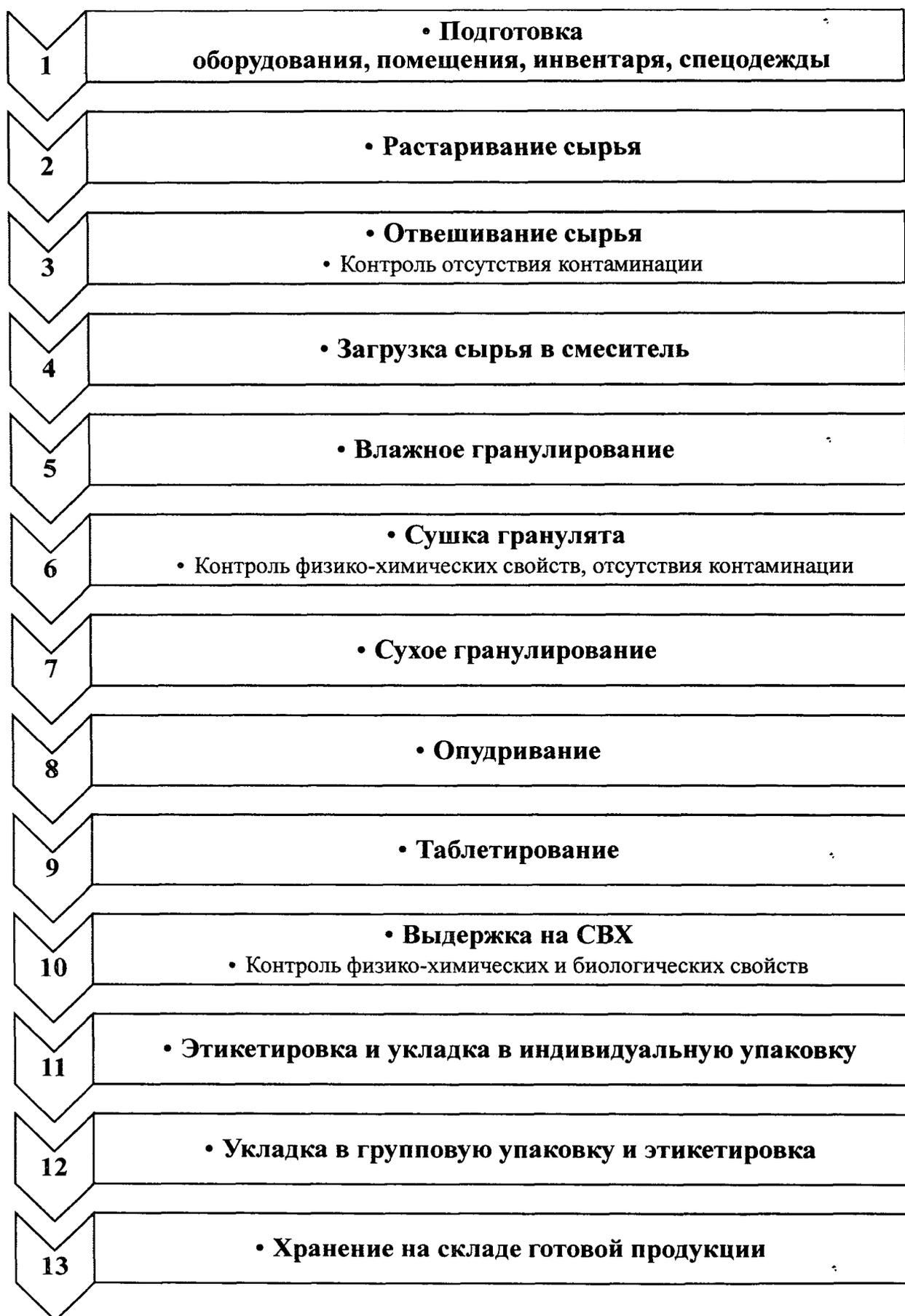


Рис. 11. Технологические стадии изготовления Субтилбена в форме таблеток.

#### 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 гранулы и таблеток и обеспечивают, 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 гранулы имеют сероватобелый цвет, диаметром 0,2-0,3 мм. Время распадаемости гранулы в среднем составляло 14,8 мин. Массовая доля влаги колебалась от 3,0 до 4,5% и рН 10%-ной водной суспензии составлял 5,9 - 7,0. В 1 г препарата содержалось 27 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 (табл 25).

Предложенные на основании проведенных исследований требования к качеству пробиотика Субтилбен в формах гранул 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 36 мес.: при определении количественных показателей достоверных расхождений в полученных результатах не отмечали ( $p \leq 0,05$ ).

Срок хранения Субтилбена в форме гранул 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 срок хранения в течение 2 лет.

**Результаты исследования физико-химических и биологических свойств  
экспериментальных серий Субтилбена в форме гранул**

Показатель		Требования	№ серии				
			1	2	3	4	5
Внешний вид и цвет		гранула беловато-серого цвета	Соответствует				
диаметр, мм		0,2-0,3	0,2±0,05	0,3±0,05	0,3±0,05	0,2±0,03	0,3±0,05
время распадаемости, мин		не более 30	15	16	18	15	10
рН 10% водной суспензии		5,5 – 8,0	5,9	6,5	6,8	6,0	7,0
Массовая доля влаги, %		не более 8,0	3,0	3,5	3,2	4,0	4,5
Кол-во	м.к. <i>Bac. subtilis</i> , млрд/г	27 – 30	27±0,5	27±0,5	28±0,5	27±0,5	27±0,5
	жизнеспособных клеток <i>Bac. subtilis</i> , %	не менее 70	75±0,5	80±0,5	82±0,5	75±0,5	85±0,5
Контаминация		бактериальной и грибковой микрофлорой	не допускается	Отсутствует			
		микоплазмами	не допускается	Отсутствует			
Бактерицидная активность в отношении <i>E. coli</i> , <i>S. dublini</i> , <i>Pr. vulgaris</i> , млн.к./мл		15,6 – 31,2	15,6	15,6	31,2	31,2	15,6
Токсичность		безвреден	Соответствует				

**Результаты исследования физико-химических и биологических свойств  
экспериментальных серий Субтилбена в форме таблеток**

Показатель		Требования	№ серии				
			1	2	3	4	5
Внешний вид и цвет		круглые таблетки беловато-серого цвета мраморного характера	Соответствует				
Таблетки	диаметр, мм	16,0±0,5	16,0±0,5	16,0±0,5	16,0±0,5	16,0±0,5	16,0±0,5
	масса, г	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1
	время распадаемости, мин	не более 60	15	16	20	15	10
рН 10% водной суспензии		5,5 – 8,0	5,9	6,5	6,8	6,0	7,0
Массовая доля влаги, %		не более 8,0	3,0	3,5	3,2	4,0	4,5
Кол-во	м.к. <i>Bac. subtilis</i> , млрд/г	24 – 30	24±0,5	24±0,5	24±0,5	24±0,5	24±0,5
	жизнеспособных клеток <i>Bac. subtilis</i> , %	не менее 70	75±0,5	80±0,5	82±0,5	75±0,5	85±0,5
Контаминация	бактериальной и грибковой микрофлорой	не допускается	Отсутствует				
	микоплазмами	не допускается	Отсутствует				
Бактерицидная активность в отношении <i>E. coli</i> , <i>S. dublin</i> и <i>Pr. vulgaris</i> , млн м.к./мл		15,6 – 31,2	15,6	15,6	31,2	31,2	15,6
Токсичность		безвреден	Соответствует				

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*) составила 15,6 – 31,2 млн м.к./мл.

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

При хранении физико-химические и биологические свойства препарата оставались стабильными в течение 36 мес.: при определении количественных показателей достоверных расхождений в полученных результатах не отмечали ( $p \leq 0,05$ ) (табл. 26).

Срок хранения Субтилбена 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 срок хранения в течение 3 лет.

## 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 *Bac. subtilis* BS TJ 09 и BS TJ Д 26. Состав препарата и количественное содержание компонентов представлены в таблице 27.

## Стабильность при хранении Субтилбена в форме таблеток

Показатель	Требование	№ серии	После изготовле- ния	Срок хранения, мес											
				6	12	18	24	30	36	42					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11					
Внешний вид и цвет	круглые таблетки бе- ловато-серого цвета мраморного характера	1	Соответствует												
		2													
		3													
Таблетки	размер, мм	1		16,0±0,5											
		2													
		3													
	масса, г	1		2,0±0,1											
		2													
		3													
	время распа- даемости, мин	не более 60	1	30											
			2												
			3												
рН 10% водной суспензии	5,5 – 8,0	1	5,9	6,0	5,9	5,9	5,8	5,8	5,6	5,5					
		2	6,5	6,5	6,5	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4					
		3	6,8	6,7	6,8	6,8	6,8	6,7	6,6	6,5					
Массовая доля влаги, %	не более 8,0	1	3,0	3,0	3,1	3,1	3,2	3,2	3,3	3,4					
		2	3,5	3,5	3,5	3,6	3,6	3,7	3,7	3,8					
		3	3,2	3,2	3,3	3,4	3,4	3,4	3,4	3,5					

1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Кол-во	м.к. <i>Bac. subtilis</i> , млрд/г	24 – 30	1	24±0,5	24±0,5	24±0,5	24±0,5	24±0,5	24±0,5	24±0,5	23±0,5
			2	24±0,5	24±0,5	24±0,5	24±0,5	24±0,5	24±0,5	22±0,5	
			3	24±0,5	24±0,5	24±0,5	24±0,5	24±0,5	22±0,5		
	жизнеспособных клеток <i>Bac. subtilis</i> , %	не менее 70	1	75±0,5	75±0,5	75±0,5	75±0,5	75±0,5	75±0,5	70±0,5	60±0,5
			2	80±0,5	80±0,5	80±0,5	80±0,5	80±0,5	75±0,5	60±0,5	
			3	82±0,5	82±0,5	82±0,5	82±0,5	82±0,5	75±0,5	70±0,5	
Конта-минация	бактериальной и грибковой микрофлорой	отсутствует	1	Отсутствует							
			2								
			3								
	микоплазмами	отсутствует	1	Отсутствует							
			2								
			3								
Антимикробная активность в отношении <i>S. dublin</i> , млн м.к./мл	15,6 – 31,2	1	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	31,2
		2	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	31,2	
		3	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2	62,5	
Токсичность	безвреден	1	соответствует								
		2									
		3									

Состав пробиотика Лаксубтил, %

Компонент		Кол-во
Бактериальная масса (30 млрд м.к./г)	BS TJ 09	0,0005
	BS TJ Д 26	0,0005
Сахароза		5,0
Коровье молоко		94,999

Смывы суточных агаровых культур, штаммов *Bac. 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, при введении в объемах соответственно 0,6; 10,5 и 0,3 мл не обуславливали физиологических отклонений у опытных животных, в сравнении с контрольными, что свидетельствует об отсутствии патогенности у испытанных штаммов.

МБсК штаммов *Bac. 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 *Bac. 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.

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

Основные технологические стадии изготовления Лаксубтила в форме суспензии представлены на рисунке 12.

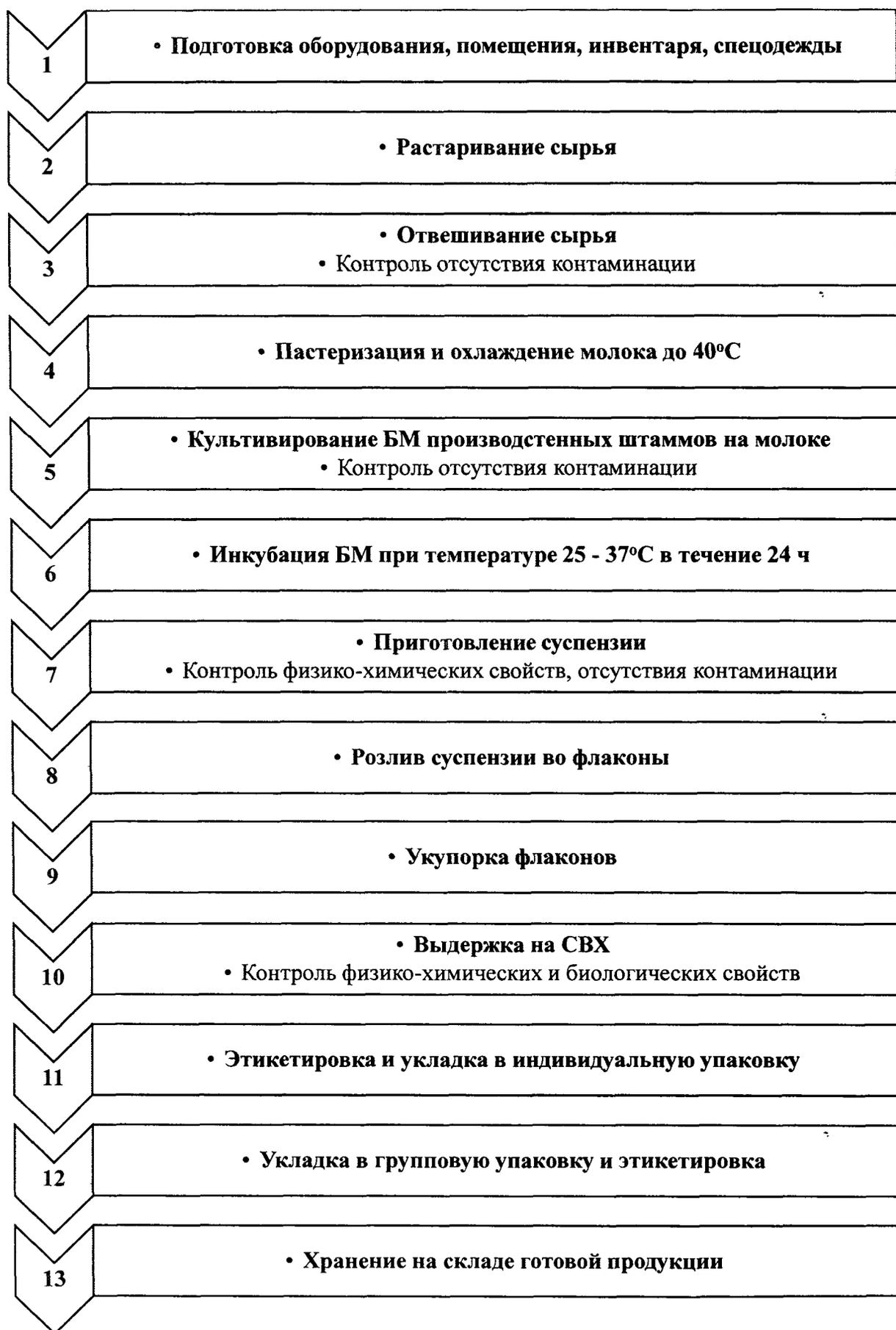


Рис. 12. Технологические стадии изготовления Лаксубтила.

На основании полученных результатов, разработаны инструкция по изготовлению и методов контроля, технические условия препарата Лаксубтил в форме суспензии (утв. СГВН МСХ РТ 11.09.2012 г.).

#### 4.6.2. Стандартизация и стабильность

Для стандартизации и контроля качества Лаксубтила, изучения его стабильности при хранении, разработаны качественные и количественные методы исследований, предусмотренные ОСТ 91500.05.001.00, в требованиях к качеству суспензий.

Результаты проверки качества трех экспериментальных серий (табл. 28), 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 (рН) – 4,5 – 5,0.
4. Количество микробных клеток *Bac. subtilis* – 500 млн/мл.
5. Количество жизнеспособных клеток *Bac. subtilis* – 85 – 90%.
6. Контаминация бактериальной и грибковой микрофлорой – отсутствует.
7. Контаминация микоплазмами – отсутствует.
10. Антагонистические свойства (МБЦК в отношении *E. coli*) – 15,6 – 31,2 млн м.к./мл.
11. Токсичность – безвреден.

Требования к качеству Лаксубтила, предложенные на основании результатов проведенных исследований, вошли в инструкцию по изготовлению и контролю, технические условия на препарат.

Таблица 28

**Результаты исследования физико-химических  
и биологических свойств экспериментальных серий Лаксубтила**

Показатель		№ серии		
		1 (дата)	2 (дата)	3 (дата)
Внешний вид и цвет		суспензия серовато-белого цвета		
Наличие механических примесей, плесени		Нет		
рН 10% водной суспензии		4,5	5,0	5,0
Кол-во	м.к. <i>Bac. subtilis</i> , млрд/мл	0,5	0,5	0,5
	жизнеспособных клеток <i>Bac. subtilis</i> , %	90	85	87
Контаминация	бактериальной и грибковой микрофлорой	отсутствует		
	микоплазмами	отсутствует		
Антимикробная активность, млн м.к./мл		15,6	15,6	31,2
Токсичность		Безвреден		

Изучение стабильности Лаксубтила, при естественном хранении (+18 – +20°C) и в условиях холодильника (+2 – +4°C), выявило, что в первом случае физико-химические и биологические свойства пробиотика оставались стабильными 2 сут, во втором – 10 дней, в течение которых препарат хранят по списку Б, в сухом, хорошо проветриваемом, защищенном от света и атмосферных осадков месте, при температуре не выше 8°C.

## 5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ *BAC. SUBTILIS*

### 5.1. Антимикробная активность

#### 5.1.1. Субтилбен

Методом двукратных серийных разведений, в жидкой (МПБ) и плотной (МПА) средах на музейных штаммах (3) и изолятах *S. dublin* (3), 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 *Bac. subtilis*.

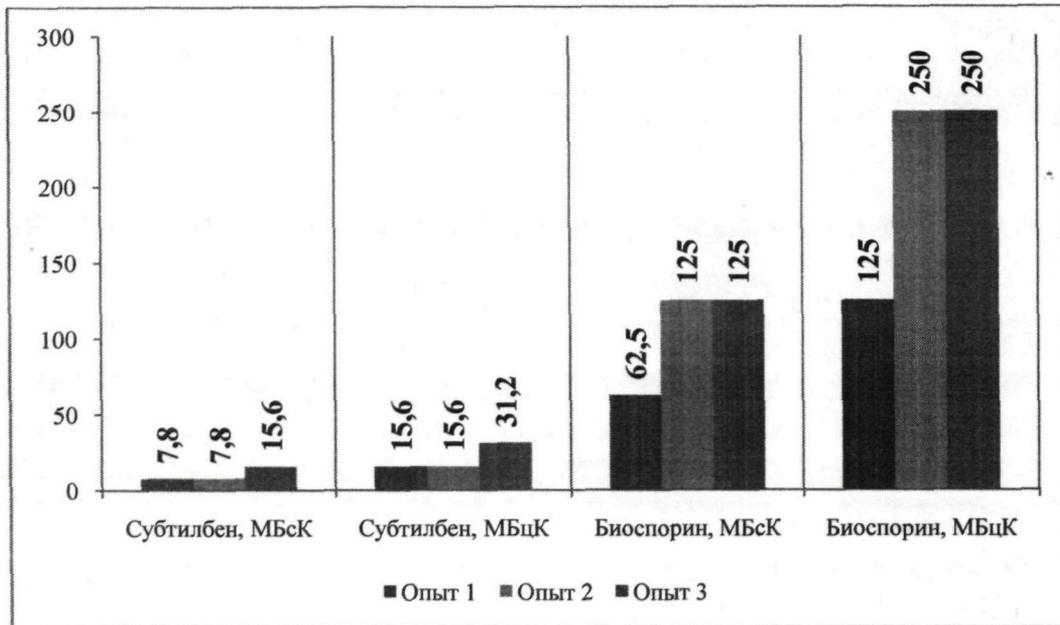
Установлена высокая бактериостатическая и бактерицидная активность Субтилбена в отношении исследованных тест-культур (табл. 29), задержка роста которых происходила при концентрации препарата 7,8 – 15,6, а гибель – 15,6 – 31,2 млн м.к./мл. Соответствующие показатели для известного препарата Биоспорин составили 62,5 – 125 и 125 – 250 млн м.к./мл (рис. 13).

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 ч.

*Таблица 29*

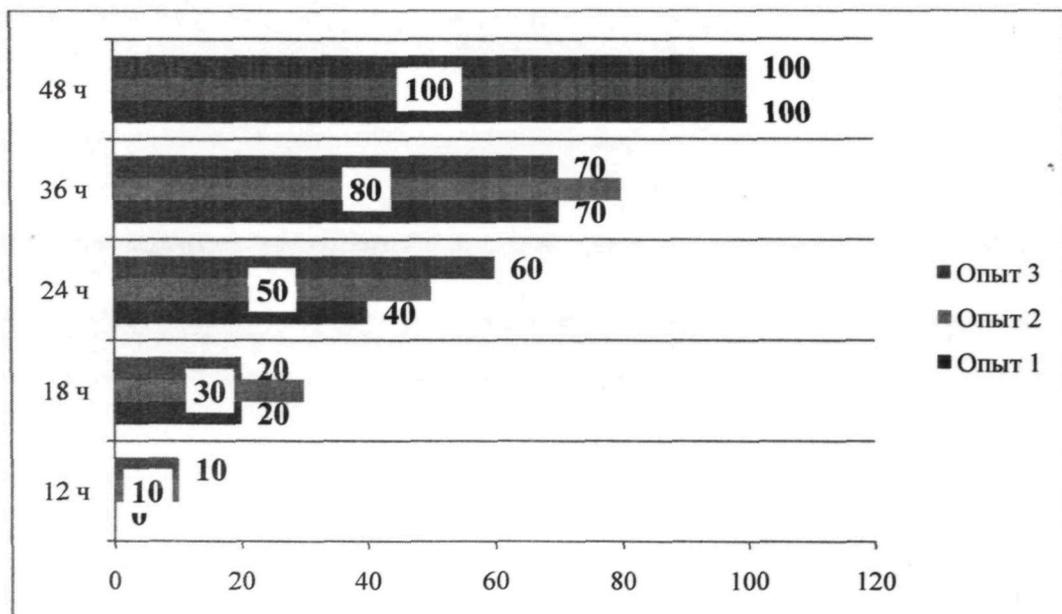
**Антагонистические свойства пробиотика Субтилбен  
в отношении *S. dublin*, млн м.к./мл**

		Опыт		
		1	2	3
Субтилбен	МБсК	7,8	7,8	15,6
	МБцК	15,6	15,6	31,2
Биоспорин	МБсК	62,5	125	125
	МБцК	125	250	250



**Рис. 13. Противомикробная активность Субтилбена в сравнении с Биоспорином, млн м.к./мл**

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 (рис. 14).



**Рис. 14. Динамика лизиса *S. dublin* в результате контакта с Субтилбеном, %.**

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

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

### 5.1.2. Лаксубтил

Антимикробную активность пробиотика Лаксубтил определяли методом двукратных серийных разведений, в жидкой (МПБ) и плотной (МПА) средах на изолятах *E. coli* (O101, O86, O117, O26, O8), выделенных от больных сальмонеллезом телят в животноводческих хозяйствах РТ. МБСК определяли по задержке роста в мазках тест-культур, окрашенных по Граму, МБЦК – через 24 ч инкубации (наблюдали только грамположительные палочки *Bac. subtilis*).

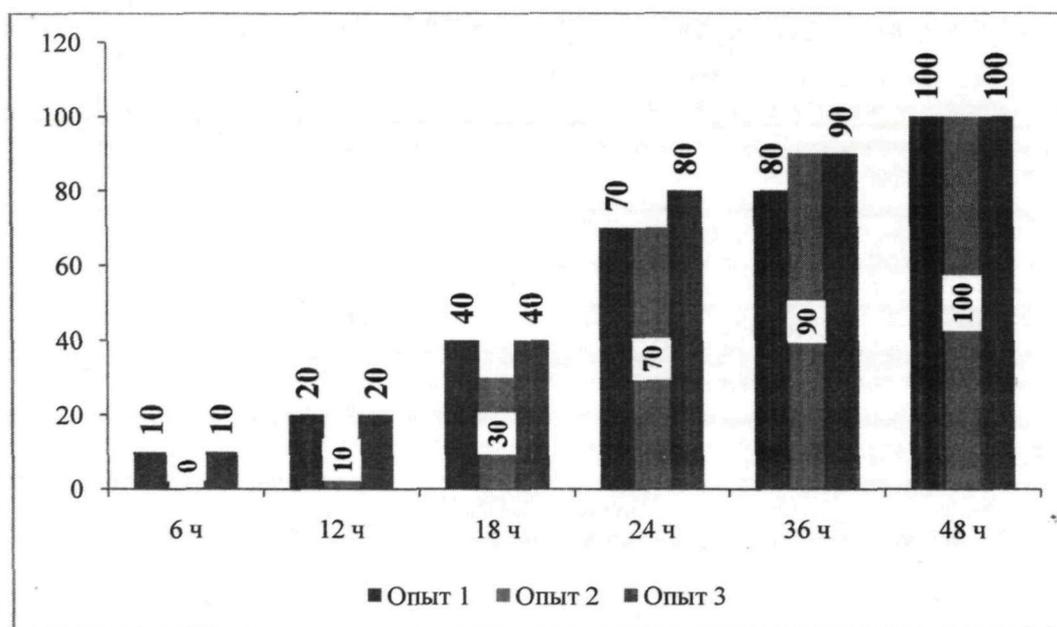
Установлено, что Лаксубтил обладает высокой антагонистической активностью в отношении изолятов различных серотипов *E. coli*. Минимальное количество пробиотика, которое приводило к гибели бактерий, составило 15,6 – 31,2 млн м.к./мл. Противомикробное действие Лаксубтила было равнозначно таковому у препарата сравнения Субтилбен (табл. 30).

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 ч.

Противомикробное действие пробиотических препаратов на основе *Bac. subtilis*, млн м.к./мл

		Лаксубтил		Субтилбен				Биоспорин	
		МБсК	МБцК	гранулы		Таблетки		МБсК	МБцК
				МБсК	МБцК	МБсК	МБцК		
<b>E. coli</b>	<b>O101</b>	15,6	31,2	15,6	31,2	15,6	31,2	125	250
	<b>O86</b>	7,8	15,6	7,8	15,6	15,6	15,6	62,5	125
	<b>O117</b>	15,6	31,2	15,6	31,2	15,6	31,2	125	250
	<b>O26</b>	15,6	31,2	15,6	31,2	15,6	31,2	125	250
	<b>O8</b>	15,6	31,2	15,6	31,2	15,6	31,2	125	250
<b>S. dublin</b>		15,6	31,2	15,6	31,2	7,8	15,6	62,5	125
<b>Pr. vulgaris</b>		15,6	31,2	15,6	31,2	15,6	31,2	125	250

Через 6 ч, после контакта с препаратом, начиналось изменение морфологии *E. coli*, выразившееся 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. 15).



**Рис. 15.** Динамика лизиса *E. coli* после контакта с Лаксубтилом, %.

Таким образом, бактерицидная активность Лаксубтила, в отношении различных серотипов *E. coli* (O101, O86, O117, O26, O8), выделенных от больных колибактериозом 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 пробирках (минеральные и растительное вещества, входящие в состав Лаксубтила).

## 5.2. Токсикологические свойства

### 5.2.1. Безвредность

В соответствии с ГОСТом Р 52337-2005, с использованием сухой культуры инфузории *Colpoda steinii*, определяли безвредность пробиоти-

ков, оценивая результаты биотеста по гибели стилохоний, на которые воздействовали исследовавшимся препаратом.

Для культивирования инфузорий и разбавления пробиотических препаратов использовали раствор Лозина-Лозинского, состоящий из NaCl (0,01%), KCl (0,001%), CaCl<sub>2</sub> двуводного (0,001%), MgCl<sub>2</sub> шестиводного (0,001%), NaHCO<sub>3</sub> (0,002%). В часть раствора, применявшуюся для культивирования инфузорий, вносили свежесушеные хлебопекарные дрожжи (12 мг на 100 мл), которые предварительно тестировали на токсичность.

Использовали суточную культуру стилохоний, находившихся в фазе экспоненциального (активного) роста, для чего, за сутки до опыта, цисты и споры культуры пересаживали в новую питательную среду со свежим кормом и помещали в термостат, при температуре 22 – 24°C.

Для приготовления рабочей суспензии, исследовавшихся образцов пробиотиков, брали навеску объемом 1000±10 мг (мкл), вносили ее в колбу вместимостью 25 мл, заливали 10 мл раствора Лозина-Лозинского и на 20 мин колбу помещали в аппарат для встряхивания жидкостей. Затем раствор в течение 5 мин центрифугировали с частотой вращения 1000 об/мин и использовали надосадочную жидкость.

Каждую пробу исследовали в пяти повторностях. Пересадку и подсчет стилохоний проводили под микроскопом при увеличении 2×8 или 2×14. Сначала автоматической пипеткой отбирали по 20 мкл среды со стилохониями и помещали в каждую лунку двух рядов блока микроаквариумов (5 лунок в ряду). Через 2 мин, учитывали в каждой лунке количество живых стилохоний. Затем в пять лунок первого ряда (опытных) добавляли по 20 мкл суспензии пробиотического препарата, а в 5 лунок второго ряда (контроль) – такое же количество дистиллированной воды. Спустя 3 ч, в лунках опытного и контрольного рядов снова проводили подсчет количества активных стилохоний и сопоставляли результаты. Выживаемость стилохоний каждого ряда (N, %) вычисляли по формуле:

$$N = N_2 : N_1 \times 100,$$

где  $N_1$  – среднеарифметическое (из пяти) значение количества активных стилохоний в начале опыта, экз.;

$N_2$  – среднеарифметическое (из пяти) значение количества активных стилохоний в конце опыта, экз.

При изучении **безвредности пробиотиков** Лаксубтил в форме суспензии и Субтилбен в форме гранул и таблеток, установлено (табл. 30), что через 3 ч воздействия препаратами, активность стилохоний опытного ряда составила 89% (в контроле – 90%).

Таблица 30

**Реакция стилохоний на пробиотические препараты  
(количество активных стилохоний), экз.**

		Ряд лунок				контроль
		опытный			Лаксубтил	
		Субтилбен				
		гранулы	таблетки			
В начале опыта	№ лунок	1	8	10	9	11
		2	8	9	8	10
		3	10	10	9	8
		4	9	9	11	10
		5	10	10	10	11
		<b><math>N_1</math></b>	<b>45</b>	<b>48</b>	<b>46</b>	<b>50</b>
Через 3 ч	№ лунок	1	7	8	7	8
		2	9	9	9	8
		3	7	9	8	10
		4	9	9	10	9
		5	8	8	8	10
		<b><math>N_2</math></b>	<b>40</b>	<b>42</b>	<b>41</b>	<b>45</b>
N (%)= $N_2:N_1 \times 100$		89	87,5	89	90	

Следовательно, пробиотик Лаксубтил относится к безвредным средствам микробиологического синтеза, под действием которых, за установленное время, остаются активными свыше 80% стилохоний.

### 5.2.2. Острая токсичность

В соответствии с «Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве», острую токсичность пробиотиков 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:

- суспензия Лаксубтил в форме: 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.

- 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.

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

Белым мышам всех групп через 6 ч после введения пробиотиков давали корм и переводили их на обычный режим кормления. За лабораторными животными наблюдали в течение 15 сут, учитывая их общее состояние, внешний вид, поведенческие реакции, прием пищи и воды, ритм и частоту сердцебиения, количество дыхательных движений.

В течение первых суток опыта за клиническим состоянием белых мышей наблюдали в течение первых шести часов, потом – через каждые 3 ч, в последующие 14 дней – ежедневно три раза, учитывая начало и динамику развития клинических проявлений отравления, время гибели опытных животных или симптомы улучшения их физиологического состояния.

Кратковременное снижение двигательной активности опытных белых мышей отмечали в первые 3 – 4 ч наблюдений, клиническое состояние которых в дальнейшем не отличалось от таковых 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 Лаксубтил и Субтилбен, при энтеральном введении в максимальной дозе (соответственно 25000 мкл/кг и 10000 мг/кг массы тела), не вызывают гибели экспериментальных животных, поэтому относятся к VI классу токсичности (нетоксичным веществам).

### **5.2.3. Хроническая токсичность**

Хроническую токсичность суспензии Лаксубтил, гранул и таблеток Субтилбен изучали в опытах по скармливанию препаратов один 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 (Лаксубтил – 5,0 мл/кг, Субтилбен 0,3 г/кг массы тела). Животные контрольной группы (n=10) препарат не получали. За лабораторными животными наблюдали во время всего опыта, по окончании которого их усыпляли и проводили патологоанатомическое вскрытие.

Установлено, что длительное введение Лаксубтила и Субтилбена в дозах соответственно 5,0; 10,0 и 15,0 мл/кг; 0,3; 0,6 и 0,9 г/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), бывших однородного цвета, без кровоизлияний и дистрофических изменений.

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

#### **5.2.4. Раздражающее действие и аллергенное свойство**

Раздражающее действие суспензии Лаксубтил, гранул и таблеток Субтилбен 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 см<sup>3</sup>, в течение 26 сут, учитывали реакцию кожи (гиперемия, болезненность, утолщение кожной складки, расчесы) и клиническое состояние организма лабораторных животных.

Раздражающее действие суспензии Лаксубтил, гранул и таблеток Субтилбен на слизистую оболочку глаза определяли на двух 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 см<sup>3</sup>, 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 Лаксубтила, гранул и таблеток Субтилбен, 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 Лаксубтила, гранул и таблеток Субтилбен (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 Лаксубтила 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 Лаксубтила, гранул и таблеток Субтилбен (опытная группа, n=6); контрольным животным (n=6) – по 2 капли подсолнечного масла. За опытными и контрольными кроликами наблюдали в течение 60 дней.

Действие суспензии Лаксубтил, гранул и таблеток Субтилбен 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 Лаксубтила, гранул и таблеток Субтилбен, контрольным – воду.

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

Мясо кроликов после 5-кратной дачи препаратов в дозах, соответственно 5 мл/кг и 0,3 г/кг массы тела один раз в сут, не отличалось по каче-

ству от мяса контрольных (интактных) животных, на разрезе мышечная ткань красноватого цвета, поверхность разреза влажная, эластичная, плотная; бульон прозрачный без посторонних запахов (табл. 31).

Таблица 31

**Показатели ветеринарно-санитарного качества мяса кроликов при применении Лаксубтила и Субтилбена**

		№ животного	pH	Реакция с $\text{CuSO}_4$	Бензидиновая проба	Содержание аминно-аммиачного азота	K (кислотность / окисляемость)
<b>Лаксубтил</b>		1	5,8	бульон прозрачный	+	1,35	0,42
		2	5,8		+	1,33	0,40
		3	5,9		+	1,30	0,42
		4	5,8		+	1,29	0,41
		5	5,7		+	1,30	0,40
<b>Субтилбен</b>	<b>гранула</b>	1	5,8	бульон прозрачный	+	1,35	0,42
		2	5,6		+	1,33	0,40
		3	5,9		+	1,30	0,42
		4	5,8		+	1,29	0,41
		5	5,7		+	1,30	0,40
	<b>таблетка</b>	1	5,9	бульон прозрачный	+	1,35	0,42
		2	5,7		+	1,33	0,40
		3	5,9		+	1,30	0,42
		4	5,8		+	1,29	0,41
		5	5,7		+	1,30	0,40
<b>Контроль</b>		1	5,8	бульон прозрачный	+	1,35	0,42
		2	5,8		+	1,33	0,40
		3	5,9		+	1,30	0,42
		4	5,8		+	1,29	0,41
		5	5,7		+	1,30	0,40

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. Доклиническое исследование

Переносимость суспензии Лаксубтил, гранул и таблеток Субтилбен исследовали общепринятыми методами на МТФ им. Л. Муродова Гиссарского района. 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 Лаксубтил и Субтилбен применяли соответственно из расчета 5,0; 10,0 и 15,0 мл/кг и 0,3; 0,6 и 0,9 мг/кг массы тела (условно-терапевтическая, двух- и трехкратная дозы от условно-терапевтической), в течение 20 сут.

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-ий, 5-ый, 10-ый, 15-ый и 20-ый день применения Лаксубтила и Субтилбена проводили биохимические исследования крови.

В течение всего экспериментального периода, ни одна из применяемых доз Лаксубтила и Субтилбенане оказала отрицательного действия на организм телят, которые были активны и не отставали в развитии и приросте живой массы, от контрольных животных (табл. 32).

Ни в опытных, ни в контрольной группах гибели животных не наблюдали. Среднесуточный прирост телят в опытных группах превышал контрольные показатели на 2,5% (Лаксубтил – 1-я группа), 3,0% (Субтилбен – 1-я группа) и 3,6% (Лаксубтил – 2- и 3-я группы), 3,4, % (Субтилбен – 2- и 3-я группы), что свидетельствует о безвредности испы-

танных пробиотиков, применение которых не оказывает отрицательного влияния на организм телят (табл. 33).

Таблица 32

**Результаты изучения, на телятах, переносимости Лаксубтила**

Показатель	Группа			
	1	2	3	4 (контроль)
Кол-во телят, гол.	11	11	11	11
Средняя масса тела в начале опыта, кг	31,2±1,7	32,1±1,2	31,5±2,1	31,9±1,6
Среднесуточный прирост массы тела, г	150	161	161	125
Заболело, гол.	–	–	–	–
Пало, гол.	–	–	–	–

Таблица 33

**Клинические показатели телят при применении Лаксубтила**  
(средние по группе, P>0,05)

Время исследования	Температура тела, °С	Пульс, уд./мин	Дыхание, дв./мин
До введения	39,2±0,2	86±5	27±3
День введения	1	39,3±0,4	85±4
	3	39,2±0,2	90±3
	5	38,9±0,5	90±5
	10	39,1±0,4	87±3
	15	39,2±0,2	88±4
	20	39,1±0,5	89±3

Использование Лаксубтила и Субтилбена, 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 Лаксубтил и Субтилбен позитивно влияют на количество лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина и уровень гематокрита (табл. 34).

Гематологические показатели телят при применении Лаксубтила(средние по группе, P&gt;0,05)

Показатель	Время исследования							
	До введения	Во время введения, дни						
		1	3	5	10	15	20	
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	
<b>Опытная группа</b>								
Эритроциты, $1 \times 10^{12}/л$	6,5	6,8	7,0	7,1	7,5	7,7	7,6±01	
Лейкоциты, $1 \times 10^9/л$ )	12,5±0,05	13,5±0,2	14,5±0,03	10±0,05	12±0,03	15±0,1	16±0,05	
Гемоглобин, г%	14,7	14,7	15,7	18,9	15,2	14,8	14,5	
Лимфоциты, %	55	56	56	68	58	56	58	
Билирубин.ммоль	13	12,0	12,0	12,0	10,0	12,0	12,0	
Общий белок.г/л	65	58	65	55	65	60	60	
Аминотрансфераза моль (ч,л,)	аланиновая	0,50	0,50	0,55	0,50	0,60	0,60	0,55
	аспаргиновая	0,41	0,55	0,56	0,55	0,66	0,66	0,61
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	0,7	1	0,7	1	0,7	1	1	

1  
2

1		2	3	4	5	6	7	8
<b>Контрольная группа</b>								
<b>Эритроциты, <math>1 \times 10^{12}/л</math></b>		7,5	7,5±02	6,5±02	7±01	7±011	6,8±02	7,0±01
<b>Лейкоциты, <math>1 \times 10^9/л</math></b>		6	6,5±0,2	6±0,03	5,5±0,1	6±0,03	6±0,1	6±0,05
<b>Гемоглобин, г/л</b>		8	8,5	8,4	8,9	8,0	8,5	8,5
<b>Лимфоциты, %</b>		50	55	50	55	55	55	50
<b>Билирубин.ммоль</b>		20	18,0	20,0	20,0	17,0	18,5	20,3
<b>Общий белок.г/л</b>		60	65	67	70	60	55	60
<b>Аминотрансфераза моль (ч,л.)</b>	<b>аланиновая</b>	0,40	0,40	0,45	0,40	0,46	0,45	0,50
	<b>аспаргиновая</b>	0,45	0,45	0,45	0,46	0,50	0,50	0,47
<b>Скорость оседания эритроцитов, мм/ч</b>		0,70	0,70	1	0,70	0,70	1	0,70

3

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 препараты стимулируют эритропоэз и лейкопоэз, не изменяя стабильности кроветворения и постоянства, в составе и общем количестве периферической крови.

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

#### **5.4. Стандартизация и контроль качества пробиотиков на основе штаммов *B. subtilis***

##### **5.4.1. Субтилбен в форме гранул и таблеток**

Результаты исследования, 3 экспериментальных серий Субтилбена в форме гранул и таблеток (табл. 35 и 36), показали хорошую воспроизводимость и точность разработанных качественных и количественных методов контроля препарата, что обеспечивает оптимальный уровень качества стандартизируемого объекта в процессе его производства, хранения и применения.

Качество Субтилбена характеризуется следующими физико-химическими и биологическими показателями:

1. Внешний вид и цвет – гранулы (таблетки) серовато-белого цвета.
2. Размер гранул – 0,2 – 0,3 мм.
3. Диаметр таблеток –  $16,0 \pm 0,5$  мм.
4. Масса таблеток –  $1,8 \pm 0,1$  г.

**Результаты исследования экспериментальных серий Субтилбена в форме гранул**

Показатель	№ серии		
	1	2	3
Внешний вид и цвет	гранулы беловато-серого цвета		
Размер гранул, мм	0,2 – 0,3		
Концентрацию водородных ионов (рН) 10% водной суспензии	5,8	5,9	6,0
Массовая доля влаги, %	3,0	4,0	3,0
Однородность	посторонняя микрофлора отсутствует		
Количество м.к. <i>B. subtilis</i> , млрд/г	27	27	27
Количество жизнеспособных клеток <i>B. subtilis</i> , %	75	85	80
Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой	отсутствует		
Контаминация микоплазмами	отсутствует		
Антагонистические свойства (МБцК в отношении тест-культур), млн м.к./г	15,6	31,2	15,6
Токсичность в 10-кратной терапевтической дозе	нетоксичен		

## Результаты исследования экспериментальных серий Субтилбена в форме таблеток

Показатель	№ серии		
	1	2	3
Внешний вид и цвет	таблетки беловато-серого цвета		
Диаметр таблеток, мм	16,0±0,5	16,0±0,5	16,0±0,5
Масса таблеток, г	1,8±0,1	1,8±0,1	1,8±0,1
Время распадаемости таблеток, мин	30	30	30
Концентрацию водородных ионов (рН) 10% водной суспензии	5,6	5,8	6,0
Массовая доля влаги, %	7,5	7,0	7,0
Однородность	посторонняя микрофлора отсутствует		
Количество микробных клеток <i>B. subtilis</i> , млрд/г	24	24	24
Количество жизнеспособных клеток <i>B. subtilis</i> , %	75	80	80
Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой	отсутствует		
Контаминация микоплазмами	отсутствует		
Антимикробная активность, мкг/мл	0,47	0,23	0,47
Токсичность в 10-кратной терапевтической дозе	нетоксичен		

5. Время распадаемости таблеток – 30 мин.
6. Концентрация водородных ионов (рН) 10% водной суспензии – 5,0-6,0.
7. Массовая доля влаги – 3,0 – 6,0.
8. Стерильность – посторонняя микрофлора отсутствует.
9. Количество микробных клеток *B. subtilis* – 27 (гранулы), 24 (таблетки) млрд/г.
10. Количество жизнеспособных клеток *B. subtilis* – 75 – 80%.
11. Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой – отсутствует.
12. Контаминация микоплазмами – отсутствует.
13. Антагонистические свойства (МБЦК в отношении *E. coli*) – 0,3 – 1,2 мг/мл.
14. Токсичность в дозе 3,0 г/кг массы тела – нетоксичен.

Требования к качеству пробиотика Субтилбен в форме гранул и таблеток, предложенные на основании проведенных исследований, вошли в инструкцию по изготовлению и контролю, также технические условия на препарат.

#### **5.4.2. Лаксубтил в форме суспензии**

Для стандартизации и контроля качества Лаксубтила, изучения его стабильности при хранении, нами разработаны качественные и количественные методы исследований, предусмотренные ОСТ 91500.05.001.00, в требованиях к качеству суспензий.

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

Качество препарата характеризуется следующими физико-химическими и биологическими показателями:

1. Внешний вид и цвет – суспензия желтовато-белого цвета.

2. Наличие механических примесей, плесени – нет.
3. Концентрация водородных ионов (рН) – 4,5 – 5,0.
4. Стерильность – посторонняя микрофлора отсутствует.
6. Количество микробных клеток *B. subtilis* – 500 млн/мл.
7. Количество жизнеспособных клеток *B. subtilis* – 85 – 90%.
8. Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой – отсутствует.
9. Контаминация микоплазмами – отсутствует.
10. Антагонистические свойства (МБЦК в отношении *E. coli*) – 150 мкл/мл.
11. Токсичность в дозе 25 мл/кг – нетоксичен.

На основании проведенных исследований, были предложены требования к качеству Лаксубтила, которые вошли в инструкцию по изготовлению и контролю, технические условия на препарат.

Каждая серия пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил должна быть принята отделом технического контроля или контролером предприятия-изготовителя. На основании анализа средней пробы (ГФ XI, вып. 2, с. 15), отобранной от серии, устанавливают качество препарата.

Пробиотики Субтилбени Лаксубтил контролируют по следующим показателям: внешний вид и цвет; размер гранул; размер таблеток; масса таблеток; время распадаемости таблеток; концентрация водородных ионов (рН) 10% водной суспензии; массовая доля влаги; стерильность; количество микробных клеток *B. subtilis*; количество жизнеспособных клеток *B. subtilis*; контаминация бактериальной и грибной микрофлорой; контаминация микоплазмами; антимикробная активность; токсичность.

## 5.5. Стабильность

### 5.5.1. Субтилбен в форме гранул и таблеток

Физико-химические и биологические свойства препарата, при естественном хранении, оставались стабильными в течение 2 лет (табл. 37, 38). При определении количественных показателей достоверных расхождений в полученных результатах не отмечали ( $p \leq 0,05$ ).

На основании проведенных исследований установлен срок хранения Субтилбена по списку Б, в сухом, хорошо проветриваемом, защищенном от света и атмосферных осадков месте, при температуре не выше 30°C, 2 года.

### 5.5.2. Лаксубтил в форме суспензии

Стабильность Лаксубтила изучили, при естественном хранении (при комнатной температуре) (+18 – +20°C) и в условиях холодильника (+2 – +8°C), в течение 1, 5, 10 и 15 дней.

При естественном хранении (комнатной температуре) физико-химические и биологические свойства Лаксубтила оставались стабильными в течение 2 сут, а при хранении в условиях холодильника – 10 дней.

На основании полученных данных установлен срок хранения препарата – 10 дней. Лаксубтил хранят по списку Б, в сухом, хорошо проветриваемом, защищенном от света и атмосферных осадков месте, при температуре не выше 4°C.

Результаты изучения стабильности, при естественном хранении ( $t=4 - 30^{\circ}\text{C}$ ), экспериментальных серий Субтилбена в форме гранул

Показатель	№ се- рии	После изго- товления	Срок хранения, лет				
			0,5	1	1,5	2	2,5
1	2	3	4	5	6	7	8
Внешний вид и цвет	1	гранулы желтовато-серого цвета					
	2						
	3						
Размер гранул, мм	1	0,2 – 0,3					
	2						
	3						
Концентрацию водородных ионов (рН) 10% водной суспензии	1	5,8	5,8	5,8	5,8	6,0	6,0
	2	5,9	5,9	6,0	6,0	6,0	6,0
	3	6,0	6,0	6,0	6,0	5,5	6,5
Массовая доля влаги, %	1	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
	2	4,0	4,0	4,0	3,0	3,0	3,0
	3	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Однородность	1	посторонняя микрофлора отсутствует					
	2						
	3						
Количество микробных клеток <i>B. subtilis</i> , млрд/г	1						
	2						
	3						

1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Количество жизнеспособных клеток <i>B. subtilis</i>, %</b>							
	2						
	3						
<b>Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой</b>	1	Отсутствует					
	2						
	3						
<b>Контаминация микоплазмами</b>	1	Отсутствует					
	2						
	3						
<b>Антимикробная активность, мкг/мл</b>	1	0,47	0,47	0,47	0,94	1,87	1,87
	2	0,47	0,47	0,47	0,47	0,94	1,87
	3	0,23	0,23	0,23	0,47	0,94	0,94
<b>Токсичность в 10-кратной терапевтической дозе</b>	1	Нетоксичен					
	2						
	3						

**Результаты изучения стабильности, при естественном хранении ( $t=4 - 30^{\circ}\text{C}$ ),  
экспериментальных серий Субтилбена в форме таблеток**

Показатель	№ се- рии	После изго- товления	Срок хранения, лет				
			0,5	1	1,5	2	2,5
1	2	3	4	5	6	7	8
Внешний вид и цвет	1	таблетки желтовато-серого цвета					
	2						
	3						
Размер таблеток, мм	1	16,0±0,5					
	2						
	3						
Масса таблеток, г	1	1,8±0,1					
	2						
	3						
Время распадаемости табле- ток, мин	1	30					
	2						
	3						
Концентрацию водородных ионов (рН) 10% водной сус- пензии	1	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	6,0
	2	5,8	5,8	5,8	6,0	6,0	6,0
	3	6,0	6,0	6,0	6,0	6,5	6,5
Массовая доля влаги, %	1	7,5	7,5	7,0	7,0	7,0	6,5
	2	7,0	7,0	7,0	6,5	6,5	6,5
	3	7,0	7,0	7,0	6,0	6,0	6,0

1	2	3	4	5	6	7	8
Однородность	1	посторонняя микрофлора отсутствует					
	2						
	3						
Количество микробных клеток <i>B. subtilis</i> , млрд/г	1						
	2						
	3						
Количество жизнеспособных клеток <i>B. subtilis</i> , %	1						
	2						
	3						
Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой	1	Отсутствует					
	2						
	3						
Контаминация микоплазмами	1	Отсутствует					
	2						
	3						
Антимикробная активность, мкг/мл	1	0,47	0,47	0,47	0,47	0,94	1,87
	2	0,23	0,23	0,23	0,23	0,47	0,94
	3	0,47	0,47	0,47	0,47	0,94	1,87
Токсичность в 10-кратной терапевтической дозе	1	Нетоксичен					
	2						
	3						

## **6. ЭФФЕКТИВНОСТЬ СУБТИЛБЕНА И ЛАКСУБТИЛА ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЭНТЕРИТОВ ТЕЛЯТ**

### **6.1. Профилактическая эффективность**

#### **6.1.1. Определение профилактической эффективности пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил в эксперименте**

В экспериментальных условиях профилактическая эффективность пробиотиков Субтилбен в форме гранул и таблеток 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. 39) и таблеток (табл. 40), Лаксубтила в форме суспензии (табл. 41), 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 прироста массы тела. Биоспорин предотвращал заболеваемость телят инфекционными энтеритами в 70 – 80% случаях.

Таблица 39

**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	–	–	–	5
Пало, гол.	3	–	–	–	5
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	75

Таблица 41

**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	4
Пало, гол.	1	–	–	–	2
Среднесуточный прирост, г	125	130	130	135	120
Стоимость 1 дозы препарата, сомони	0,28	0,42	0,56	0,70	0,80
Затраты на профилактику, сомони	56	84	112	140	160
Профилактическая эффективность, %	85	95	95	95	80

**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	–	–	–	6
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	70

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).

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%.

**6.1.2. Производственная проверка профилактической эффективности пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил**

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. 43 – 45).

Таблица 43

**Профилактическая эффективность  
Субтилбена в форме гранул в производственных условиях\***

Показатель	Группа животных	
	опытная	контроль (Биоспорин)
Количество телят, гол.	40	40
Заболело, гол.	2 (5,0)	5 (12,5)
Пало, гол.	0	2 (5,0)
Стоимость 1 дозы препарата, сомони	0,39	0,80
Затраты на профилактику, сомони	156,0	320,0
Профилактическая эффективность, %	95,0	87,5

*Примечание.* В скобках указано процентное значение.

Таблица 44

**Производственные испытания  
профилактической эффективности Субтилбена в форме таблеток**

Показатель	Группа животных	
	опытная	контроль (Биоспорин)
Количество телят, гол.	35	35
Заболело, гол.	3 (8,6)	8 (22,9)
Пало, гол.	0	3 (8,6)
Стоимость 1 дозы препарата, сомони	0,42	0,80
Затраты на профилактику, сомони	147,0	280,0
Профилактическая эффективность, %	91,4	77,1

*Примечание.* В скобках указано процентное значение.

**Профилактическая эффективность  
Лаксубтила в форме суспензии в производственных условиях**

Показатель	Группа животных	
	опытная	контроль (Биоспорин)
Количество телят, гол.	100	86
Заболело, гол.	3 (3,0)	10 (11,6)
Пало, гол.	0	1 (1,2)
Стоимость 1 дозы препарата, сомони	0,24	0,80
Затраты на профилактику, сомони	240,0	688,0
Профилактическая эффективность, %	97,0	88,4

*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 77,1 – 88,4%.

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

### 6.2.1. Экспериментальное определение лечебной эффективности пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил

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 в возрасте 1 – 6 сут, с клиникой инфекционной диареи, у которых до применения препаратов отмечали угнетение общего состояния, анорексию, учащение пульса и увеличение ин-

тенсивности 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, сохранность поголовья, прирост массы тела.

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.

Экспериментально установлено, что лечебная эффективность пробиотика Субтилбен в форме гранул (табл. 46) и таблеток (табл. 47) в дозе 0,2 г/кг массы тела, составляет соответственно 85,0 и 90,0%. Наиболее эффективным (100,0%) препарат был в дозах 0,3; 0,4 и 0,5 г/кг массы тела. Препарат сравнения Биоспорин, был эффективен в 75,0 и 90,0% случаях.

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.

Таблица 46

**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	20	20	20	15
Пало, гол.	3	–	–	–	5
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	100	100	100	75

Таблица 47

**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	20	20	20	18
Пало, гол.	2	–	–	–	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	100	100	100	90

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. 48).

**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.

### 6.2.2. Производственные испытания Субтилбена и Лаксубтила

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.

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

Применение пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил 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% случаях (табл. 49 – 51).

Таблица 49

**Лечебная эффективность Субтилбена в форме гранул при инфекционных энтеритах телят, в производственных условиях**

Показатель	№ опыта				Контроль (Биоспорин)
	1	2	3	4	
Кол-во больных телят, гол.	86	120	116	140	80
Выздоровело, гол.	80	110	110	126	64
Пало, гол.	6	10	6	14	16
Кол-во телят с повторными заболеваниями, гол.	-		2		10
Продолжительность терапии, сут	4-5	5-6	4-5	5-6	6-7
Терапевтическая эффективность, %	93	91,7	94,8	90	80

Таблица 50

**Терапевтическая эффективность Субтилбена в форме таблеток при инфекционных энтеритах телят, в производственных условиях**

Показатель	№ опыта				Контроль (Биоспорин)
	1	2	3	4	
Кол-во больных телят, гол.	120	86	110	115	96
Выздоровело, гол.	110	80	102	105	80
Пало, гол.	10	6	8	10	16
Кол-во телят с повторными заболеваниями, гол.	2	-	-	-	
Продолжительность терапии, сут	4-5	5-6	4-5	5-6	6-7
Терапевтическая эффективность, %	91,7	93	92,7	91,3	83,3

**Лечебная эффективность Лаксубтил в форме суспензии  
при инфекционных энтеритах телят, в производственных условиях**

Показатель	№ опыта				Контроль (Биосорин)
	1	2	3	4	
<b>Кол-во больных телят, гол.</b>	65	54	33	28	60
<b>Выздоровело, гол.</b>	60	50	30	26	50
<b>Пало, гол.</b>	5	4	3	2	10
<b>Кол-во телят с повторными заболеваниями, гол.</b>					5
<b>Продолжительность терапии, сут</b>	4-5	4-5	4-5	5-6	6-7
<b>Терапевтическая эффективность, %</b>	92,3	92,6	90,9	92,9	83,3

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.

### **6.3. Экономическая эффективность пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил при инфекционных энтеритах телят**

При оценке эффективности лечебно-профилактических мероприятий учитывали экономический ущерб, затраты на проведение ветеринарных мероприятий, коэффициенты заболеваемости и смертности животных при отдельных болезнях, суммарный экономический эффект, экономическую эффективность ветеринарных мероприятий на единицу затрат и суммарный индекс. Увеличение показателя суммарного индекса свидетельствует о снижении экономической эффективности, анализируемых способов терапии и профилактики больных животных.

Расчет и анализ экономической эффективности применения Субтилбена в форме гранул и таблеток и Лаксубтила в форме суспензии, проведе-

ны в хозяйствах благополучных, скомпрометированных и неблагополучных, по инфекционным энтеритам телят.

Субтилбен и Лаксубтил превосходят препарат-аналог Биоспорин, в большинстве случаев, по затратам на лечение, предотвращенному экономическому ущербу и экономическому эффекту в сомони, полученному в результате терапии.

В расчете, на 1 сомони затрат, экономическая эффективность Субтилбена в форме гранул и таблеток и Лаксубтила в форме суспензии, при лечении инфекционных энтеритов телят, составила соответственно 1,7 сомони, что больше соответственно в 2 раза, чем соответствующий показатель у Биоспорина.

При профилактике инфекционных энтеритов телят Субтилбен в форме гранул и таблеток и Лаксубтил в форме суспензии, по суммарному индексу, соответственно в 2 раза эффективнее известного препарата Биоспорин.

Таким образом, Субтилбен и Лаксубтил обладают высокой экономической эффективностью, при лечении и профилактике инфекционных энтеритов телят.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Инфекционные энтериты молодняка крупного рогатого скота широко распространены в животноводческих хозяйствах и наносят большой экономический ущерб. Эти болезни сдерживают развитие отрасли, служат одной из причин снижения продуктивности и племенных качеств животных, высокого процента вынужденного убоя и падежа, больших затрат на профилактику и лечение. Летальность и вынужденный убой больных инфекционным энтеритом животных составляет от 5 до 70% [1, 132, 360, 472].

Летальность телят от инфекционных энтеритов в хозяйствах зависит от уровня ведения животноводства и качества ветеринарного обслуживания. Отмечено, что в США гибель больных новорожденных телят достигает 6,6%, в странах ЕЭС – 12% и в странах Африки – 23,6% [47, 66, 75, 84, 167, 171, 460].

Нашими исследованиями установлено, что на молочно-товарных фермах 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.

В 97 (76,3%) пробах выделены моновозбудители, 30 (23,7%) – ассоциации патогенов. В 59,8% (76) случаев возбудителем инфекционного энтерита была *E. coli*, в 10,2 (13) – *Pr. vulgaris*, 6,3% (8) – *S. dublin*, 14,2% (18)

– ассоциации *E. coli* и *Pr. vulgaris*, 5,5% (7) – ассоциации *E. coli* и *S. dublin*, 4,0% (5) – ассоциации *E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris*.

Результаты 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. uberus*, *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. uberus*, 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. multocida* – 1,8% случаев).

Результаты наших исследований согласуются с исследованиям ряда авторов [107, 112, 142, 460].

Таким образом, инфекционные энтериты молодняка КРС вызываются бактериальной флорой, которая циркулирует в хозяйствах и выделяется

от коров, больных эндометритами, маститами и клинически здоровых коров-бактерионосителей. 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.

Многочисленные исследования по разработке биопрепаратов и дальнейшее изучения механизма их действия дают основание утверждать, что в XXI веке пробиотики в значительной степени потеснят на рынке традиционные и небезопасные для организма химиотерапевтические препараты.

Первые сообщения о пробиотиках были сделаны в 1954 г. [480] и, в последующем, под термином пробиотики предложили понимать «живые микроорганизмы, усиливающие рост других микроорганизмов» [444]; «живые микроорганизмы и продукты их ферментации, проявляющие антагонистическую активность в отношении патогенной микрофлоры» [292]; «полезные микроорганизмы» [466]; «живые кормовые добавки» [313]; «промотр жизни» [218, 237]; «микробиологические пищевые добавки, благотворно влияющие на организм путем улучшения микробиоценоза кишечника» [430].

По мнению Б.А. Шендерова (378), пробиотики – это препараты и продукты питания, в состав которых входят вещества микробного и немикробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения благоприятные эффекты на физиологические функции и биохимические реакции организма. В соответствии с этим определением, любые живые и убитые микроорганизмы, их структурные компоненты, метаболиты, а также вещества другого происхождения, оказывающие позитивное влияние на микрофлору и организм, способствующие лучшей адаптации его к окружающей среде, могут рассматриваться как пробиотики [49].

Исходя из данных литературы и наших исследований, можно заключить, что пробиотики это живые микроорганизмы, которые с помощью

биологически активных веществ непосредственно убивают патогенную и условно-патогенную микрофлору.

В настоящее время, средства, влияющие на микробиоценоз организма, условно разделяют на пробиотики, пребиотики, синбиотики, симбиотики и футпробиотики.

Нами, для изготовления пробиотиков, были изучены более 40 штаммов *Bac. subtilis* и из 9, наиболее активных, отобраны наиболее перспективные штаммы: BSTJ 09, BSTJ Д 24 и BSTJ Д 26.

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.

В настоящее время, для производства пробиотиков используют бактерии рода бациллы, клосторидиум, энтерококки, бифидобактерии, лактобактерии, дрожжи и др. [134, 145, 175, 251, 332]. Отобранные культуры должны быть нормальными обитателями кишечного тракта здоровых животных, непатогенными, нетоксичными, активными, адгезивными и стабильными к внешним факторам [221, 222, 337, 339].

Наши исследования по отбору производственных штаммов, для изготовления пробиотиков, подтверждают данные вышеуказанных исследователей.

В последние годы, разработаны [24, 80, 169, 242, 343] критерии отбора микроорганизмов для пробиотиков: безопасность; устойчивость к ферментам; жизнеспособность в кислой среде; устойчивость к желчи, к со-

соку поджелудочной железы; адгезивная активность и колонизационная резистентность, бактерицидность, иммуностимулирующая активность, технологичность при производстве, жизнеспособность в готовом препарате при хранении.

К указанным критериям следует отнести и культуральные свойства бактерий на простых питательных средах.

Известен способ получения биопрепарата из бактерий рода *Bacillus subtilis*, включающий засев питательной среды маточной культурой, культивирование в жидкой питательной среде, содержащей минеральные соли, пептон, углеводы и отделение целевого продукта, состоящего из культуральной жидкости со споровой биомассой, на 14 сутки инкубации. Препарат используется в жидкой форме.

Недостатками указанного способа являются:

- длительность культивирования – 14 суток,
- низкий выход биомассы – 1,6 – 3 млрд живых клеток в форме спор в 1 мл;
- недостаточно длительный срок хранения – 4 месяца;

Для получения биопрепарата из бактерий рода *Bacillus subtilis* известен способ, включающий засев питательной среды маточной культурой, жидкостное культивирование (12 – 16ч.) в среде, содержащей минеральные соли, пептон, углеводы и отделение целевого продукта, содержащего культуральную жидкость со споровой биомассой. Полученная культуральная жидкость содержит 24 – 26 млрд м.к. в мл (70 – 100% спор). К полученной биомассе добавляют стабилизатор биомассы (гуми – 0,5 – 2% или сульфит натрия – 2 – 6%), что обеспечивает сохранение количества живых колониеобразующих клеток в течение 6 – 8 месяцев. Культуральную жидкость, содержащую споровую биомассу штамма *Bacillus subtilis* 26Д и стабилизатор биомассы используют в качестве бактериального препарата фитоспорин в жидкой форме [197, 178, 359].

Недостатками указанного способа являются:

- низкий выход биомассы – 24 – 26 млрд живых клеток в форме спор  
1 мл;

- недостаточно длительный срок хранения: в течение 6 – 8 месяцев;

Применяется способ получения препарата из штамма *Bacillus subtilis* 26Д, включающий засев питательной среды маточной культурой, жидкостное культивирование в среде, содержащей минеральные соли, пептон, углеводы и отделение целевого продукта, содержащего культуральную жидкость со споровой биомассой (24 – 26 млрд м.к./мл). Препарат содержит лиофильно высушенные живые клетки и споры *Bacillus subtilis* и наполнитель (бельово-сахароза-желатиновую смесь).

Препарат выпускают во флаконах и ампулах.

Недостатками способа являются:

- необходимость приобретения и обслуживания дорогостоящих и энергоемких аппаратов для сушки биомассы лиофильным способом;

- неудобства использования флаконов и ампул с препаратом, при приготовлении больших его объемов, для обработки семен хлопчатника и других культур, а также массовых обработок животных;

- препарат не содержит минеральных и растительных адсорбентов в качестве наполнителя, способствующих сохранению жизнедеятельности бактерий в неблагоприятных условиях среды и усиливающих его антимикробную активность.

Нами отработан способ получения препарата из бактерий рода *Bacillus* с высоким выходом биомассы, в форме порошка, без использования лиофильной сушки, менее дорогостоящего, технологически удобного для применения.

Поставленная цель была достигнута путем выращивания *Bac. subtilis* на питательной среде, состоящая из 0,25% пептона, 0,25% картофельного крахмала, 0,12 глюкозы 0,01% хлорида натрия и 10% бентонита и пектина. При этом, морфологические, физиологические и биологические свойства

трех штаммов *Bac. subtilis* не изменились. Концентрация микробных клеток в 1 мл достигала более 30 млрд м.к./мл.

Результаты исследования влияния технологического цикла производства пробиотика Субтилбен в формах порошка, гранул и таблеток показали, что разработанные технологические стадии состоят из:

1. В форме порошка: получения первичных культур производственных штаммов; получения матричных культур производственных штаммов; изготовления бактериальной массы методом глубинного культивирования (I стадия); приготовления бентонито-пектиновой смеси; приготовления гомогената бентонито-пектиновой смеси и бактериальной массы производственных штаммов *Bac. subtilis*; II стадии культивирования бактериальной массы; сушки производственной серии биомассы; измельчения высушенной производственной серии биомассы; выдержки на складе временного хранения до получения заключения контролера ОТК; этикетировки и укладки в индивидуальную упаковку; укладки в групповую упаковку и этикетировки; хранения на складе готовой продукции.

2. В форме гранул: подготовки оборудования, помещения, инвентаря, спецодежды; растаривания сырья; отвешивание сырья; загрузки сырья в смеситель; влажного гранулирования; сушки гранулята; сухого гранулирования; опудривания; выдержки на СВХ; этикетировки и укладки в индивидуальную упаковку; укладки в групповую упаковку и этикетировки; хранения на складе готовой продукции.

3. В форме таблеток: подготовки оборудования, помещения, инвентаря, спецодежды; растаривания сырья; отвешивания сырья; загрузки сырья в смеситель; влажного гранулирования; сушки гранулята; сухого гранулирования; опудривания; таблетирования; выдержки на СВХ; этикетировки и укладки в индивидуальную упаковку; укладки в групповую упаковку и этикетировки; хранения на складе готовой продукции.

Разработанные технологические стадии не влияли на физико-химические и биологические свойства пробиотиков Субтилбен и Лаксуб-

тил. Таким образом, результаты наших исследований подтверждают технологичность отобранных штаммов для производства пробиотиков [39, 44, 69, 135, 224, 233, 263, 272, 280, 300, 304, 343, 373].

Полученные результаты вошли в инструкцию по изготовлению и методов контроля, технические условия препарата Субтилбен.

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. *Bac. subtilis* – 30 млрд/г.
7. Количество жизнеспособных клеток *Bac. 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, гранула и таблеток на основе штаммов *Bac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26.

Изучение стабильности Субтилбена в форме порошка, гранул и таблеток 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.

Воспроизводимость и точность разработанных качественных и количественных методов контроля препарата подтверждены результатами исследований, 5 экспериментальных серий Субтилбена в форме таблеток, обеспечивают, 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 (*E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris*) возбудителей 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.

При хранении физико-химические и биологические свойства препарата оставались стабильными в течение 36 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 проведен-

ных исследований, установлен срок хранения в течение 2 год.

Полученные нами результаты указывают на воспроизводимость технологии и точность разработанных методов контроля свойств пробиотика Субтилбен, что подтверждает технологичность и воспроизводимость стадий производства, указанных в требованиях к пробиотикам.

Известны препараты, изготовленные на основе *Bac. species* – бактисубтил, *Bac. subtilis* и *Bac. licheniformis* – биоспорин, содержащие живые бактерии и наполнитель, высушенные лиофильным способом, расфасованные во флаконы или ампулы.

Недостатками этих препаратов являются: отсутствие в их составе минеральных и растительных адсорбентов, способствующих сохранению жизнедеятельности бактерий в неблагоприятных условиях внешней среды и усиливающих их антимикробную активность; слабая бактерицидная активность препарата, при смешанных инфекциях желудочно-кишечного тракта.

Известен биопрепарат Бактерин-sl, содержащий живые микробные клетки и споры *Bacillus* и наполнитель – белково-сахарозо-желатиновую смесь. Бактерин-sl высушен лиофильным способом и расфасован во флаконы или ампулы. Препарат применяют как средство для лечения и профилактики желудочно-кишечных болезней животных. Однако препарат имеет ряд недостатков:

- микробная культура, входящая в состав Бактерин-sl, характеризуется невысокой ингибирующей активностью, по отношению к возбудителям желудочно-кишечных болезней животных, как в отдельности, так и в ассоциации; не содержит минеральных и растительных адсорбентов в качестве наполнителя, повышающих бактерицидную активность *Bac. subtilis* и способствующих локальной адсорбции бактериальных токсинов.

Мы, для улучшения биологических свойств и лечебно-профилактической активности, биомассу штаммов *Bac. subtilis* адсорбировали на бентонито-пектиновой смеси.

Спектр и выраженность лечебно-профилактической эффективности конкретного пробиотика обуславливает совокупность свойств, реализованных в фенотипе бактерий-продуцентов [38, 60, 91, 214, 216, 377].

В настоящее время, для штаммов пробиотиков определены [86, 161, 245] следующие требования: жизнеспособность, адгезивность в кишечнике, кислотоустойчивость, устойчивость к желчи, видоспецифичность, бактерицидность.

Исходя из вышеизложенного, результаты наших исследований показывают, что штаммы BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 соответствуют требованиям, предъявляемым к штаммам пробиотиков.

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

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).

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), без кровоизлияний и дистрофических изменений.

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

При исследовании раздражающего свойства пробиотиков Субтилбен в форме гранул и таблеток, Лаксубтил в форме суспензии, методами аппликации на кожу и инстилляций на слизистую оболочку глаза, установлено, что кожа лабораторных животных на месте нанесения препаратов оставалась гладкой, эластичной, неутолщенной, безболезненной и без признаков гиперемии, не наблюдали 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 сенсibilизации организма.

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.

Результаты проведенных нами исследований подтверждают данные ряда исследователей [467].

Образование антибактериальных веществ, конкуренция за питатель-

ные вещества и место адгезии, изменение микробного метаболизма, стимуляция иммунитета являются наиболее важными аспектами взаимодействия пробиотических штаммов с микрофлорой кишечника и организмом животного [338]. Антибактериальная активность *Bac. subtilis* проявляется за счет полиеновых антибиотиков – бацитрацины, лихениформины и др. [143, 222, 338].

Нашими исследованиями установлено, что бактерицидное действие штаммов *Bac. subtilis* начиналось спустя 6 часов, после контакта с патогенами, и заканчивалось полным лизисом их к 48 часам. Проведенные нами исследования, подтверждают данные исследователей о бактерицидной активности биологических активных веществ полезной микрофлоры [218, 236].

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

Профилактические мероприятия, проводившиеся по схемам, принятым в хозяйствах с применением пробиотика Биоспорин, предотвращали инфекционные энтериты телят в 77,1 – 88,4%.

Экспериментально установлено, что лечебная эффективность пробиотика Субтилбен в форме гранул и таблеток в дозе 0,2 г/кг массы тела, составляет, соответственно 85,0 и 90,0%. Наиболее эффективным (100,0%) препарат был в дозах 0,3; 0,4 и 0,5 г/кг массы тела. Известный препарат Биоспорин был эффективен в 75,0 и 90,0% случаев.

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 – 6,2 дня.

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.

Результаты наших исследований согласуются с данными ряда авторов [8, 27, 87, 98, 100, 135, 178, 203, 239, 246, 288, 328, 330].

На основании полученных результатов было установлено, что экономическая эффективность пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил, в расчете на один сомони затрат, при профилактике и лечении инфекционных энтеритов телят, составила 4,8 сомони, что в 1,5 раза больше, чем соответствующий показатель препарата-аналога.

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что полная безвредность, экономичность и высокая активность пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил при инфекционных энтеритах позволяют широко внедрить их в производство.

## 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 *Bac. 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 *Bac. subtilis*, состоящая из 0,25% пептона, 0,25% картофельного крахмала, 0,125% глюкозы, 0,01% хлорида натрия и 10% бентонита.

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

5. Разработанный пробиотик Субтилбен на основе штаммов *Bac. subtilis* BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26, обладает высоким антибактериальным действием: 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 *Bac. subtilis* BS TJ 09 и BS TJ Д 26, в отношении *E. coli*, *S. dublin* и *Pr. vulgaris*, проявлял высокую бактериостатическую (75 – 150 мкл/мл) и бактерицидную активность (150 – 300 мкл/мл).

7. Показано, что бактерицидная активность пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил, в отношении моновозбудителей, проявлялась в концентрациях, соответственно 0,6 – 1,2 мг/мл и 150 – 300 мкл/мл, тогда как в отноше-

нии ассоциаций возбудителей инфекционных энтеритов телят – 2,4 мг/мл и 600 мкл/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% стилохоний остаются активными.

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

11. Наилучший профилактический эффект достигается при однократном пероральном применении пробиотиков Субтилбен и Лаксубтил в дозах соответственно 0,3 г/кг и 5 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, 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 сомони, 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 профилактике и ликвидации ротавирусной инфекции телят (утв. СГВН МСХ РТ, 2009 г.);
7. Инструкция о мероприятиях по борьбе с сальмонеллезом новорожденных животных (утв. СГВН МСХ РТ, 2009 г.);
8. Научно-обоснованная система получения здорового молодняка и профилактике желудочно-кишечных болезней новорожденных телят (утв. СГВН МСХ РТ, 11.09.2012 г.);
9. Рекомендации по применению пробиотиков для профилактики и лечения пневмоэнтеритов телят (утв. СГВН МСХ РТ, 11.09.2012 г.);
10. Инструкция по изготовлению и контролю пробиотического препарата Лаксубтил (утв. СГВН МСХ РТ 11.09.2012 г.);
11. Технические условия на пробиотик Лаксубтил (утв. СГВН МСХ РТ 11.09.2012 г.);
12. Наставление по применению пробиотика Лаксубтил (утв. СГВН МСХ РТ 11.09.2012 г.).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллин Х.Х. К вопросу этиологии и диагностики желудочно-кишечных болезней телят / Х.Х. Абдуллин // Ветеринария. – 1978. – №1. – С. 83 – 84.
2. Абрамов С.С. Методические указания по определению естественной резистентности и путях ее повышения у молодняка сельскохозяйственных животных: метод. указания / авт.-сост. С.С. Абрамов, А.Ф. Могиленко, А.И. Ятусевич; Витебский вет. ин-т. – Витебск, 1989. – С. 16 – 20.
3. Абрамов С.С. Профилактика незаразных болезней молодняка / С.С. Абрамов, И.Г. Арестов, И.М. Карпуть. – М., 1990. – С. 24 – 56.
4. Абрамов С.С. Физические и лекарственные методы профилактики и лечения бронхопневмонии у телят путем воздействия на естественную резистентность организма: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.01 / С.С. Абрамов; Казанский вет. ин-т. – Казань, 1984. – 38 с.
5. Абрамян Э.Г. Иммунологические и биохимические показатели молозива коров / Э.Г. Абрамян, С.М. Левонян, А.А. Костанян // Ветеринария. – 1985. – №9. – С. 45 – 46.
6. Авакьянц Б.М. Опыт лечения и профилактики энтерита телят / Б.М. Авакьянц // Ветеринария. – 1997. – №9. – С. 34 – 36.
7. Аксенов А.М. Задачи ветеринарной медицины в стабильном развитии животноводства республики / А.М. Аксенов // Современные вопросы патологии сельскохозяйственных животных: матер. Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 23 – 24 окт. 2003 г. / БелНИИЭВ им. С.Н. Вышелеского; редкол.: Н.Н. Андросик [и др.]. – Минск, 2003. – С. 3 – 5.
8. Алексин М.М. Сравнительная профилактическая эффективность энтеробифидина и лактобактерина при диспепсии у новорожденных телят: автореф. дис. ... канд. вет. наук / М.М. Алексин. – Витебск. – 1996. – 19 с.
9. Алиев И.М. Влияние добавок в корме биомассы слизистых бацилл на рост и развитие цыплят / И.М. Алиев // Клинико-биохимические исследе-

дования, профилактика и лечение незаразных болезней животных: сб. науч. тр. – Омск, 1998. – С. 38 – 39.

10. Аликаев В.А. Болезни дыхательной системы // Внутренние незаразные болезни сельскохозяйственных животных / В.А. Аликаев, И.Г. Шарабрин, Л.Г. Замарин. – 6-е изд., испр. и доп. – М.: Агропромиздат, 1986. – С. 441 – 447.

11. Аликаев В.А. Борьба с расстройством пищеварения у новорожденных телят / В.А. Аликаев, В.В. Митюшин // Ветеринария. – 1987. – №2. – С. 53 – 55.

12. Аликаев В.А. Основные направления совершенствования мер борьбы и профилактики болезней молодняка / В.А. Аликаев // Профил. болез. молодн. на животноводч. компл.: тез. докл. Всесоюз. науч.-произв. конф. – Воронеж, 1981. – С. 13 – 14.

13. Аликаев В.А. Причинно-следственные факторы при острых расстройствах пищеварения у новорожденных телят / В.А. Аликаев, В.В. Митюшин // Профил. болез. мол. на животноводч. компл.: тез. докл. Всесоюз. науч.-практ. конф. – Воронеж, 1981. – С. 16.

14. Аликин Ю.С. Ветеринарные препараты на основе БАБ – новый класс эффективных препаратов / Ю.С. Аликин, В.И. Масычева, В.П. Клименко // Новые фармакологические средства ветеринарии: матер. докл. 8-й Межгос. межвуз. науч.-практ. конф. – СПб., 1996. – С. 37 – 38.

15. Аликин Ю.С. Перспективы разработки и применения препаратов нового поколения БАБ в качестве лечебных и профилактических средств при болезнях молодняка / Ю.С. Аликин, В.И. Масычева // Актуальные вопросы ветеринарии: тез. докл. 1-й науч.-практ. конф. фак. вет. мед. НГАУ. – Новосибирск, 1997. – С. 11 – 12.

16. Аликин Ю.С. Стимуляторы неспецифической резистентности на основе РНК для ветеринарной медицины: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 16.00.01 / Ю.С. Аликин; НГАУ. – Новосибирск, 1998. – 39 с.

17. Алтухов Ю.П. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова // Генетика. – 2002. – Т. 38, №9. – С. 1173 – 1195.
18. Андреева Н.Л. Ростостимулирующие свойства тимогена / Н.Л. Андреева // Сб. науч. тр. Ленингр. вет. ин-та. – Л., 1990. – №106. – С. 71 – 73.
19. Андросик Н.Н. Лечебно-профилактические мероприятия при инфекционных энтеритах новорожденных телят / Н.Н. Андросик, Ю.Г. Зелютков // Наука – производству: тез. науч.-практ. конф., посвящ. 45-летию Гродненского ГСХИ, Гродно, 28 – 29 июня 1996 г. / Гродненский гос. с.-х. ин-т. – Гродно, 1996. – С. 169.
20. Андросик Н.Н. Профилактика пастереллеза сельскохозяйственных животных на современном этапе / Н.Н. Андросик, Ю.Г. Лях // Изв. Академии аграрных наук Республики Беларусь. – 2000. – №4. – С. 62 – 64.
21. Антагонистические свойства бифидобактерий, выделенных от поросят / И.Ю. Вершинина [и др.] // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – 1994. – Т. 55. – С. 143 – 146.
22. Антипенко В.П. Чувствительность к антибиотикам энтеробактерий, выделенных от больных хроническими бронхитами и пневмониями / В.П. Антипенко, А.П. Красильников // Антибиотики. – 1982. – №6. – С. 450 – 455.
23. Антипов В.А. Биологические препараты симбионтных микроорганизмов и их применение в ветеринарии / В.А. Антипов // Сельское хозяйство за рубежом. – 1981. – №2. – С. 43 – 47.
24. Антипов В.А. Использование пробиотиков в животноводстве / В.А. Антипов // Ветеринария. – 1991. – №1. – С. 55 – 58.
25. Антипов В.А. Новые отечественные ветеринарные препараты / В.А. Антипов // Итоги и перспективы науч. исслед. по пробл. патол. и разраб. средств и методов терапии и профил.: матер. координац. совещ. / ВНИВИПФТ. – Воронеж, 1995. – С. 22 – 24.

26. Антипов В.А. Отечественные пробиотики для животноводства / В.А. Антипов, Г.Н. Мартынов // Биологические основы высокой продуктивности сельскохозяйственных животных. – М., 1990. – Т. 2. – С. 109 – 110.
27. Антипов В.А. Профилактическая эффективность пробиотика / Антипов В.А., Ермакова Т.И. // Профил. и меры борьбы с болез. молодн. с.-х. жив. – Минск, 1990. – С. 80.
28. Антипов В.А. Чувствительность энтеробактерий к антибиотикам / А.В. Антипов // Эпидемиол. и профил. кишечных инфекций. – Таллинн, 1978. – С. 346.
29. Антипов В.А. Эффективность и перспективы применения пробиотиков / В.А. Антипов, В.М. Субботин // Ветеринария. – 1980. – №12. – С. 56 – 57.
30. Антонов В.С. Динамика классов иммуноглобулинов и других сывороточных белков у крупного рогатого скота в онтогенезе / В.С. Антонов, Н.В. Клемина, С.А. Михайлова // Проблемы ветеринарной иммунологии. – М.: Агропромиздат, 1985. – С. 49 – 50.
31. Ардаматский, Н.А. К проблеме этиологии и патогенеза острых пневмоний / Н.А. Ардаматский, О.П. Решетникова // Терапевтический архив. – 1982. – №4. – С. 10 – 12.
32. Аркадьева З.А. Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства микроорганизмов при различных методах хранения / З.А. Аркадьева // Биологические науки. – 1993. – №4. – С. 93 – 104.
33. Архангельский И.И. Заразные болезни телят / Архангельский И.И., Баданин Н.В. – М.: Сельхозгиз, 1960. – 214 с.
34. Афанасьев Л.А. Колибактериоз телят: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.03 / Л.А. Афанасьев. – М., 1990. – 37 с.
35. Ахмедова Ш.И. Новое в бактериологии колибактериоза телят и ягнят / Ш.И. Ахмедова, М.Р. Агдами // Ветеринария. – 1963. – №2. – С. 56 – 58.

36. Бабина М.П. Профилактика возрастных иммунодефицитов и гастроэнтеритов у цыплят-бройлеров: автореф. дис. ... канд. с-х. наук / М.П. Бабина. – Витебск, 1996. – 16 с.

37. Баева Е.В. Функции иммунной системы при стрессовых воздействиях в раннем постнатальном онтогенезе: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 16.00.03 / Е.В. Баева; НИИ экспериментальной медицины. – Ленинград, 1991. – 34 с.

38. Бактериальные препараты при лечении и профилактике желудочно-кишечных заболеваний у телят / Г.А. Ноздрин [и др.] // Актуал. вопр. вет. – Новосибирск, 1997. – С. 18 – 19.

39. Бакулина Л.Ф. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Vacillus* и их использование в ветеринарии / Л.Ф. Бакулина, И.В. Тимофеев, Н.Г. Перминова // Биотехнология. – 2001. – №2. – С. 48 – 56.

40. Бачманов А.А. Аномальное поведение у телят при выпаивании молока из ведер / А.А. Бачманов // Ветеринария. – №10. – С. 58 – 59.

41. Башкиров О.Г. Пробиотик Биоплюс 2Б – многогранная защита организма животных и разностороннее решение проблем в животноводстве / О.Г. Башкиров // Зооиндустрия. – 2001. – №4. – С. 35 – 37.

42. Белов А.Д. Изучение коррекционного воздействия лактобактерий на биоценоз кишечника, при диареях новорожденных телят / Белов А.Д., Воронин Е.С. – М.: Мир, 1991. – С. 9 – 10.

43. Белова М. Влияние пробиотиков, пребиотика и витамина С на мясную продуктивность и качество мяса цыплят-бройлеров / М. Белова [и др.] // Переработка и качество продукции. – 2007. – №11.

44. Белоусов В.И. Совершенствование технологий промышленного производства ветеринарных биопрепаратов / В.И. Белоусов // Актуальные проблемы ветеринарной медицины в России: сб. науч. тр. – Новосибирск, 1998. – С. 359.

45. Белявская В.А. Пробиотики из рекомбинантных бацилл – новый класс лечебно-профилактических препаратов и способ доставки лекарственных белков в организм / В.А. Белявская // Сб. тр. сотр. НИКТИ БАВ. – Бердск, 1996. – С. 195 – 196.

46. Белянко Л.В. Комплексная система профилактики и лечения вирусно-бактериальных гастроэнтеритов новорожденных телят на фермах промышленного типа / Белянко Л.В. // Вирус. болез. с.-х. жив. – Владимир, 1995. – С. 217.

47. Белянко Л.В. Специфическая профилактика смешанных инфекций желудочно-кишечного тракта новорожденных телят / Л.В. Белянко // Вирус. болез. с.-х. жив. – Владимир, 1995. – С. 218.

48. Беркольд Ю.И. Влияние пробиотических препаратов, на основе *Bacillus subtilis* на физиологические показатели роста цыплят-бройлеров / Ю.И. Беркольд, А.Б. Иванова // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2006. – №4. – С. 45 – 48.

49. Бессарабов Б.Ф. Уровень естественной резистентности птиц при различных кормовых добавках / Б.Ф. Бессарабов, Г.М. Урюпина // Повышение естественной резистентности сельскохозяйственной птицы: сб. науч. тр. / МВА. – М., 1983. – С. 3 – 6.

50. Блинов Н.П. Общие закономерности строения и развития микробов-продуцентов биологически активных веществ / Н.П. Блинов. – Л., 1971. – С. 182 – 184.

51. Бовкун Г.Ф. Роль клебсиелл в патологии животных / Г.Ф. Бовкун // Ветеринария. – 1986. – №8. – С. 70 – 71.

52. Болезни крупного рогатого скота и свиней / Красочко П.А. [и др.]; под ред. П.А. Красочко. – Минск: Технопринт, 2003. – 464 с.

53. Бондаренко В.М. Дисбиоз – современные возможности профилактики и лечения / Бондаренко В.М. – М., 1995. – С. 5 – 10.

54. Бондаренко В.М. Микроэлементы и инфекция / В.М. Бондаренко, В.Ф. Чубуков // Микробиология, эпидемиология и иммунобиология. – 1987. – №11. – С. 118 – 125.

55. Бондаренко В.М. О совершенствовании пробиотических препаратов / В.М. Бондаренко // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты: науч.-практ. журн. Междунар. конгр. – 2007. – №1 – 2. – С. 24.

56. Бондаренко В.М. Ранние этапы развития инфекционного процесса и двойственная роль нормальной микрофлоры / В.М. Бондаренко, В.Т. Петровская // Вестн. РАМН. – 1997. – №3. – С. 7 – 10.

57. Бочкарев В.Н. Приобретенные иммунодефицитные состояния у КРС в зоне экологического неблагополучия / В.Н. Бочкарев, В.И. Иванов, И.И. Кузьменко // Ветеринарная патология. – 2003. – №2. – С. 8 – 14.

58. Бояхгян А.Б. Методы применения сравнительной эффективности антибиотиков при токсической диспепсии телят / А.Б. Бояхгян, М.А. Оганесян, В.А. Галоян // Матер. Советско-Югославского симпоз. по применению антибиотиков и др. химиотерапевтич. препаратов в вет. – М., 1969. – С. 21 – 23.

59. Буланкин А.Л. Новое средство для лечения диспепсии у телят / А.Л. Буланкин, В.И. Родионов, А.П. Радуль // Тр. Кубан. гос. аграр. ун-та. – 1995. – Вып. 349. – С. 61 – 63.

60. Буланкин А.Л. Препарат фурбапласт при желудочно-кишечных заболеваниях телят / Буланкин А.Л. // Итоги и перспективы науч. исслед. по пробл. патол. жив и разработ. средств и методов терапии и профил. – Воронеж, 1995. – С. 284 – 285.

61. Буланкин А.Л. Разработка и применение новых лечебных препаратов при эндометритах, маститах коров и желудочно-кишечных заболеваниях телят: дис. в виде науч. докл. ... д-ра вет. наук / Буланкин А.Л. – Краснодар, 1996. – 47 с.

62. Буланкин А.Л. Фурунин при диспепсиях телят / А.Л. Буланкин // Итоги и перспективы науч. исслед. по пробл. патол. жив и разраб. средств и методов терапии и профил. – Воронеж, 1995. – С. 285 – 286.

63. Бурлуцкий И.Д. Профилактика и меры борьбы с болезнями молодняка сельскохозяйственных животных / И.Д. Бурлицкий // Тр. УзНИ-ВИ. – 1986. – Т. 38. – С. 18 – 24.

64. Бурсуков В.В. Профилактика и лечение инфекционных гастроэнтеритов смешанной этиологии у новорожденных телят лактоиммуноглобулиновыми препаратами: автореф. дис. ... канд. вет. наук / В.В. Бурсуков. – М., 1996. – 18 с.

65. Бурталкин Б.В. Профилактика колибактериоза новорожденных телят на фермах Сибири и Забайкалья / Бурталкин Б.В., Игнатьев Р.Р. // Теоретич. и практич. аспекты возникновения и развития болез. жив и защиты их здоровья в соврем. усл.: матер. Междунар. конф., посвящ. 30-летию ВНИВИПФТ. – Воронеж, 2000. – С. 137 – 139.

66. Бутан В.С. Профилактика желудочно-кишечных болезней телят / Бутан В.С. – М., 1990.

67. Быков В.А. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов / Быков В.А., Крылов И.А., Манаков М.Н. – М.: Высшая школа, 1987. – 143 с.

68. Вечеркин А.С. Нерациональное использование антибиотиков в животноводстве / А.С. Вечеркин // Ветеринария. – 2004. – №9. – С. 7 – 9.

69. Власов Н.Г. Разработка энерго-массосберегающих технологий готовых форм порошкообразных лекарственных препаратов / Н.Г. Власов, А.А. Махлай, А.И. Григоренко // Диагностика, лечение и профилактика инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: сб. науч. тр. / ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ. – Екатеринбург, 1999. – С. 37 – 38.

70. Влияние лактобактерий, перспективных для создания новых пробиотиков, на неспецифическую резистентность организма / Е.Н. Плохушко [и др.] // Здравоохранение Урала. – Пермь, 2002. – №2. – С. 13 – 14.

71. Влияние препарата Стрептобифида-форте на восстановление микрофлоры кишечника при экспериментальном дисбактериозе у белых мышей / А.Н. Панин [и др.] // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – М., 1996. – Т. 56. – С. 3 – 8.

72. Волкова О.И. Повышение резистентности и адаптации у телят витаминными препаратами / Волкова О.И. // Сб. науч. тр. Ленингр. вет. ин-та. – 1990. – №106. – С. 20 – 22.

73. Воробьев А.А., Абрамов Н.А., Бондаренко В.М., Шендеров Б.А. Дис-бактериозы актуальная проблема медицины //Тез. Докладов конф. «Дисбактериозы и эубиотики». М., 26-28 марта 1996.

74. Воронин Е.С. Влияние Т-активина на иммунологический статус телят / Е.С. Воронин, В.Н. Денисенко, Г.Н. Печникова // Ветеринария. – 1990. – №5. – С. 54 – 55.

75. Воронин Е.С. Этиология и профилактика желудочно-кишечных заболеваний телят / Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, Л.Я. Ставцева // Вестн. с.-х. науки. – 1989. – №9. – С. 105 – 116.

76. Ворошилова Т.Г. Условия содержания молодняка и стрессовые ситуации в телятниках / Т.Г. Ворошилова, Л.К. Семина, Е.А. Маринин // Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных: матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения профессора Авророва А.А., Воронеж, 22 – 23 июня 2006 г. – Воронеж: Научная книга, 2006. – С. 418 – 420.

77. Вскрытие животных и дифференциальная патоморфологическая диагностика болезней: учебной пособие / Жаков М.С. [и др.]. – Минск: Ураджай, 1998. – 263с.

78. Гаффаров Х.З. Диагностика и специфическая профилактика респираторно-кишечных болезней у телят (Обзор иностр. лит-ры) / Х.З. Гаффаров // Ветеринария. – 1983. – №4. – С. 73 – 76.

79. Герасименко В.В. Пути коррекции питания животных в условиях загрязнения природной среды / Герасименко В.Г. [и др.]; Пилоцерков. с.-х. ин-т. – 1991.

80. Герстман Н.В. Этиология и профилактика острых расстройств пищеварения у новорожденных телят / Н.В. Герстман, О.В. Степанюк, В.П. Постой // Профил. и меры борьбы с болез. молодн. с.-х. жив. – Минск, 1990. – С. 3.

81. Герчаков Л.Н. Взаимодействие антибактериальных средств / Л.Н. Герчаков // Антибиотики. – 1980. – №6. – С. 468 – 474.

82. Гершкович Л.И. Применение осарсола для лечения колибактериоза телят / Л.И. Гершкович // Ветеринария. – 1966. – №1. – С. 55.

83. Глюкасол – лечебно-профилактическое средство при диареях телят и поросят / А.И. Беспалов [и др.] // Ветеринария. – 1995. – №2. – С. 46 – 48.

84. Гнатенко Г.В. Профилактика и терапия смешанной инфекции желудочно-кишечного тракта телят / Г.В. Гнатенко, М.Д. Бакуменко, В.А. Ушкалов // Профил. и меры борьбы с болез. молодн. с.-х. жив. – Минск, 1990. – С. 7 – 8.

85. Горбунов А.П. О причинах заболеваемости новорожденных телят / А.П. Горбунов, З.Н. Морогина, Н.В. Попова // Вет. консультант. – 2003. – №15. – С. 19.

86. Горлов И.Ф. Новый препарат НФТ при желудочно-кишечных заболеваниях новорожденных телят / И.Ф. Горлов // Технол. произв. и перераб. продукции животновод. – Волгоград, 1996 – С. 123 – 125.

87. Гришков В.А. Использование иммуномодуляторов для профилактики желудочно-кишечных заболеваний у телят / В.А. Гришков, А.П. Харитонов // Наука – пр-ву. – Гродно, 1996 – С. 175.

88. Гутковский А.А. Колибактериоз телят и поросят / Гутковский А.А., Дворкин Г.Л. – Минск: Ураджай, 1989. – 160 с.

89. Данилевская Н.В. Влияние пробиотика лактобифадол на яичную продуктивность и репродуктивные свойства перепелов и кур // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты: матер. Междунар. конгр. – 2007. – №1 – 2. – С. 36 – 37.

90. Девлимаков Х.И. Профилактика колибактериоза новорожденных телят / Х.И. Девлимаков, М.А. Сидоров // Ветеринария. – 1986. – №12. – С. 38 – 39.

91. Девришов Д.А. Биоспорин, как терапевтическое средство против желудочно-кишечных заболеваний поросят / Д.А. Девришов, Г.Н. Печникова, З.М. Бедоева // Новое в диагностике, лечении и профилактике болезней животных: межвуз. сб. науч. тр. – М.: МГАВМиБ, 1996. – С. 15 – 19.

92. Девришев Д.А. Экспериментальные испытания ассоциированной инактивированной вакцины ОКЗ / Девришев Д.А. [и др.] // Ветеринария. – 1998. – №12. – С. 12 – 14.

93. Дорофеев В.И. Применение электроактивированной кислой и щелочной воды, для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний у телят: рекомендации / В.И. Дорофеев // Вестн. ветеринарии. – 1997. – №5 (3/97). – С. 71 – 78.

94. Дроздова Л.И. Морфологические изменения в органах коров в системе “мать – плод” на территории техногенного загрязнения / Л.И. Дроздова, О.В. Виноградова, А.А. Малыгина // Ветеринарная патология. 2003. – №2. – С. 19 – 20.

95. Дрыгина Е.С. Оборудование биотехнологических производств за рубежом / Е.С. Дрыгина, И.Л. Ципенюк // Процессы и аппараты микробиологических производств: сб. науч. тр. – М.: Мир, 1987. – С. 23.

96. Дудников С.А. Неспецифическая иммуностимуляция в профилактике острых расстройств пищеварения новорожденных телят / Дудников С.А. // Профил. и леч. незараз. болезней жив. в спецхозах: сб. науч. тр. – М., 1987.

97. Душкин В.А. Биологические особенности безмикробных животных / В.А. Душкин // Теоретические и практические основы гнотобиологии: сб. науч. тр. – М., 1983. – С. 44 – 45.

98. Егоров И. Эффективность пробиотика Терацид-С / И. Егоров [и др.] // Птицеводство. – 2007. – №6. – С. 56 – 57.

99. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках / Егоров Н.С. – М.: Высш. шк., 1986. – 258 с.

100. Ермолин А.В. Лечебная и профилактическая эффективность линкоспектина при диспепсии у телят / А.В. Ермолин, Д.И. Дегтярев // Актуал. пробл. вет. медицины, животновод., общественознания и подгот. кадров на Юж. Урале. – Челябинск, 1996. – С. 27 – 29.

101. Ефективність застосування Т-активіну та його вплив на імунологічні показники / А.А. Заволока [и др.] // Информ. бюлл. Укр. акад. аграр. наук / Ин-т эксперим. клинич. вет. медицины. – 1994. – С. 126 – 127.

102. Ефимова М.А. Смешанные формы инфекционной диареи новорожденных телят, их профилактика и иммунотерапия: автореф. дис. ... канд. вет. наук / М.А. Ефимова. – Казань, 1999. – 19 с.

103. Жаров А.В. Морфофункциональные изменения органов иммунной системы телят, при экспериментальном энтеробактериозе под влиянием иммуномодуляторов и лактобактерина / А.В. Жаров // Актуал. вопр. инфекц. и инваз. болез. жив. – М., 1994. – С. 82 – 86.

104. Жданов В.М. Эволюция возбудителей инфекционных болезней / Жданов В.М., Львов Д.К.; АМН СССР. – М.: Медицина, 1984. – 272 с.

105. Жданов П.И. Биологические и эпизоотологические аспекты производства и применение нового пробиотика из бактерий рода *Bacillus* в свиноводстве: автореф. дис. ... канд. вет. наук / П.И. Жданов; ПГАВМ. – СПб., 1997. – 21 с.

106. Жданов П.И. Применение споробактерина для повышения сохранности и продуктивности свиней / П.И. Жданов // Ветеринария. – 1994. – №11. – С. 36 – 40.

107. Жирков И.Н. Применение пробиотика РАС для коррекции дисбактериозов у телят / И.Н. Жирков, И.И. Бротухин // Ветеринария. – 1999. – №4. – С. 40 – 42.
108. Жумаев Н.С. Специфическая профилактика колибактериоза телят / Жумаев Н.С., Сатторов И.Т. // Сб. науч. тр. ТаджНИВИ. – Душанбе, 1986. – С. 39 – 43.
109. Запруднов А.М. Микробная флора кишечника и пробиотики / Запруднов А.М., Мазанкова Л.Н. – М., 1999.
110. Зароза В.Т. Желудочно-кишечные болезни телят и меры борьбы с ними / Зароза В.Т. – М., 1985. – С. 62.
111. Зелютков Ю.Г. Ассоциированная ротавирусная и коронавирусная инфекция, осложненная эшерихиозом у новорожденных телят (диагностика, профилактика, лечение): автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.03 / Ю.Г. Зелютков. – Минск, 2006. – 32 с.
112. Зелютков Ю.Г. Лечение инфекционных энтеритов новорожденных телят / Ю.Г. Зелютков, М.М. Гоголев, И.М. Карпуть // Тез. докл. III Всесоюз. конф. по эпизоотол. – Новосибирск, 1991. – С. 281 – 282.
113. Зотова Н.В. Влияние биоспорина и БАВ, продуцируемых бациллами, на показатели иммунитета при экспериментальном дисбактериозе кишечника / Зотова Н.В., Грачев А.Ю., Плохушко Е.Н. // Сб. матер. науч. конф. ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ. – Екатеринбург, 2002.
114. Иванова А.Б. Фармакологическая коррекция неспецифической резистентности и продуктивности цыплят-бройлеров с использованием ветома 3: автореф. дис. ... канд. вет. наук / А.Б. Иванова. – Троицк, 2002. – 18 с.
115. Иванов А.И. Сравнительная эффективность антидизентерийных препаратов / А.И. Иванов // Ветеринария. – 2004. – №8. – С. 8 – 9.
116. Ивановский А.А. Новый пробиотик бактоцеллолакт при различных патологиях у животных / А.А. Ивановский // Ветеринария. – 1996. – №11. – С. 34 – 35.

117. Изучение терапевтической эффективности илотетрина в производственных условиях / М.Е. Ребезов [и др.] // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – 1995 (1996). – Т. 58. – С. 113 – 117.

118. Изучение эффективности новых дезинтоксикационных и иммуностимулирующих препаратов на телятах / В.К. Муравьев [и др.] // Информ. бюлл. Укр. акад. аграр. наук / Ин-т эксперим. клинич. вет. медицины. – 1994. – С. 203.

119. Иммуитет и его коррекция в ветеринарной медицине / Красочко П.А. [и др.]. – Смоленск, 2001. – 324 с.

120. Иммуитет сельскохозяйственных животных / Я.Е. Коляков [и др.]. – М.: Колос, 1973. – С. 217 – 221.

121. Иммуномодуляторы и пробиотики при болезнях молодняка – перспективное направление в ветеринарной медицине / Е.С. Воронин [и др.] // Иммунодефициты с.-х. жив.: тез. докл. Всерос. науч. конф. – М., 1994. – С. 4 – 5.

122. Инамалиев М.И. Иммунопрофилактика колибактериоза телят / М.И. Инамалиев, Е.С. Самойленко, К. Абдыкеримов // Тр. КиргНИВИ. – 1987. – Т. 1. – С. 60 – 64.

123. Иноземцев В.П. Современные задачи ветеринарного контроля за воспроизводством крупного рогатого скота / В.П. Иноземцев, Б.Г. Таллер // Ветеринария. – 1997. – №6. – С. 3 – 7.

124. Исмаилов М.А. Профилактика и лечение диареи телят и поросят биоспорином-В / М.А. Исмаилов // Инфекц. болез. молодн. с.-х. жив.: тез. докл. Всерос. науч. конф. – М., 1996. – С. 57.

125. Исмаилов М.А. Профилактическое и терапевтическое действие биоспорина-В при диареях телят и поросят / М.А. Исмаилов, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева // Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии: сб. науч. тр. – М., 1997. – С. 12 – 13.

126. Использование бифидобактерий для профилактики и лечения диареи телят / В.С. Токарев [и др.] // Пробл. стабилизации и развития с.-х.

произв. Сибири, Монголии и Казахстана в XXI в. – Новосибирск, 1999. – Ч. 2. – С. 276 – 277.

127. Использование пробиотиков и иммуностимуляторов для профилактики желудочно-кишечных заболеваний у новорожденных поросят / А.Н. Панин [и др.] // Актуал. пробл. вет.-санитар. контроля с.-х. продукции: тез. докл. II Междунар. науч.-практ. конф. – М., 1997. – С. 69.

128. Испытание фторазола при лечении диарей молодняка сельскохозяйственных животных / Е.С. Воронин [и др.] // Инфекц. болез. молодн. с.-х. жив: тез. докл. Всерос. науч. конф. – М., 1996. – С. 94 – 96.

129. Исхаков О.З. Рациональное использование лекарственных препаратов в ветеринарии / Исхаков О.З., Авсюкевич В.С. – М.: Россельхозиздат, 1984. – 269 с.

130. Каблучеева Т.И. Значение БАВ для пищеварительной системы птицы / Т.И. Каблучеева // Птицеводство. – 2007. – №2. – С. 17 – 19.

131. Каврук Л.С. Экспериментальное обоснование к созданию пробиотика с пролонгированным действием / Л.С. Каврук, Р.П. Сотников // Актуал. пробл. вет. науки. – М. – 1999. – С. 54 – 55.

132. Каврус М.А. Профилактика желудочно-кишечных заболеваний молодняка крупного рогатого скота / М.А. Каврус, А.Ф. Пилуй // Учен. зап. Гродн. СХИ. – 1994. – Вып. 4. – С. 119 – 120.

133. Каландаров З.С. Терапевтическая эффективность пробиотика субтилбен при колибактериозе телят: автореф. дис. ... канд. вет. наук / З.С. Каландаров. – Душанбе, 2006. – 24 с.

134. Калмыкова А.И. Пробиотики: Терапия и профилактика заболеваний. Укрепление здоровья / Калмыкова А.И.; НПФ «Био-Веста»; СибНИПТИП СО РАСХН. – Новосибирск, 2001. – 208 с.

135. Кальницкая О.И. Экспериментальное обоснование технологии изготовления пробиотика бифидобактерина и его лечебно-профилактическая эффективность при колибактериозе телят: автореф. дис. ... канд. вет. наук / О.И. Кальницкая. – М., 1995. – 22 с.

136. Карпуть И.М. Бактериальные препараты в профилактике диареи у новорожденных поросят / И.М. Карпуть, Л.Л. Руденко // Весці акадэміі аграр. навук Рэспублікі Беларусь. – 1996. – Ч. 1. – С. 166.
137. Карпуть И.М. Иммунная реактивность и устойчивость молодняка к заболеваниям: незаразные болезни молодняка / И.М. Карпуть; науч. ред. И.М. Карпуть. – Минск: Ураджай, 1989. – С.7 – 21.
138. Карпуть И.М. Иммунология и иммунопатология болезней молодняка / И.М. Каруть. – Минск: Ураджай, 1993. – 288 с.
139. Карышева А.Ф. Профилактика и меры борьбы с инфекционными болезнями животных в комплексах Молдавии / Карышева А.Ф., Даньшина М.С. – Кишинев: Штиинца, 1983. – 192 с.
140. Карышева А.Ф. Справочник по инфекционным заболеваниям / Карышева А.Ф., Карышев С.В. – Кишинев: Штиинца, 1989. – 658 с.
141. Карышева А.Ф. Эпизоотология, меры профилактики и борьбы с острыми респираторными болезнями крупного рогатого скота / Карышева А.Ф., Конопаткин А.А., Спатарь Ф.В. – Кишинев, 1983. – 100 с.
142. Кассич А.Ю. Иммунологические аспекты профилактики желудочно-кишечных заболеваний телят в условиях промышленного животноводства / А.Ю. Кассич // Современ. пробл. профил. зооноз. болез. и пути их решения. – Минск, 1987. – С. 15 – 16.
143. Кашин А.С. Антропогенно-экологические органопатологии молодняка животных. Профилактика и терапия. Ветеринарная экология / Кашин А.С.; Минсельхоз России; РАСХН, Сиб. отд-ние; ВНИИПО. – Барнаул, 2002. – 250 с.
144. Кашперова Т.А. Конструирование генетически модифицированных микроорганизмов, для разработки нового поколения иммунобиологических и вакцинных препаратов / Т.А. Кашперова, Н.Г. Ромащева А.В. Нестеров // Биотехнология. – 2004. – №5. – С. 39 – 48.

145. Кашперова Т.А. Конструирование пробиотиков на основе генетически модифицированных штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Кольцово, 2005. – С. 25.

146. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М.: Наука, 1975. – С. 28 – 46.

147. Клинико-эпизоотологические особенности инфекционных диарей новорожденных телят и основные принципы их профилактики и лечения / Гаффаров Х.З. [и др.] // Тр. I съезда вет. врачей Республики Татарстан. – Казань, 1996. – С. 163 – 167.

148. Ковалев В.Ф. Некоторые проблемы применения антибиотиков в животноводстве и ветеринарии / В.Ф. Ковалев // Антибиотики и медбиотехнология. – 1989. – №10. – С. 725 – 729.

149. Ковалев Н.А. Профилактика инфекционных болезней животных / Ковалев Н.А., Музычин С.И., Бутьянов Д.Д. / Под ред. Н.А. Ковалева, С.И. Музычина. – Минск: Ураджай, 1988. – 173 с.

150. Коваль М.П. Биокутикулин, витамины А и В<sub>12</sub> в профилактике диареи у телят / М.П. Коваль, В.А. Гришков // Учен. зап. Витебск. гос. акад. вет. медицины. – 1994. – Т. 31. – С. 58 – 60.

151. Колибактериозы молодняка сельскохозяйственных животных / Павлов Е.Г. [и др.]; УкрИНТЭИ. – 1995. – С. 26 – 28.

152. Колосов А.А. Ассоциативные, факторные болезни сельскохозяйственных животных пастереллезной этиологии / А.А. Колосов, А.Г. Глотов // Ассоциативные инфекции сельскохозяйственных животных, новые подходы к их ликвидации и профилактика: тез. докл. науч. конф., посвящ. 50-летию Алтайской НИВС. – Барнаул, 1997. – С. 47 – 50.

153. Коляков Я.Е. Колибактериоз телят / Коляков Я.Е., Гительсон С.С., Каврук Л.С. – М.: Колос, 1970. – 223 с.

154. Концепция этиологии и профилактики диарей и респираторных болезней новорожденных телят / Воронин Е.С. [и др.] // Инфекц. болез. молодн. с.-х. жив.: тез. докл. Всерос. науч. конф. – М., 1996. – С. 8 – 10.

155. Королюк А.М. Конструирование новых препаратов и лечебных продуктов, для направленной коррекции микроэкологического статуса организма / А.М. Королюк // Инфектология, достижения и перспективы: сб. науч. тр. – СПб., 1996. – С. 125.

156. Корочкин О.Л. Профилактическая эффективность бифидумбактерина / О.Л. Корочкин // Состояние и перспективы развития научных исследований по профилактике и лечению болезней сельскохозяйственных животных и птиц: матер. науч. конф. – Краснодар, 1996. – С. 106 – 108.

157. Корочкин О.Л. Фармакология и применение препаратов бифидобактерий: автореф. дис. ... канд. вет. наук / О.Л. Корочкин. – Троицк, 1997. – 18 с.

158. Коррекция мясной продукции скота в онтогенезе с помощью применения пробиотиков / И.И. Бротухин [и др.] // Пробл. увеличения произв. конкурентноспособ. пищ. продуктов и повышения качества с.-х. сырья. – Волгоград, 1999. – С. 191 – 194.

159. Коршунов В.М. Микроэкология желудочно-кишечного тракта. Коррекция микрофлоры при дисбактериозах кишечника / Коршунов В.М. [и др.]. – М., 1999.

160. Коршунов В.М. Рациональные подходы к проблеме коррекции микрофлоры кишечника / В.М. Коршунов, В.В. Смянов, Б.А. Ефимов // Вестн. РАМН. – 1996. – №2. – С. 60 – 65.

161. Котов В.Б. Состояние и тенденции развития биотехнологии за рубежом / В.Б. Котов, Т.А. Беляева // Итоги науки и техники. Биотехнология: сб. науч. тр. – М.: Мир, 1991. – С. 156.

162. Кравченко Е.А. Профилактика диспепсии телят и лечение телят, больных диспепсией, фитопрепаратом политербет: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Е.А. Кравченко. – Витебск, 1997. – 19 с.

163. Красочко И.А. Вирусные инфекции домашних и диких жвачных животных / Красочко И.А.; УОВГАВМ. – Витебск, 2004. – 268 с.

164. Красочко П.А. Вирусные пневмоэнтериты телят / Красочко П.А., Зелютков Ю.Г., Красочко И.А. – Минск: Хата, 1999. – С. 162.

165. Красочко П.А. Иммунодефицит и его коррекция, при инфекционном ринотрахеите и вирусной диарее у телят / П.А. Красочко, И.А. Красочко, С.М. Усов // Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных: матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию БелНИИЭВ им. С.Н. Вышелевского, 5 – 6 окт. 2000 г. / БелНИИ. – год. – С. 40 – 50.

166. Красочко П.А. Перспективы профилактики и терапии пневмоэнтеритов телят / П.А. Красочко, Н.А. Ковалев, И.А. Красочко // Аграрная наука на рубеже XXI века: матер. общ. собрания ААН РБ, 16 ноября 2000 г. – Минск, 2000. – С. 238 – 240.

167. Красочко П.А. Пути повышения сохранности телят / П.А. Красочко, И.А. Красочко, Н.И. Кот // Внедрение достижений ветеринарной науки в сельскохозяйственное производство: матер. науч.-производ. конф., Смоленск, 27 – 28 ноября 2002 г. – Смоленск, 2002. – С. 44 – 46.

168. Куваева И.Б. Обмен веществ организма и кишечная микрофлора / Куваева И.Б. – М.: Медицина, 1976. – С. 148 – 160.

169. Куваева И.Б. Основные принципы отбора микроорганизмов, для создания биологически активных добавок к пище с пробиотическим действием // Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека: матер. Всерос. конф. – М., 1999. – С. 77 – 99.

170. Кузнецова С.М. Комбинированная антибиотикотерапия / С.М. Кузнецова // Антибиотики. – 1983. – №2. – С. 19 – 37.

171. Куриленко А.Н. Профилактика и лечение инфекционных желудочно-кишечных болезней новорожденных телят / А.Н. Куриленко // Инфекц. болез. молодн. с.-х. жив.: тез. докл. Всерос. науч. конф. – М., 1996. – С. 54 – 56.

172. Лазарева С.А. Меры профилактики и лечения диареи новорожденных телят / С.А. Лазарева, А.Л. Ли // Тр. Кубан. гос. аграр. ун-та. – 1999. – Вып. 375. – С. 67 – 78.
173. Ланчинини Д. Антибиотики / Ланчинини Д., Паренти Ф. – М.: Мир, 1985. – С. 184 – 231.
174. Ларионов Л.П. Влияние биологически активных веществ, продуцируемых бациллами, на некоторые показатели иммунитета / Л.П. Ларионов [и др.] // Здоровоохранение Урала. – Екатеринбург, 2001. – №1. – С. 132.
175. Лебедева И.А. Биоспорин в предстартовый период / И.А. Лебедева // Птицеводство. – 2007. – №11. – С. 46 – 47.
176. Лебедева М.Н. К проблеме лекарственной устойчивости микробов / М.Н. Лебедева, С.Д. Воропаева // Микробиология, эпидемиология и вирусология. – 1957. – №11. – С. 26 – 33.
177. Лебедева М.Н. Лекарственная устойчивость микроорганизмов / Лебедева М.Н., Водаева С.Д. – М.: Медицина, 1972. – С. 14 – 76.
178. Лечебная эффективность жидкого бифидумбактерина при диспепсии телят / А.Ф. Пилуй [и др.] // Профил. и меры борьбы с болез. молодн. с.-х. жив. – Минск, 1990. – С. 74.
179. Лечение и профилактика колибактериоза телят / Ю.А. Павлов [и др.] // Матер. науч. конф., посвящ. 50-летию Краснодар. НИВС. – Краснодар, 1996. – С. 86 – 89.
180. Литвин В.П. Вплив споролакту на мікрофлору шлунково-кишкового тракту телят / В.П. Литвин, А.І. Поживіл, В.В. Поліщук // Інформ. бюлл. Укр. акад. аграр. наук / Ін-т експерим. клінич. вет. медицини. – 1994. – С. 186 – 187.
181. Лысенко С. Пробиотики для цыплят-бройлеров / С. Лысенко, А. Баранников, А. Васильев // Птицеводство. – 2007. – №5. – С. 31 – 32.

182. Лыско С.Б. Чувствительность микоплазм и эшерихий к антибактериальным препаратам / С.Б. Лыско, Н.Ф. Хатько, О.А. Сунцова // Ветеринария. – 2006. – №3. – С. 31 – 33.

183. Мазанкова Л.Н. Перспективы применения споровых пробиотиков при заболеваниях желудочно-кишечного тракта у детей / Л.Н. Мазанкова, И.С. Курохтина // Педиатрия. – 2002. – №4. – С. 56 – 61.

184. Максимов А.М. Профилактика и лечение диспепсии новорожденных телят: лекция / Максимов А.М.; Примор. СХИ. – Уссурийск, 1994 – 20 с.

185. Малик Н.И. Антилизозимные свойства молочнокислых бактерий, выделенных из кишечника поросят и птицы / Н.И. Малик // Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов: сб. науч. тр. ВГНКИ. – М., 2001. – С. 98 – 99.

186. Малик Н.И. Ветеринарные пробиотические препараты / Н.И. Малик, А.Н. Панин // Ветеринария. – 2001. – №1. – С. 46 – 51.

187. Малик Н.И. Новые пробиотические препараты ветеринарного назначения: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Н.И. Малик. – М., 2002. – 53 с.

188. Машковский М.Д. Лекарственные средства / Машковский М.Д. – М., 1997.

189. Медведев А.П. Условно-патогенные микробы и их роль в инфекционной патологии животных / А.П. Медведев, А.А. Вербицкий, М.В. Грибанова // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2006. – №1. – С. 6 – 7.

190. Медведев А.П. Эффективность сыворотки и иммуноглобулина против сальмонеллеза животных / А.П. Медведев, С.В. Даровских, А.М. Юдасин // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2004. – №4. – С.17.

191. Мельник И.Л. Патогенетическая терапия при острых расстройствах пищеварения у новорожденных телят / И.Л. Мельник, Б.П. Семчишин, А.А. Драчук // Профил. и меры борьбы с болез. молодн. с.-х. жив. – Минск, 1990. – С. 60 – 61.

192. Методическое пособие по профилактике и лечению желудочно-кишечных болезней (диспепсия) новорожденных телят / Салахутдинов К.Г. [и др.]. – Казань, 1993. – 76 с.

193. Микельсвор М.Э. Антибиотики и колонизационная резистентность / Микельсвор М.Э. – М., 1990. – 238 с.

194. Микробные препараты в профилактике диарейных болезней / И.М. Карпуть [и др.] // Профил. и меры борьбы с болезн. молодн. с.-х. жив. – Минск, 1990. – С. 67 – 68.

195. Митюшин В.В. Лечение телят при острых расстройствах пищеварения / В.В. Митюшин // Ветеринария. – 1985. – №10. – С. 53 – 55.

196. Михайлова Н.А. Диагностика, профилактика и лечение гнойно-септических заболеваний лекарственными средствами, выпускаемыми НПО «Иммунопрепарат» / Михайлова Н.А., Никитенко В.И., Кузнецова Т.Н.; НПО «Иммунопрепарат». – Уфа:, 1993. – С. 81 – 83.

197. Мишульский А.М. Способ получения бактериального препарата из бактерий рода *Bacillus* / Патент RU N 2076902, С 12 N 1/20, А 61 К 35/74, С 12 R 1:07, опубл. 10.04.97, бюл. N 10.

198. Мозгов И.Е. Стабилизация нормофлором физиологической функции пищеварительного тракта / И.Е. Мозгов // Актуальные вопросы гастроэнтерологической и метаболической патологии. – М., 1986. – С. 17 – 22.

199. Мозгов И.Е. Фармакологические стимуляторы в животноводстве / Мозгов И.Е. – М.: Колос, 1964. – 352 с.

200. Мозгов И.Е. Фармакология / И.Е. Мозгов. – М.: Колос, 1974. – 455 с.

201. Мохов Д.А. К вопросу культивирования лактобацилл с целью их получения в препаративных количествах / Д.А. Мохов, А.З. Хонин, Л.В. Сисюк // Диагностика, лечение и профилактика инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: сб. науч. тр / ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ. – Екатеринбург, 1999. – С. 164 – 165.

202. Муллакаева Л.А. Состояние и пути повышения естественной резистентности кур в промышленном птицеводстве: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук / Л.А. Муллакаева. – Казань, 1991. – 24 с.

203. Мікрофлора кишечники дорослої великої рогатої худоби і здорових та хворих на кишкові хвороби новонароджених телят / В.О. Бусол [и др.] // Вет. медицина. – 1995. – Вип. 70. – С. 63 – 68.

204. Моно- и смешанные инфекционные диареи новорожденных телят и поросят / Гаффаров Х.З. [и др.]. – Казань: Фэн, 2002. – 592 с.

205. Набиев Ф.Г. Лекарственные препараты в ветеринарии: справочник / Ф.Г. Набиев, Р.Н. Ахмадеев. – Казань, 2000. – 592 с.

206. Навашин С.М. Молекулярные основы современной антибиотикотерапии / Навашин С.М., Сазыкин Ю.О. // Антибиотики и химиотерапия. – 1988. – №1. – С. 3 – 12.

207. Навашин С.М. Современное состояние и перспективы применения антибиотиков в сельском хозяйстве / С.М. Навашин, Л.П. Иваницкая, Т.П. Коробкова // Разраб. и применение антибиотиков немед. назначения. – М., 1987. – С. 3 – 4.

208. Наумов М.М. Некоторые вопросы этиологической структуры желудочно-кишечной патологии у новорожденных телят / Наумов М.М., Сулейманов С.М. // Теоретич. и практич. аспекты возникновения и развития болезней жив. и защиты их здоровья в соврем. усл.: матер. Междунар. конф., посвящ. 30-летию ВНИВИПФТ. – Воронеж, 2000. – С. 193 – 195.

209. Научно обоснованная система получения здорового молодняка и профилактика желудочно-кишечных болезней новорожденных телят: рекомендации / В.В. Субботин [и др.] // Вет. консультант. – 2002. – №19. – С. 2 – 4.

210. Несчисляев В.А. Пробиотики: ретроспектива, проблемы и достижения научно-производственной практики НПО «Биомед» / Несчисляев В.А. [и др.] // Микробиол. – 1998. – №2. – С. 100 – 102.

211. Нефедченко А.В. Латенция вируса ИРТ у крупного рогатого скота: особенности течения и эффективность иммуномодуляторов: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. / А.В. Нефедченко. – Новосибирск, 2002. – 22 с.

212. Никитенко А.М. Использование иммуностимулирующего препарата КАФИ в практике ветеринарной медицины / А.М. Никитенко // Матер. науч. конф., посвящ. 50-летию Краснодар. НИВС. – Краснодар, 1996. – С. 78.

213. Нитазолсодержащие препараты при желудочно-кишечных болезнях молодняка / П.А. Паршин [и др.] // Ветеринария. – 1997. – №9. – С. 38 – 41.

214. Новое эффективное средство для профилактики и лечения желудочно-кишечных болезней телят / В.П. Иноземцев [и др.] // Ветеринария. – 1998. – №1. – С. 47 – 51.

215. Новый комплексный микробный препарат в профилактике желудочно-кишечных болезней у телят / И.М. Карпуть [и др.] // Учен. зап. Витебск. гос. акад. вет. медицины. – 1994. – Т. 31. – С. 21 – 24.

216. Ноздрин Г.А. Биологически активные вещества и перспективы их применения в ветеринарии: лекция / Ноздрин Г.А., Наумкин И.В.; НГАУ. – Новосибирск, 1992. – 36 с.

217. Ноздрин Г.А. Ветом-2 при лечении гастроэнтеритов у телят / Г.А. Ноздрин, И.В. Наумкин // Пробл. стабилизации и развития с.-х. произв. Сибири, Монголии и Казахстана в XXI в. – Новосибирск, 1999. – Ч. 2. – С. 234 – 235.

218. Ноздрин Г.А. Механизм антимикробного действия пробиотических препаратов / Г.А. Ноздрин, А.Г. Ноздрин, А.Б. Иванова // Новые пробиотические и иммуотропные препараты в ветеринарии: матер. науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2003. – С. 56 – 58.

219. Ноздрин Г.А. Оптимизация микробиоценозов среды обитания животных путем направленного изменения микробных экосистем с ис-

пользованием пробиотиков: рекомендации / Ноздрин Г.А., Иванова А.Б., Ноздрин А.Г. – Новосибирск, 2003. – 52 с.

220. Ноздрин Г.А. Принципы рациональной профилактики болезней органов пищеварения у новорожденных телят с использованием пробиотиков / Г.А. Ноздрин, В.Д. Соколов // Актуальные вопросы в ветеринарии: тез. докл. науч.-практ. конф. – Новосибирск, 1999. – С. 3 – 4.

221. Ноздрин Г.А. Пробиотики на основе *Bacillus subtilis* и их роль в поддержании здоровья животных разных видов / Г.А. Ноздрин, А.Б. Иванова, А.Г. Ноздрин // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2006. – №7. – С. 63 – 66.

222. Ноздрин Г.А. Пробиотические препараты и направления их использования в ветеринарии // Новые пробиотические препараты в ветеринарии: матер. Рос. науч.-практ. конф. / Новосиб. гос. аграр. ун-т; Упр. ветеринарии Адм. Новосиб. обл.; НПФ «Исследовательский центр Кольцово». – Новосибирск, 2003. – С. 10.

223. Ноздрин Г.А. Разработка и применение пробиотических препаратов для ветеринарии / Г.А. Ноздрин [и др.] // Научное обеспечение АПК Сибири, Монголии и Казахстана: матер. X Междунар. конф. по науч. обеспечению азиат. территорий. – Улан-Батор, 2007. – С. 359 – 360.

224. Ноздрин Г.А. Технологические аспекты применения пробиотических препаратов / Г.А. Ноздрин [и др.] // Новые пробиотические и иммуностропные препараты в ветеринарии: матер. Рос. науч.-практ. конф. НГАУ. – Новосибирск, 2003. – С. 55 – 56.

225. Ноздрин Г.А. Фармакологическая коррекция иммунодефицитов у телят в ранний постнатальный период жизни: автореф. дис. ... д-ра. вет. наук / Г.А. Ноздрин. – СПб., 1996. – 37 с.

226. Ноздрин Г.А. Фармакологические аспекты применения пробиотиков на основе *Bac. subtilis* для стимуляции роста животных / Г.А. Ноздрин [и др.] // Новые фармакологические средства в ветеринарии: матер. Междунар. науч.-практ. конф. – СПб., 2003. – С. 27 – 28.

227. Ноздрин Г.А. Хронофармакологические особенности влияния ветома 3 на морфологические показатели крови у телят, больных гастроэнтеритом / А.Г. Ноздрин [и др.] // Новые фармакологические средства в ветеринарии: матер. Междунар. науч.-практ. конф. – СПб., 2003. – С. 28 – 29.

228. Ноздрин Г.А. Эффективные средства стимуляции роста телят / Г.А. Ноздрин, А.И. Леляк // Новые фармакологические средства в ветеринарии: матер. 8-й межгос. межвуз. науч.-практ. конф. – СПб., 1997. – С. 42 – 43.

229. О влиянии технологических режимов содержания молодняка на их резистентность / В.И. Иванов [и др.] // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию академика ВАСХНИЛ Я.Р. Коваленко, Москва, 16 – 17 мая 2006 г. / ГНУ ВНИИЭВ им. Я.Р. Коваленко; редкол.: М.И. Глюкин [и др.]. – М.: Изограф, 2006. – С. 478 – 480.

230. Овсянов Н.И. Препарат лерс при диарее телят / Н.И. Овсянов, М.А. Овладеева, К.Н. Наумова // Земля сибирская, дальневосточная. – 1984. – №2. – С. 40 – 41.

231. Опыт применения пробиотического препарата Лактицида в свиноводческом хозяйстве промышленного типа / А.Н. Панин [и др.] // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – 1995. – Т. 57. – С. 30.

232. Ортман Р.А. Апробация энроксила при желудочно-кишечных и легочных болезнях телят и поросят / Р.А. Ортман, Г.Г. Михин, А.Э. Цибарт // Ветеринария. – 1995. – №3. – С. 9 – 10.

233. Панин А.Н. Биотехнологические аспекты изготовления сухих пробиотических препаратов / А.Н. Панин // Научные основы пр-ва вет. биол. препаратов: сб. науч. тр. / ВНИТИБП. – Щелково, 2000. – С. 343 – 345.

234. Панин А.Н. Второе рождение пробиотиков / А.Н. Панин, Н.И. Серых, Е.В. Малик // Вет. газета. – 1995. – №7. – С. 3.

235. Панин А.Н. Иммунобиология и кишечная микрофлора / Панин А.Н., Малик Н.И., Малик Е.В. – М., 1988. – 48 с.

236. Панин А.Н. Иммунология и кишечная лактофлора / А.Н. Панин. – М., 2001. – С. 15.

237. Панин А.Н. Комплексный иммунопробиотический препарат для профилактики диареи у поросят и цыплят / А.Н. Панин, Н.И. Малик, Е.В. Малик // Матер. XXV Всемир. вет. конгр. – М., 1995.

238. Панин А.Н. Применение продуктов пчеловодства для стимуляции иммуногенеза и коррекции микробиоценоза кишечника поросят: метод. рекомендации / Панин А.Н., Маннапова Р.Т., Малик Н.И. – М., 1997.

239. Панин А.Н. Принципы и перспективы применения пробиотиков в ветеринарии / А.Н. Панин, Н.И. Малик // Пробиотики и пробиотические продукты в профил. и леч. наиболее распространен. забол. чел.: тез. Всерос. конф. – М., 1999. – С. 70.

240. Панин А.Н. Пробиотики в системе рационального кормления животных / А.Н. Панин, Н.И. Малик // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты: матер. Междунар. конгр. – СПб., 2007. – С. 59.

241. Панин А.Н. Пробиотик Интестевит для профилактики желудочно-кишечных заболеваний у телят / Панин А.Н., Малик Н.И., Малик Е.В. // Актуал. пробл. вет.-санитар. контроля с.-х. продукции: тез. докл. II Междунар. науч.-практ. конф. – М., 1997. – С. 70.

242. Панин А.Н. Пробиотические препараты, их влияние на локальную защиту животных из экологически неблагоприятных регионов: рекомендации / Панин А.Н., Янгуразова З.А., Малик Н.И. – М., 1995. – 36 с.

243. Панин А.Н. Формирование кишечного микробиоценоза у цыплят / А.Н. Панин, Н.И. Малик, И.П. Степаненко // Ветеринария. – 2000. – №7. – С. 23 – 26.

244. Панин А.С. Принципы и перспективы применения пробиотиков в ветеринарии / А.С. Панин, Н.И. Малик // Пробиотики и пробиотические

продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека: сб. науч. тр. – М., 1999. – С. 70.

245. Панин А.С. Пробиотические препараты в ветеринарии / А.С. Панин, Н.Е. Серых // Ветинформ. – 1993. – №2. – С. 9 – 10.

246. Панин В.А. Сравнительная характеристика эффективности пробиотического препарата и стимулятора бифидофлоры (пробиотика) у цыплят разного возраста / Панин В.А., Уша Б.В., Зинченко Е.В. // Биотехнол.: состояние и перспективы развития: матер. I Междунар. конгр. – М., 2002. – С. 3 – 4.

247. Парникова С.И. Изучение биологических свойств бактерий рода *Bacillus* и разработка пробиотического препарата, для профилактики и лечения диареи новорожденных телят: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. / С.И. Парникова. – Якутск, 2002. – 18 с.

248. Парфенов А.И. Микробная флора кишечника и дисбактериоз / А.И. Парфенов // Рус. мед. журн. – 1998. – №6 (18). – С. 1170 – 1173.

249. Пархоменко Ю. Г. Морфологическая характеристика тонкой кишки и транслокация кишечной микрофлоры в постреанимационном периоде [Текст] / Ю. Г. Пархоменко, К.Х.Алмагамбетов, Т. Г. Бархина // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1991. - 112, N10 : 0365-9615. - С. 436-439.

250. Пат. 1722502, МКИ<sup>5</sup> А 61 К 39/02, 35/74. Препарат биоспорин для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний человека / Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. (РФ). – 7 с.

251. Пат. 2031937 Российская Федерация. Штамм бактерий *Bifidobacterium globosum*, используемый для приготовления пробиотического препарата / Панин А.Н. [и др.]; заявл. 17.10.91; опубл. 27.03.95.

252. Пат. 2084234 Российская Федерация. Комплексный пробиотический препарат ветеринарного назначения / Попов С.Г., [и др.]; 1993.

253. Пат. 2086248 Российская Федерация. Пробиотический препарат «Стрептобифид-форте» для животных / Малик Н.И. [и др.]; заявл. 02.04.96; опубл. 10.08.97.

254. Пашин П.А. Клинико-морфологические изменения при гастроэнтеритах у молодняка / П.А. Пашин, С.М. Сулаймонов // Ветеринария. – 2004. – №2. – С. 42 – 45.

255. Перспективы использования бактерий рода *Vacillus* в качестве основы лечебно-профилактических препаратов / С.Р. Резник [и др.] // Колонизационная резистентность и химиотерапевтические антибактериальные препараты / Под ред. Б.А. Шендерова. – М., 1988. – С. 302 – 303.

256. Пестова Л.В. Изменения в иммунном статусе крупного рогатого скота на фоне антропогенного загрязнения / Л.В. Пестова, В.И. Иванов // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: матер. Междунар. науч.-практ. конф, посвящ. 100-летию академика ВАСХНИЛ Я.Р. Коваленко, Москва, 16 – 17 мая 2006 г. / ГНУ ВНИИЭВ им. Я.Р. Коваленко; редкол.: М.И. Глюкин [и др.]. – М.: Изограф, 2006. – С. 485 – 487.

257. Петровская В.Г. Микрофлора человека в норме и патологии / Петровская В.Г., Марко О.П. – М.: Медицина, 1976. – 231 с.

258. Пивовар Л.М. Комплексная терапия новорожденных при желудочно-кишечных заболеваниях / Л.М. Пивовар // Профил. и меры борьбы с болез. молодн. с.-х. жив. – Минск, 1990. – С. 62 – 63.

259. Пилуй А.Ф. Испытание экстракта слизистой кишечника для профилактики и лечения диареи у новорожденных телят / А.Ф. Пилуй, В.Е. Иванов // Профил. и меры борьбы с болез. молодн. с.-х. жив. – Минск, 1990. – С. 76 – 77.

260. Пинегин Б.В. Дисбактериоз кишечника / Пинегин Б.В., Мальцев В.Н., Коршунов В.М. – М.: Медицина, 1984. – 143 с.

261. Пирожков М.К. Иммунопрофилактика эшерихиоза молодняка сельскохозяйственных животных / М.К. Пирожков, Ю.А. Малазов // Ма-

тер. науч. конф., посвящ. 50-летию Краснодар. НИВС. – Краснодар, 1996. – С. 89 – 90.

262. Пирузян Л.Ф. Сапрофитная микрофлора в качестве продуцента биологически активных веществ для целей микробной сапротрофной фармакотерапии / Л.Ф. Пирузян, Е.М. Михайловский // Изв. Академии наук. Сер. «Биология». – 1992. – №6. – С. 860 – 869.

263. Повышение эффективности пробиотикотерапии у поросят / А.Н. Панин [и др.] // Ветеринария. – 1996. – №17. – С. 22 – 23.

264. Подберезный В.В. Культивирование производственных штаммов *Vac. subtilis* в подсырной сыворотке / В.В. Подберезный, Н.И. Полянец, Л.В. Рубаева // Ветеринария. – 1996. – №1. – С. 21 – 23.

265. Подкопаев В.М. Диагностика, лечение и профилактика болезней новорожденных телят / Подкопаев В.М., Шишков В.П. – М., 1967.

266. Попова Н.В. Влияние уровня кормления молозивом телят на естественную устойчивость / Попова Н.В., Морогина З.И., Горбунов А.П. // Матер. науч. конф., посвящ. 50-летию Краснодар. НИВС. – Краснодар, 1996. – С. 163 – 164.

267. Пospelов Е.В. Состояние иммунной системы и обмена аминокислот у больных диспепсией телят, в связи с применением ронколейкина и реамберина: автореф. дис. . канд. вет. наук. / Пospelов Е.В. СПб., 2003. 20 с.

268. Потапова О.А. Бактериостатическое и бактерицидное действие лактобрила на представителей микробного биоценоза кишечника телят / О.А. Потапова // Диаг., леч. и профил. забол. с.-х. жив. – Ставрополь, 1997. – С. 34 – 36.

269. Применение комбинаций нитазола с сульфаниламидами при желудочно-кишечной патологии телят и поросят / С.М. Сулейманов [и др.] // Актуал. пробл. вет. хирургии. – Воронеж, 1997. – С. 73.

270. Применение полихроматического поляризованного света в ветеринарной медицине: методические рекомендации для студентов факультета ветеринарной медицины и слушателей Витебск. ВГАВМ, 2006. – 32 с.

271. Применение рекицена РД для профилактики и лечения диарей телят и поросят / Исмаилов М.А. [и др.] // Новое в диаг., леч. и профил. болезней жив. – М., 1996. – С. 7 – 15.

272. Приходько Г.П. Капролактамы при расстройствах пищеварения у телят / Г.П. Приходько // Ветеринария. – 1995. – №1. – С. 45 – 48.

273. Пробиотики на основе *Bacillus subtilis* новый класс экологически адекватных препаратов / Г.А. Ноздрин [и др.] // Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии: матер. I Междунар. конгр. вет. фармакологов. – СПб., 2008. – С. 90 – 91.

274. Профилактика диспепсии новорожденных телят аутоиммунного происхождения / И.М. Карпуть // Ветеринария. – 1985. – №6. – С. 50 – 51.

275. Профилактика заболеваний животных в промышленном животноводстве / Аликаев В.А. [и др.]. – М.: Колос, 1974. – 431 с.

276. Профилактика и терапия желудочно-кишечных и респираторных болезней молодняка с применением химических и биологических препаратов / А.Г. Шахов [и др.] // Итоги и перспективы науч. исслед. по пробл. патол. жив. и разраб. средств и методов терапии и профил. – Воронеж, 1995. – С. 82 – 89.

277. Профилактика рота- и коронавирусных энтеритов новорожденных телят / Зеленев А.Е. [и др.] // Ветеринария. – 2004. – №4. – С.8 – 9.

278. Профилактическое и терапевтическое действия биоспорина-В при диареях телят и поросят / М.А. Исмаилов [и др.] // Вопр. физ.-хим. биол. в вет. – М., 1997. – С.84 – 88.

279. Прудников В.С. Иммуноморфогенез у животных, преорально вакцинированных против сальмонеллеза, и влияние на него иммуностимуляторов: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.02. / В.С. Прудников. – Л., 1991. – 36 с.

280. Пылаев С.А. Разработка технологии концентрирования и высушивания глубинных культур *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* 31 в производстве биоспорина: автореф. дис. ... канд. биол. наук / С.А. Пылаев. – Казань, 2001. – 20 с.

281. Рабинович М.И. Особенности комбинированного применения ряда химиотерапевтических средств / М.И. Рабинович // Ветеринария. – 1997. – №7. – С. 59 – 67.

282. Разработать и внедрить новые высокоэффективные комплексные препараты по профилактике и терапии респираторно-кишечных инфекций молодняка сельскохозяйственных животных: Отчет о НИР / ТаджНИВИ; рук. Сатторов И. Т. – Душанбе, 2005.

283. Рекомендации по повышению сохранности телят. – СПб., 1995. – 20 с.

284. Родин В.В. Применение пробиотиков в животноводстве / Родин В.В., Филенко В.Ф., Жуков В.П. // Современ. достижения биотехнол. – Ставрополь, 1996. – С. 43.

285. Рой Дж.Х. Выращивание телят / Рой Дж.Х. – М.: Колос, 1973. – 270 с.

286. Роль иммунодефицитов в патогенезе желудочно-кишечных и респираторных заболеваний телят и поросят и система их профилактики и коррекции / А.И. Ануфриев [и др.] // Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных: матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения профессора А.А. Авророва, Воронеж, 22 – 23 июня 2006 г. / РАСХН, ВНИВИПФиТ, Воронеж. ГАУ, ИЭКВМ, УААН. – Воронеж: Научная книга, 2006. – С. 10 – 19.

287. Руденко Л.Л. Профилактика диспепсии у новорожденных поросят с использованием пробиотиков: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Л.Л. Руденко. – Витебск, 1999. – 20 с.

288. Ряднов А.А. Эффективность применения протосубтилина ГЗх при желудочно-кишечных заболеваниях телят / Ряднов А.А., Ряднова Т.А.

// Совершенствование ресурсосберегающих технол. произв. продуктов животновод. – Волгоград, 1995. – С. 74 – 77.

289. Салимов Р.М. Лекарственные препараты при колибактериозе / Салимов Р.М. // Земля сибирская, дальневосточная. – 1985. – №9. – С. 30 – 31.

290. Сатторов И.Т. Ассоциированное течение рота- и коронавирусного энтерита у телят / И.Т. Сатторов, Н.С. Жумаев // Меры борьбы и профил. инфекц., инваз. и незараз. болез. с.-х. жив. в Таджикистане. – Душанбе, 1989. – С. 40 – 42.

291. Сатторов И.Т. Эпизоотология, диагностика, терапия и профилактика коронавирусного энтерита телят в условиях Республики Таджикистан: автореф. дис. ... д-ра вет. наук / И.Т. Сатторов. – М., 1985. – 45 с.

292. Сафонов Г.А. Пробиотики как фактор, стабилизирующий здоровье животных / Г.А. Сафонов, Т.А. Калинина, В.П. Романова // Ветеринария. – 1992. – №7. – С. 3 – 4.

293. Сидоров В.Т. Естественная резистентность телят при желудочно-кишечных заболеваниях / В.Т. Сидоров // Ветеринария. – 1984. – №10. – С. 57 – 59.

294. Сидоров М.А. Нормальная микрофлора животных и ее коррекция пробиотиками / М.А. Сидоров, В.В. Субботин, Н.В. Данилевская // Ветеринария. – 2000. – №11. – С. 17 – 21.

295. Сидоров М.А. Основы профилактики желудочно-кишечных заболеваний новорожденных телят / М.А. Сидоров, В.В. Субботин // Ветеринария. – 1998. – №1. – С. 3 – 7.

296. Сидоров М.А. Пероральная иммунизация новорожденных телят и поросят против колибактериоза / М.А. Сидоров, Т.К. Курашвили // Ветеринария. – 1974. – №10. – С. 24.

297. Сидоров М.А. Эффективность протективного антигена из эшерихий при колибактериозе новорожденных телят / Сидоров М.А. // Тр. ВИЭВ. – М., 1979. – Т. 49. – С. 47 – 52.

298. Сизова А.В. Значение микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных и использование бактерий-симбионтов в животноводстве / А.В. Сизова. – М., 1974. – С. 46 – 82.

299. Симбиотический препарат на основе лактулозы и молочнокислых бактерий / Г.Б. Гаврилов [и др.] // Молоч. промышл. – 1998. – №4. – С. 31 – 32.

300. Скворцов А.Э. Технология приготовления таблетированной формы пробиотика «Биоспорин» / А.Э. Скворцов [и др.] // Ветеринарная медицина. – М., 2002. – №2. – С. 44.

301. Скворцов В.Н. Развитие устойчивости стафило- и стрептококков к линкомицину *in vitro* / В.Н. Скворцов, А.В. Голиков // Нов. фармакол. средства в ветеринарии: матер. XV Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 300-летию Санкт-Петербурга. – СПб., 2003. – С. 85.

302. Слабоспицкая А.Т. Ферментативная активность бацилл, перспективных для включения в состав биопрепаратов / А.Т. Слабоспицкая, С.С. Крымовская, С.Р. Резник // Микробиол. журн. – 1990. – Т. 52, №2. – С. 9 – 14.

303. Смирнов А.М. О профилактике диспепсии новорожденных телят / А.М. Смирнов // Профил. и леч. болез. молодн. с.-х. жив. – М., 1968. – 118 с.

304. Смирнов А.О. Разработка технологии получения таблеточной формы препарата Биоспорин / А.О. Смирнов, А.Т. Харечко, Н.В. Садовой // Биотехнология. – 1996. – №11. – С. 51 – 55.

305. Смирнов В.В. Бактерии рода *Bacillus* – продуценты антибиотиков / В.В.Смирнов, С.Р. Резник // Проблемы изыскания и биотехнологии новых антибиотиков: сб. науч. тр. – М: Медицина, 1982. – С. 53 – 57.

306. Смирнов В.В. Влияние комплексного пробиотика споролакта на микробиоценоз кишечника теплокровных / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, В.А. Вьюницкая // Микробиол. журн. – 1995. – №4. – С. 42 – 49.

307. Смирнов В.В. Дискуссионные вопросы создания и применения бактериальных препаратов для коррекции микрофлоры теплокровных / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.Б. Сорокулова // Микробиол. – 1992. – №6. – С. 82 – 94.

308. Смирнов В.В. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных / Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. – Киев, 1983. – 50 с.

309. Смирнов В.В. Новый пробиотик эндоспорин для лечения и профилактики эндометритов животных / В.В. Смирнов, В.А. Кудрявцев, А.И. Осадчая // Дисбактериозы и эубиотики: сб. науч. тр. – М, 1996. – С. 32 – 38.

310. Смирнов В.В. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов / В.В. Смирнов, Н.К. Коваленко // Микробиол. журн. – 2002. – №4. – С. 62 – 80.

311. Смирнов В.В. Рост и спорообразование *Bacillus subtilis* в различных условиях аэрации / В.В. Смирнов, А.И. Осадчая, В.А. Кудрявцев // Микробиол. журн. – 1993. – №3. – С. 38 – 43.

312. Смирнов В.В. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, В.О. Вьюницкая // Микробиол. журн. – 1993. – №4. – С. 92 – 112.

313. Смирнов В.В. Спорообразующие аэробные бактерии, продуценты биологически активных веществ / Смирнов В.В., Резник С.Ф., Василевская И.А. – Киев: Наук. думка, 1982. – С. 274.

314. Смирнов В.В. Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов бацилл, составляющих основу некоторых пробиотиков / В.В. Смирнов, А.В. Руденко, Н.В. Самгородская // Антибиотики и химиотерапия. – 1994. – №4. – С. 23 – 28.

315. Совместное использование пробиотического препарата и иммуностимулятора для профилактики желудочно-кишечных заболеваний у по-

росят-сосунов / А.Н. Панин [и др.] // Инфекц. болез. молодн. с.-х. жив.: тез. докл. Всерос. науч. конф. – М., 1996. – С. 52 – 54.

316. Соколов А.В. Бифацил – новый эффективный пробиотик / А.В. Соколов, Т.В. Абакулова, Ю.Н. Рыбаков // Новые фармакологические средства в ветеринарии: матер. 9-й Межгос. межвуз. науч.-практ. конф. – СПб., 1997. – С. 37 – 38.

317. Соколов В.Д. Ветеринарная фармакология: учеб. для вузов / Соколов В.Д. – М, 1997.

318. Соколов В.Д. Комбинированное применение антимикробных средств / В.Д. Соколов // Фармакол. и токсикол. нов. лекарств. средств и кормовых добавок в вет. – Л., 1990. – С. 5 – 9.

319. Соколов В.Д. Лекарственные средства, применяемые в ветеринарной практике: справочник / Соколов В.Д., Ноздрин Г.А., Рыбаков Ю.Н. – Новосибирск, 1992. – 262 с.

320. Соколов В.Д. Терапевтическая эффективность диацетина при желудочно-кишечных заболеваниях молодняка / В.Д. Соколов, Г.А. Ноздрин, И.В. Наумкин // Новые фармакол. средства в вет.: тез. докл. 6-й Межгос. науч.-практ. конф. – СПб., 1994. – С. 41.

321. Сорокин В.В. Нормальная микрофлора кишечника животных / Сорокин В.В., Тимошко М.А., Николаева А.В. – Кишинев: Штиинца, 1973. – С. 3 – 68.

322. Сорокулова И.Б. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых биопрепаратов / И.Б. Сорокулова // Антибиотики и химиотерапия. – 1996. – №10. – С. 13 – 15.

323. Сорокулова И.Б. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования в медицине и ветеринарии / И.Б. Сорокулова [и др.] // Вестн. РАМН. – М.: Медицина, 1997. – №3. – С. 46 – 49.

324. Сорокулова И.Б. Сравнительное изучение биологических свойств биоспорина и других коммерческих препаратов на основе бацилл / И.Б. Сорокулова // Микробиол. журн. – 1997. – №6. – С. 43 – 49.

325. Сравнительная оценка различных методов лечения диареи при диспепсии новорожденных телят / В.Ф. Воскобойник [и др.] // Новое в диаг., леч. и профил. болез. жив. – М., 1996 – С. 4 – 5.

326. Сравнительная характеристика иммуностимуляторов природного происхождения / П.А. Красочко [и др.] // Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных: матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию БелНИИЭВ им. С.Н. Вышелевского, 5 – 6 окт. 2000 г. / БелНИИЭВ им. С.Н. Вышелевского; редкол.: Н.Н. Андросик [и др.]. – Минск: Хата, 2000. – С. 123 – 125.

327. Станиславский Е.С. Бактериальные структуры и их антигенность / Станиславский Е.С. – М.: Медицина, 1974. – 220 с.

328. Старухин П.П. Об эффективности применения споробактерина новорожденным телятам / П.П. Старухин, В.М. Мешков, П.И. Жданов // Актуал. пробл. патол. жив. и чел. – Барнаул, 1996. – С. 71.

329. Степанюк О.В. Сравнительная эффективность новых иммуномодуляторов при диареех телят / О.В. Степанюк // Новые фармакол. средства в вет.: тез. докл. 2-й Межвуз. науч.-практ. конф. – Л., 1990. – С. 40.

330. Субботин В.В. Биотехнология пробиотика лактобифадола (бифацидобактерина) и его лечебно-профилактическая эффективность: автореф. дис. ... д-ра вет. наук / В.В. Субботин. – М., 1999. – 41 с.

331. Субботин В.В. Влияние бифацидобактерина на кишечную микрофлору поросят / В.В. Субботин, К.М. Степанов // Ветеринария. – 1998. – №5. – С. 25 – 26.

332. Субботин В.В. К вопросу о селекции производственных штаммов для пробиотиков ветеринарного назначения / В.В. Субботин // Инфекционные болезни молодняка сельскохозяйственных животных: тез. докл. Всерос. науч. конф. – М., 1996. – С. 75.

333. Субботин В.В. Лактобифадол для бактериопрофилактики и терапии желудочно-кишечных заболеваний / В.В. Субботин, М.А. Сидоров // Ветинформ. – М., 1999. – №1. – С. 20.

334. Субботин В.В. Новый пробиотический препарат бифидобактерин и его профилактическая и ростостимулирующая эффективность, при откорме бройлерных цыплят / В.В. Субботин // Новые фармакологические средства в ветеринарии: матер. 8-й Межгос. межвуз. науч.-практ. конф. – СПб., 1996. – С. 25 – 32.

335. Сытдыков Л.К. Колибактериоз ягнят и поросят / Сытдыков Л.К., Бурлуцкий И.Д. – Ташкент: Фан, 1977. – 47 с.

336. Танами Ю. Антагонизм и симбиоз бактерий в кишечнике животных гнотобиотиков / Ю. Танами // 18-й Междунар. конгр. по микробиол. – М., 1966. – С. 219.

337. Тараканов Б.В. Использование микробных препаратов и продуктов микробиологического синтеза в животноводстве / Б.В. Тараканов // Ветеринария. – 1987. – №3. – С. 41 – 45.

338. Тараканов Б.В. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных / Б.В. Тараканов // Ветеринария. – 2000. – №1. – С. 47 – 54.

339. Тараканов Б.В. Новые биопрепараты для ветеринарии / Б.В. Тараканов, Т.И. Николычева // Ветеринария. – 2007. – №7. – С. 45 – 50.

340. Тараканов Б.В. Новые пробиотические препараты для использования в животноводстве / Б.В. Тараканов // Иновац. развитие достижения ученых Калуж. обл. для нар. хоз-ва: сб. тез. регион. науч.-практ. конф., посвящ. Дню науки. – Обнинск, 1999. – С. 169 – 170.

341. Татарчук О.П. Новые тенденции антибиотикотерапии / О.П. Татарчук // Ветеринария. – 2004. – №12. – С. 12 – 14.

342. Татарчук О.П. Тилозин тартрат: рациональная антибиотикотерапия / О.П. Татарчук // Ветеринария. – 2004. – №4. – С. 11 – 13.

343. Терехов В.И. Применение комплексного лечения при бактериальной диарее у новорожденных телят / В.И. Терехов // Актуал. вопр. диаг., профил. и борьбы с болез. с.-х. жив.: тез. Междунар. конф. – Ставрополь, 1999. – С. 131 – 133.

344. Терешин И.М. Преодоление лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний / Терешин И.М. – Л., 1977. – 184 с.

345. Терешин И.М. Пути преодоления антибиотикорезистентности / Терешин И.М. – Л.: Медицина, 1978. – С. 123.

346. Тимошко М.А. Взаимодействие бифидобактерий, молочнокислых бактерий и эшерихий в кишечнике гнотобиотичных цыплят: автореф. дис. ... канд. биол. наук / М.А. Тимошко. – Кишинев, 1973. – 23 с.

347. Тимошко М.А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных / Тимошко М.А. – Кишинев: Штиинца, 1990. – С. 6 – 26, 42 – 74, 106 – 122, 124 – 150.

348. Тимошко М.А. Применение непатогенных микроорганизмов при выращивании поросят-сосунов в промышленных условиях / М.А. Тимошко, В.Г. Холмецкая // Изв. АН МССР. Сер. биол. и хим. наук. – 1981. – №5. – С. 66 – 68.

349. Тихонов И.В. Проблемы и перспективы биотехнологии / И.В. Тихонов, В.А. Гаврилов // Ветеринарная медицина. – М., 2003. – №3. – С. 26 – 27.

350. Токсическая оценка альвеозана / П.А. Красочко [и др.] // Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных: матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию БелНИИЭВ им. С.Н. Вышелевского, 5 – 6 окт. 2000 г. / БелНИИЭВ им. С.Н. Вышелевского; редкол.: Н.Н. Андросик [и др.]. – Минск: Хата, 2000. – С. 457 – 458.

351. Топурия Г.М. Влияние достима на неспецифический иммунитет новорожденных телят / Г.М. Топурия, А.Д. Белов // Новое в диаг., леч. и профил. болез. жив. – М., 1996. – С. 21 – 23.

352. Турдиев Ш.А. Климато-эпизоотологическое проявление колибактериоза телят и их лечение в условиях Республики Таджикистан: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Ш.А. Турдиев – Душанбе, 1997. – С. 8.

353. Урбан В.П. Болезни молодняка в промышленном животноводстве / Урбан В.П., Найманов И.Л. – М.: Колос, 1984. – 207 с.

354. Урбан В.П. Желудочно-кишечные болезни телят и меры борьбы с ними / В.П. Урбан. – М., 1985. – С. 62.

355. Файрушин Р.Н. Изучение антибактериальной активности политрила / Р.Н. Файрушин, Л.К. Шарипова, А.Ф. Исмагилова // Нов. фармакол. средства в вет.: матер. XV Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 300-летию Санкт-Петербурга. – СПб., 2003. – С. 43 – 44.

356. Фельдман И.И. Диарея, бронхопневмония, полиартриты телят / Фельдман И.И.; РАСХН, Сиб. отд.; ИЭВСДВ. – Новосибирск, 1992. – 48 с.

357. Фельдман И.И. Профилактика диареи и респираторных болезней телят методом разрыва эпизоотической цепи: рекомендации / Фельдман И.И., Джупина С.И.; РАСХН, Сиб. отд.; ИЭВСДВ. – Новосибирск, 1991. – 16 с.

358. Физиотерапия и физиопрофилактика болезней животных / Белов А.Д. [и др.]. – М.: Колос, 1983. – С. 63 – 77; 103 – 120.

359. Формирование кишечного биоценоза у подсосных поросят путем применения жидкого пробиотического препарата Лактицид / А.Н. Панин [и др.] // Актуал. пробл. вет.-санитар. контроля с.-х. продукции: тез. докл. II Междунар. науч.-практ. конф. – М., 1997. – С. 67 – 68.

360. Фортушный В.А. Сульфажин при колибактериозе телят / В.А. Фортушный // Ветеринария. – 1985. – №9. – С. 58 – 59.

361. Фукс П.П. Разработка новой технологии получения сухого пробиотика / П.П. Фукс, Э.Л. Петренчук // Вет. медицина. – 1997. – Вып. 73. – С. 24 – 28.

362. Хамдамов А.Ш. Распространение желудочно-кишечных болезней телят, вызываемых ассоциацией рота-, коронавирусов и эшерихии коли, совершенствование их терапии и специфической профилактики: дис. ... канд. вет. наук / А.Ш. Хамдамов. – Душанбе, 2000. – 114 с.

363. Харечко А.Т. Разработка технологии и создание аппаратурно-технологической линии по выпуску биоспорина, в различных лекарственных формах в Центре ВТП БЗ / А.Т. Харечко, А.Н. Доронин, И.А. Поберий

// Перспективы использования эубиотика "Биоспорин" в практике здравоохранения и военно-медицинской службы: сб. науч. тр. / ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ. – Екатеринбург, 1997. – С. 55 – 62.

364. Хренов Н.М. Аэроионизация в животноводстве / Хренов Н.М. – Киев: Изд-во УСХА, 1993. – С. 78 – 96.

365. Цион Р.А. Оценка роли микрофлоры при некоторых желудочно-кишечных и обменных заболеваниях новорожденных животных / Р.А. Цион // Сб. науч. тр. Ленингр. вет. ин-та. – Л., 1977. – №52. – С. 153 – 154.

366. Цитокины, как иммуномодуляторы: перспективы их использования в ветеринарии / А.Н. Панин [и др.] // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – 1995. – Т. 57. – С. 166 – 178.

367. Червяков Д.К. Лекарственные средства в ветеринарии: справочник / Червяков Д.К., Евдокимов П.Д., Вишкер Л.С. – М.: Колос, 1977. – 496 с.

368. Чесалов С.А. Разработка методов конструирования сред высушивания биопрепаратов: автореф. дис. ... канд. технич. наук: 03.00.23 / С.А. Чесалов. – М., 1993. – 25 с.

369. Чернущенко Е.В. Процессы пищеварения и усвоения питательных веществ, при-скармливании сухой живой бактериальной культуры / Е.В. Чернущенко // Бюл. ВНИИФБИП с.-х. животных. – 1988. – №3. – С. 36 – 38.

370. Чугунова Н.К. Исследование процесса таблетирования колибактерина и лактобактерина: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 03.00.23 / Н.К. Чугунова. – Пермь, 1983. – 21 с.

371. Чучалин А.Г. Иммунокоррекция в пульмонологии / Чучалин А.Г. – М.: Медицина, 1989. – 256 с.

372. Шахназаров В.Ю. Пробиотики – препараты молочнокислых бактерий / В.Ю. Шахназаров // Кролиководство и звероводство. – 1990. – Т. 6. – С. 10 – 11.

373. Шевелева С.А. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса / С.А. Шевелева // Вопр. питания. – 1999. – №2. – С. 32 – 40.

374. Шевченко А.И. Влияние ветома 1.1 на рост и сохранность цыплят-бройлеров // Селекция, ветеринария, генетика и экология: матер. I Междунар. науч. конф. – Новосибирск, 2001. – С. 83.

375. Шендеров Б.А. Антимикробные препараты и нормальная микрофлора. Проблемы и возможные пути их решения / Б.А. Шендеров // Антибиотики и химиотерапия. – 1988. – №12. – С. 921 – 926.

376. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 3: Пробиотики и функциональное питание / Шендеров Б.А. – М., 2001. – 288 с.

377. Шендеров Б.А. Пробиотики и функциональное питание. Микроэкологические аспекты / Б.А. Шендеров, М.А. Манвелова // Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека: матер. Всерос. конф. – М., 1999. – С. 23 – 24.

378. Шендеров Б.А. Функциональное питание и пробиотики – микроэкологические аспекты / Шендеров Б.А., Манвелова М.А. – М., 1997. – С. 7 – 12.

379. Шляхов Э.Н. Стимуляция поствакцинального иммунитета / Шляхов Э.Н., Кику В.Ф. – Кишинев: Штиинца, 1984. – 200 с.

380. Шубин Х.А. Бактериальные препараты при профилактике желудочно-кишечных болезней телят / Х.А. Шубин, Л.А. Шубина // Ветеринария. – 1994. – №3. – С. 42 – 44.

381. Шурыгин А.Я. Использование молочнокислых микроорганизмов и продуктов их метаболизма / Шурыгин А.Я. [и др.]. – Краснодар: Сов. Кубань, 1996. – 304 с.

382. Щербаков П. Препараты для молодняка / П. Щербаков // Животновод. – 2002. – №2. – С. 34.

383. Экпиньонг Л.А. Ростостимулирующее влияние на цыплят лекарственных веществ микробного происхождения: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Л.А. Экпиньонг. – М., 1990. – 16 с.

384. Энтеробактерии: руковод. для врачей / Под ред. В.И. Покровского. – М.: Медицина, 1985. – С. 44 – 87.

385. Эффективность инактивированной вакцины при факторных респираторных болезнях / Ю.А. Костыркин [и др.] // Ветеринарный консультант. – 2006. – №5. – С. 12 – 14.

386. Юров К.П. Болезни телят и их профилактика / Юров К.П. // Состояние, пробл. и перспективы развития вет. науки России: сб. матер. науч. сессии РАСХН, посвящ. 100-летию ВИЭВ. – М., 1999. – Т. 1. – С. 214 – 216.

387. Яковлев А.Ф. Развитие методов оценки генотипа сельскохозяйственных животных / А.Ф. Яковлев // Цитогенетика и молекулярная генетика сельскохозяйственных животных: сб. науч. тр. ВНИИРГЖ. – Л., 1987. – С. 5 – 17.

388. Яковлев Г.М. Резистентность, стресс, регуляция / Яковлев Г.М., Новиков В.С., Хавинсон В.Х. – Л.: Наука, 1990. – С. 238.

389. Achermann M. Herpesviruses / M. Achermann // Methods in Molecular Biology. – 2004. – Vol. 256. – P. 199 – 219.

390. Ambagala T.C. Induction of cytotoxic T-lymphocytes specific for bovine herpesvirus-1 by DNA immunization / T.C. Ambagala [et al.] // Vaccine. – 2002. – Vol. 20. – P. 3744 – 3751.

391. Anon calf losses are increasing Idaho / Idaho farmer. – Stokman, 1982. – 100. 11. 7.

392. Aplikacia Lactobacillus casei tel'atam s rozvinutou crevnou mikroflorou / A. Bomba [et al.] // Zivocisna Vyroba. – 1997. – Vol. 42, N8. – S. 355 – 360.

393. Ashbaugh S.E. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction / S.E. Ashbaugh [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 1997. – Vol. 9, N4. – P. 387 – 394.

394. Axelsson L. Lactobacillus reuteri, a member of the gut bacterial flora / L. Axelsson // Microb. Ecol. Health and Disease. – 1989. – Vol. 2, №2. – P. 466 – 468.

395. Bachvan P.A. Active Mutterschutzimpfund Passive Immunisierung von Neugeborenen Tierartl Umsch / P.A. Bachvan, W. Eichhorn, R.G. Hess // 1982. – Vol. 37, N10. – P. 684 – 703.

396. Beer M. Diagnostic markers in the prevention of bovine herpesvirus type 1: possibilities and limitations / M. Beer [et al.] // Berl Munch Tierarztl Wochenschr. – 2003. – Bg. 116, N5/6. – S. 183 – 191.

397. Beisel W.R. Single nutrients and immunity / W.R. Beisel // Amer. J. Nutr. – 1982. – Vol. 35, N2. – P. 34 – 38.

398. Benno J. Bifidoflora and microflora / J. Benno, T. Mitsuoka // Development of intestinal microflora in human and animals. – 1986. – Vol. 5, N1. – P. 13 – 25.

399. Boyle K.A. Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway / K.A. Boyle, R.L. Pietropaolo, T. Compton // Mol. Cell. Biol. – 1999. – Vol. 19. – P. 3607 – 3613.

400. Cerguiglini S. Rass. Clin. Sci. – 1974. – Vol. 50. – S. 4 – 5.

401. Chandra R.K. Single nutrient deficiency and cell mediated immune response. 1. Zinc / R.K. Chandra, B. Au // Amer. J. Clin. Nutr. – 1980. – Vol. 33. – P. 736 – 738.

402. Bacteriol J. Characterization of genetic elements required for site-specific integration of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus bacteriophage mv4 and construction of an integration-proficient vector for Lactobacillus plantarum // J. Bacteriol. – 1995. – N177 (3). – P. 586 – 595.

403. Chauhan R.M. Microecology and coimmunonutrition / R.M. Chauhan, R.P. Deolankar // *Ecoimmunonutrition* / Eds. R. Deolankar [et al.]; Indian Dietetic Association Pune. – 1997. – P. 11 – 19.

404. Cheng C.C. Effect of peptides and amino acid produced by *Lactobacillus casei* in milk on the acid production of bifidobacteria / C.C. Cheng, T. Nagasawa // *Japanese J of Zootechnical Sci.* – 1984. – 55 (5). – P. 339 – 349.

405. Cheng C.C. Growth stimulants for bifidobacteria produced by *Lactobacillus casei* / C.C. Cheng, T. Nagasawa // *D.S.A.* – 1985. – Vol. 47, N10. – P. 718.

406. Comportamento immunologic dell bovine gravid vaccinate Cen K 99 *E. coli* e dei rispettive / C. Valente [et al.] // *Clin. Vet.* – 1987. – Vol. 110, N4. – P. 276 – 282.

407. Cytokine applications in infectious diseases. In: eds. B. Goddeeris and I. Morrisons, *Cell-Mediated Immunity in Ruminants* / M. Campos [et al.] // CRC Press-Boca Ration. – 1994. – P. 229 – 240.

408. Davies M. Bacterial cells as antitumor agents in man / M. Davies // *Rev. Environ Health.* – 1982. – Vol. 4, N1. – P. 31 – 36.

409. De Clercq E. Molecular Targets for Antiviral Agents / E. De Clercq // *Pharmacology And Experimental Therapeutics.* 2001. – Vol. 297. – P. 1 – 10.

410 De Klerk H. C., Coetzee J. N. // *Nature (London).* 1967. Vol. 214

411. Deguchi Y. Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria / Y. Deguchi, T. Morishita, M. Mutai // *Agric. Biol. Chem.* – 1985. – N49 (1). – P. 13 – 19.

412. De Simone C. Effect of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood B-lymphocytes / C. De Simone, A. Ciardi, A. Grassi // *Immunopharmacol.* – 1992. – Vol. 14, N1 – 2. – P. 41 – 43.

413. De Simone C. Rethinking the role of probiotics for the prevention and treatment of enteropathies / C. De Simone [et al.] // *Probiotics: prospects of the use in opportunistic infections.* Old Herborn University Seminar Monograph /

Eds. R. Fuller [et al.]. *Inst. Microbiol. Biochem. Herbon-Dill, Germani, 1995.* – P. 67 – 80.

414. De Valdez G.F. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze dried lactic acid bacteria / G.F. De Valdez [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1985. – Vol. 49, N2. – P. 413 – 415.

415. Drago L. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin / Drago L. [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1997. – N153 (2). – P. 455 – 463.

416. Dunny G.M. Cell-cell communication in gram-positive bacteria / G.M. Dunny, B.A. Leonard // *Ann. Rev Microbiol.* – 1997. – N51. – P. 527 – 564.

417. Effects of housing and colostrums feeding on serum immunoglobulins, growth, and fecal scores of Jersey calves / Quigley III J. D. [et al.] // *J. Dairy Sc.* – 1995. – Vol. 78, N4. – P. 893 – 901.

418. Fadden K. Alteration in fecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements and dimethylhydrazine / K. Fadden [et al.] // *Cancer.* – 1998. – N40. – P. 2421 – 2426.

419. Fernandes C.F. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products / C.F. Fernandes, K.M. Shahani, M.A. Amer // *FEMC Microbiol. Rev.* – 1987. – Vol. 466. – P. 343 – 356.

420 Field testing genetically modified organisms: framework for decisions. National research Council. – Washington D.C.: National Acad. Press, 1989)

421. Freter R. // *Amer. J. Clin, nutrition.* – 1974. – Vol. 24, N12.

422. Freter R. Factors affecting – the colonization of the gut by *Lactobacilli* and other bacteria / R. Freter, M.E. De Macias // *Old Herborn University Seminar Monograph. N8. Probiotics of use in Opportunistic Infections.* – 1995. – P. 256 – 420.

423. Fuller R. // *J. Appl. Bacteriol.* – 1989. – Vol., N66/5. – P. 24.

424. Fuller R. Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health / R. Fuller, G.R. Gibson // *Clin. Microbiol. Infect.* – 1998: 4. – P. 477 – 480.
425. Fuller R. Probiotics in human medicine // *Gut.* – 1991; 32(4): 439 – 442.
426. Fuller R. Probiotics: the scientific basis / R. Fuller – London: Chapman S Hall, 1992. – P. 216 – 226.
427. Gay C.C. Escherichia coli and neonatal disease of calves / C.C. Gay // *Bacteriol. Reys.* – 1965. – Vol. 29, N1. – P. 75 – 101.
428. Gedek B.R. Zum Einsatz von probiotika beim kold / B.R. Gedek // *Tecrarztl. Unisch.* – 1990. – Vol. 45, N1. – S. 45 – 46.
429. Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria / Ed. M.J. Gasson and W.M. de Vos // Blackie Academic and Professional, Glasgow. – 1996. – P. 211 – 251.
- 430 Gibson GR, Beatty ER, Wang X, et al. (1995) Selective stimulation bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108, 975–982.
431. Gilliland S. E. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* towards intestinal and food-borne pathogens in associative culture / S.E. Gilliland // *FEMS Microbiol.Rev.* – 1990. – Vol. 87.
432. Gilliland S.E. Influence of consuming milks containing cells of *Lactobacilli acidophilus* on lasctose malabsorption in humans / S.E. Gilliland, H.S. Kim // *Abstr. Ann. Meet Am. Soc. Microbiol.* – 1981. – N27. – P. 200.
433. Gilliland S.E. Use of the Minitex system for characterizing lactobacilli / S.E. Gilliland, M.L. Speck // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1985. – N33. – P. 1289.
434. Goldberg I. Stability of lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid compositions / I. Goldberg, L. Eschar // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1977. – Vol. 33, N3. – P. 489 – 496.

435. Haggard D.L. Efficacy of a single annual booster inoculation of cows with *Escherichia coli* bacterin for preventing enteric colibacillosis in neonatal calves / Haggard D.L., Springer J.A., Vosdingh R.A. // *Vet. Med. Small. Anim. Clin.* – 1982. – Vol. 77, N40. – P. 1572 – 1577.

436. Haggard D.L. Evaluation of an *E. coli* Bacterien containing the K 99 antigen for preventing bovine neonatal enteric colibacteriosis / D.L. Haggard, D.W. Johnson, Y.A. Springer // *Vet. Med. Small. Anim. Clin.* – 1982. – Vol. 77, N9. – P. 1391 – 1394.

437. Hartmann H. Pathophysiologische Aspekte der Azidose bei durchfallkranken Kalbern / H. Hartmann, J. Berchtold, W. Hofmann // *Tierarztl. Umsch.* – 1997. – Jg. 52, N10. – S. 568 – 574.

438. Heckly R.J. Protection kinetics of additives on survival of lyophilized bacteria / R.J. Heckly, P.L. Dimmick // *Cryobiology.* – 1978. – Vol. 15, N6. – P. 654 – 658.

439. Heidenreich S. Macrophage activation by granulocyte/macrophage colony stimulating factor. Priming for enhanced release of tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E2 / S. Heidenreich // *J. Immunol.* – 1989. – Vol. 143. – P. 1198 – 1205.

440. Iance B.H. Attaching and effacing *Escherichia coli* infection as a cause of diarrhea in young calves / B.H. Iance, D.H. Francis, J.E. Collins // *J. Vet. Med. Small. Anim. Clin.* – 1990. – Vol. 196, N6. – P. 897 – 901.

441. Kailasapathy K. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp / K. Kailasapathy, J. Chin // *Immunol. Cell. Biol.* – 2000. – 78, N1. – P. 80 – 88.

442. Koniarova J. The effect of propionibacterium *acnes* on rumen fermentation in calves on milk nutrition / J. Koniarova, V. Kmet // *Folia vet.* – Kosice, 1993. – Vol. 37, N3/4. – P. 61 – 63.

443. Kurmann J.A. Starters for fermented Milks. Sect. 5: Starters with selected intestinal bacteria / J.A. Kurmann // *Bulletin of the IDF.* – 1988. – N227. – P. 55.

444. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Grows promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965; 147: 747-748

445. Lindgren S.E. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations / S.E. Lindgren, W.J. Dobrogosz // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1990. Vol. 87. – P. 149 – 164.

446. Lyons T.P., Fallon R.J. The probiotic concept: coming of age. *World Biotech Rept*, 1986 prot. Conf. San Francisco, 1986, pp 69–80.

447. Malih K.A. A new freeze-drying methods for preservation of nitrogen-fixing and other fragile / K.A. Malih // *J. Microbiol. Methods.* – 1988. – Vol. 8, tts 5. – P. 259 – 271.

448. Mars de Jong M.S. A gE-negative BHVI vaccine virus strain cannot perpetuate in cattle populations / M.C. Mars de Jong, J.T. Van Oirschot // *Vaccine.* – 2000 – Vol. 14, N18 (20). – P. 2120 – 2124.

449. Maruta K. Effects of *Bacillus subtilis* C-3102 intohe on fecal of sous and on diarrhea and mortality rete of their peglets / K. Maruta // *Anem. Sc. Technol.* – 1996. – Vol. 67, N5. – P. 403 – 409.

450. Mayr A. Control of acute viruses desiases of calves in the FRG / A. Mayr // *Vet. Sc. Communie.* – 1979. – Vol. 3, N1. – P. 3 – 19.

451. Mebus C. A. Calf diarrhea: Reproduced with a virus from a field outbreak / C.A. Mebus [et al.] // *The Agric. Exp. Station Research. University of Nebracka, Lincoln, Nebracka.* – 1969. – Bul. N233. – P. 1 – 16.

452. Mitsuoka I. Comparative studies on lactobacilli from faeces of man, swine and chickens / I. Mitsuoka // *Zbl. Bacteriol, parasitenk. infections krankh. Ung. Hyg.* – 1969. – 210, №1. – P. 52 – 64.

453. Mitsuoka T. Coidschmid informiert / T. Mitsuoka, A.Terada, Y. Morishit. – *Источник.* – 1973. – N23. – P. 2.

454. Moerman A. Control of calf diarrhea by monagement / A. Moerman // *Irist. Vet. News.* – 1984. – P. 13 – 19.

455. Morin M.P. Case of viral neonotal calf diarrhea in a Quebec dairy herd / M.P. Morin, F. Lamothe // *Can. Comp. Med.* – 1974. – Vol. 38, N3. – P. 236 – 242.

456. Muriana P.M. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. / P.M. Muriana, T.R. Klaenhammer // *J. Bacteriol.* – 1991. – N173. – P. 1779 – 1788.

457. Naylor J.M. Effect of psyllium on plasma concentration of glucose, breath hydrogen concentration and fecal composition in calves with diarrhea treated orally with electrolyte solutions / J.M. Naylor, T. Liebel // *Am. J. Vet. Res.* – 1995. – Vol. 56, N1. – P. 56 – 59.

458. Niedobitek G. Detection of viral DNA by in situ hybridization using bromodesoxyuridine-labeled DNA probes / G. Niedobitek, T. Finn, H. Herbst // *Amer. J. Pathol.* – 1989. – Vol. 131, N1. – P. 1 – 4.

459. Oggioni M.R. Bacillus spores for vaccine delivery / M.R. Oggioni [et al.] // *Vaccine.* – 2003. – Vol. 21, Suppl. 2. – P. 96 – 101.

460. OIE Home page. Accessed on 22 July 2004.

461. Ouwehend A.C. Probiotics: an overview of beneficial effects / A.C. Ouwehend, S. Salminen, E. Isolauri // *J. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, N2. – P. 63 – 72.

462. Paramithiotis E. Survivors of Bursal B cell production and emigration / E. Paramithiotis, M.J.H. Ratcliffe // *P. Sci.* – 1994. – Vol. 73. – P. 991 – 997.

463. Parker R. *Anim. Nutr. Health* / R. Parker. – 1974. – 29. – P. 4 – 8.

464. Pollmann D.S. Influence of *Lactobacillus acidophilus* inoculum on gnotobiotic and conventional pigs / D.S. Pollmann, D.M. Danielson, W.S. Uren // *J. Anim. Sci.* – 1980. – Vol. 51, N3. – P. 629 – 637.

465. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat / H. Ichikawa [et al.] // *Digestiv Dis. Sc.* – 1999. – Vol. 44, N10. – P. 2119 – 2123.

466. Rammelsberg M., Raider F. // *J. appl. Bacteriol.* 1990. Vol. 69, №2

467. Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus* / G. Reid // *J. Appl. and Environ. Microbiol.* – 1999. – Sept. – P. 3763 – 3766.

468. Rick Factors for fecal shedding of *Escherichia coli* 0157:H7 in dairy calves / L.P. Garber [et al.] // *Ann. Vet. Med. Assn.* – 1995. – Vol. 207, N1. – P. 46 – 49.

469. Rolfe R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health / R.D. Rolfe // *J. Nutrition.* – 2000. – 130. – P. 396 – 402.

470. Roife R. *Gastrointestinal, microbiology. Vol. 2. Gastrointestinal microbes and host interaction.* – Chapman and Hall, New-York, 1996.

471. Rowland I. Modification of gut flora metabolism by probiotics and oligosaccharides / I. Rowland // *Probiotics: prospects of the use in opportunistic infections. Old Herborn University Seminar Monograph / Eds. R. Fuller [et al.]. Inst. Microbiol. Biochem. Germany, 1995.* – P. 35 – 46.

472. Saif L. Enteric viral infections of calves and passive immunity / L. Saif, K.L. Smith // *Dairy Sc.* – 1985. – Vol. 68, N1. – P. 206 – 228.

473. Savade D.C. Microbiol. ecology of the gastrointestinal tract / D.C. Savade // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1977. – Vol. 31. – P. 107 – 133.

474. Schumm H. Ergebnisse des Einsatzes von Suiform bei Absatzferkeln zur Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der gesunden Darmflora / H. Schumm, R. Pohl, H. Willeke // *Tierarztl. Umsch.* – 1990. – Vol. 45, N6. – S. 402 – 411.

475. Snodgrass D.R. Development of calf diarrhea vaccines / D.R. Snodgrass // *Ann. Rech. Vet.* – 1982. – Vol. 119, N2. – P. 31 – 34.

476. Straub O.C. Bovine Herpesinfection / O.C. Straub // *VEB. Gustav Fischer Verlage. Jena.* – 1978. – S.100 – 115.

477. Tcherdyntsew N.V. It Sensitization Newsletter / Tcherdyntsew N.V., Utvjakov, N.V., Belyavskaya V.A. – 1998, October. – Vol. 5, N3. – P. 3 – 7.

478. Toride J. Effect of digested bacterial cell powder (DBCP) on performance of post weaning and sucking piglets / J. Toride, S. Srinongkote, N. Onishi // *Anim. Sc. Technol.* – 1998. – Vol. 69, N1. – P. 8 – 13.

479. Vanopdenbosch E. La diarrhee infectieuse des veaux: possibilites therapeutiques et preventives / E. Vanopdenbosch, P. Pohl // Elevages belges. – 1996. – N12. – P. 35 – 38.
480. Vergio F. Anti- and Probiotika. Hippokrates 1954; 4;116-119.
481. Von Wright A. Probiotics: established effects and open questions / A. Von Wright, S. Salminen // Europ. J. Gastroenterol. Hepatol. – 1999. – Vol. 1, N11. – P. 1195 – 1198.
482. Wellemans G. La prophylaxie de la diarrhea u canatale / G. Wellemans, E.V. Opdenboch // Elevages belges. – 1981. – Vol. 35, N10. – P. 10 – 11.
483. Wostmann. B.S. Gesmfree and gnotobiotic animal model. CRC Press, Boca Ration, F.L., 1996.
484. Yeni dogan ishalli buzagilarin klinik bulgulari ve asit-baz dengezi dikkate alinarak sodium bikarbonat ve elektrolitik sivilarla sagaltimi / M. Sahal [et al.] // Ankara niv. Vet. Fak. Derg. – 1994. – Cilt 41, sayi ¾. – S. 509 – 525.