

На правах рукописи

ВАСИЛЕВИЧ Сергей Федорович

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ
ПРОБИОТИКА-ЭНТЕРОСОРБЕНТА СОРБОЛИН
И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В СКОТОВОДСТВЕ**

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Москва – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина).

Научный руководитель - доктор биологических наук, профессор
Грязнева Татьяна Николаевна.

Официальные оппоненты:

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», главный научный сотрудник.

Усачев Иван Иванович, доктор ветеринарных наук, доцент, ФГБОУ ВО «Брянский государственный аграрный университет», профессор кафедры.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

Защита состоится: _____ 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) по адресу: 109428, Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1, тел. 8(495) 970-03-68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН - <http://viev.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук

Ездакова Ирина Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Проблема желудочно-кишечных болезней крупного рогатого скота, вызываемых бактериями, грибами и кокцидиями, до сих пор не решена, несмотря на разнообразие антибиотиков, пробиотиков, энтеросорбентов и кокцидиостатиков, представленных на рынке ветеринарных препаратов (Енгашев С.В., 2017; Панин А.Н., 2016; Малик Н.И., 2014; Субботин В.В., 2012 и др).

По данным Россельхознадзора, в скотоводческих хозяйствах падеж телят от бактериальной и грибной инфекции может достигать 30%. У новотельных коров кишечные инфекции, вызывают перитониты, маститы, эндометриты и др.

По сообщениям Иванова А.В. с соавт. (2010), в зимне-весенний период у крупного рогатого скота повсеместно наблюдаются микотоксикозы, которые провоцируют рождение нежизнеспособного потомства.

По данным Белкина Б.Л. с соавт. (2011) у телят все чаще стали диагностировать эймериоз, а кокцидионосительство у коров и нетелей в различных климатических зонах РФ достигает 30-50%.

Поэтому, изучение антимикробного действия и внедрение в ветеринарную практику новых препаратов против желудочно-кишечных болезней крупного рогатого скота с широким спектром антимикробного действия в отношении бактерий и грибов, являющихся эффективными энтеросорбентами микотоксинов и подавляющими рост и размножение кокцидий, является актуальной задачей для экономики страны.

Степень разработанности темы. Широкое использование в медицине и ветеринарии пробиотических препаратов на основе бацилл для профилактики желудочно-кишечных болезней и в качестве альтернативы антибиотикам, подтвердило их высокую эффективность и перспективность (Грязнева Т.Н., 2015; Смирнова Е.А., 2007; Ноздрин Г.А., 2011).

Наиболее перспективными видами бацилл в составе пробиотиков являются *V.subtilis* и *V.licheniformis* - продуценты ферментов и бактериоцинов. На их основе созданы многие препараты против кишечных инфекций и дисбактериозов – Ветом, Олин, Биоплюс, Биоспорин, Бактисубтил, Субалин и др. (Алексеев И.А., Волков А.М., Ефимова И.О., 2015 и др).

Доказана высокая эффективность при кишечных инфекциях и микотоксикозах энтеросорбентов на основе диоксида кремния, природных цеолитов, активированного угля и др. Такие сорбирующие препараты, как Энтеросгель, Полисорб МП, Белая

глина, Каопектат, Смекта, Неосмектин, Белый уголь и др. широко используются при микотоксикозах и токсикоинфекциях как людей, так и животных (Гревцев А.А., 2002; Голушко О.Г., Козинец А.И., 2013).

Среди кокцидиостатиков наиболее часто применяют Стопкокцид, Соликоккс, Кокцидивит, Байкоккс, Торукоккс. Однако все эти препараты имеют узконаправленное действие в отношении определенных возбудителей и их токсинов, а желудочно-кишечные болезни крупного рогатого скота, как правило, развиваются на фоне смешанных инфекций, паразитозов и отравления токсинами грибов.

Поэтому, многие ученые в РФ и за рубежом работают над созданием лечебно-профилактических препаратов разностороннего действия, применение которых способствовало бы освобождению организма от бактерий, грибов, токсинов и паразитов и было бы доступно широкому кругу потребителей.

Цель исследований: определить антимикробную активность пробиотика-энтеросорбента Сорболин и его компонентов и оценить эффективность применения препарата при желудочно-кишечных болезнях и микотоксикозах крупного рогатого скота.

Для решения были поставлены следующие **задачи:**

1. Определить антимикробное действие, физико-химические и биологические свойства компонентов пробиотика - энтеросорбента Сорболин.
2. Усовершенствовать метод определения количества пробиотических штаммов бактерий рода *Bacillus* в пробиотике-энтеросорбенте Сорболин.
3. Определить антимикробную активность Сорболина *in vitro* в отношении патогенных бактерий, грибов и простейших, вызывающих желудочно-кишечные болезни и микотоксикозы у телят.
4. Изучить биологические свойства Сорболина и разработать методы контроля качества препарата.
5. Изучить острую и хроническую токсичность Сорболина.
6. Определить эффективную дозу Сорболина при желудочно-кишечных болезнях телят.
7. Определить эффективность применения Сорболина при сальмонеллезе, микотоксикозе и эймериозе крупного рогатого скота.
8. Определить в сравнительном аспекте экономический эффект применения Сорболина при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят.

Научная новизна. Впервые определена антимикробная активность нового

отечественного пробиотика-энтеросорбента Сорболин на основе спорообразующих штаммов бацилл *Bacillus subtilis* ВКПМ 10172 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ 10135, полиминеральной породы Трепела из месторождения «Стальное» Хотимского района Могилевской области (Республика Беларусь) и лактозы, предназначенного для профилактики желудочно-кишечных болезней крупного рогатого скота, вызванных бактериями, микотоксинами и кокцидиями.

Доказано, что Сорболин не обладает острой и хронической токсичностью для животных и может являться аналогом антибиотиков широкого спектра действия.

Сорболин имеет уникальные биологические свойства, выгодно отличающие его от антибиотиков, пробиотиков и энтеросорбентов: подавление жизнедеятельности патогенных и условно-патогенных бактерий, в т.ч. эшерихий, сальмонелл, кандид и стафилококков, а также возбудителей эймериоза телят; стимуляция размножения лакто - и бифидобактерий; адсорбция и выведение из организма животных микотоксинов, обеспечение организма микро- и макроэлементами.

Определена высокая (90%) профилактическая эффективность Сорболина и его антимикробная активность при сальмонеллезе, микотоксикозах и эймериозе крупного рогатого скота. Сохранность больных животных, которых лечили Сорболином, составила 100%.

Усовершенствован метод десятикратных разведений бактериальных суспензий для определения в Сорболине количества бацилл-компонентов, позволяющий учитывать до 99,5% жизнеспособных бацилл в единице объема препарата при проведении контроля его качества.

Теоретическая и практическая значимость работы. Доказана высокая антимикробная активность и эффективность пробиотика-энтеросорбента Сорболин – универсального отечественного биопрепарата на основе антагонистически активных штаммов бацилл и природных ископаемых цеолитов и углеводов, обладающих антибактериальным, противогрибным и противоккокцидиозным действием, который может представлять альтернативу антибиотикам и кокцидиостатикам на рынке ветеринарных препаратов.

Для ветеринарной практики предложен экологически безопасный пробиотик-энтеросорбент Сорболин, предназначенный для профилактики сальмонеллеза, микотоксикоза и эймериоза у крупного рогатого скота.

Усовершенствованный метод определения количества бацилл-компонентов в Сорболине позволяет проводить контроль качества как пробиотиков, так и

вакцинных препаратов на основе бактерий рода *Bacillus*. Метод утвержден 22.06.2015 г. (№ 10118/217) Секцией зоотехнии и ветеринарии Отделения сельскохозяйственных наук РАН.

В опытах на телятах и коровах изучен механизм действия Сорболина при сальмонеллезе, микотоксикозе и эймериозе, дана оценка влияния препарата на микробиоценоз кишечника, гомеостаз организма крупного рогатого скота, показана высокая эффективность препарата, что подтверждено актами, утвержденными руководителями хозяйств Московской обл. (ООО «Правда», Истринского района), Тверской обл. (ОАО Агрофирма «Дмитрова гора», Конаковского района) и Краснодарского края (АО «Холдинговая компания – агрофирма «Россия» Тимашевского района).

Результаты исследований были использованы при разработке проекта нормативной документации на Сорболин – инструкция по применению, СТО, регламент производства препарата.

Разработаны и утверждены научно-исследовательским отделом ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина методические рекомендации «Экология патогенных бактерий и грибов», предназначенные для самостоятельной работы аспирантов по направлению подготовки 36.06.01 - Ветеринария и зоотехния.

Материалы работы используются в учебном процессе по дисциплине «Микробиология» в ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина.

Методология и методы исследований. Объектами количественных и качественных клинических, гематологических, микробиологических исследований являлись лабораторные (белые крысы, белые мыши, морские свинки, кролики) и сельскохозяйственные животные (козы, телята, коровы). В качестве лабораторно-клинических методов применяли бактериологический и микологический методы исследований биоматериала от больных животных; биохимический, гематологический и иммунологические методы анализа крови животных; физико-химические и микробиологические методы при изучении свойств пробиотика-энтеросорбента Сорболин и его компонентов.

Степень достоверности. Результаты работы были получены при использовании сертифицированного оборудования и определяются достаточным количеством проведенных исследований на большой выборке лабораторных и сельскохозяйственных животных. Опыты проведены в необходимой повторяемости для достоверности полученных данных экспериментальной работы, теория построена на известных и про-

веряемых данных и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации. Используются современные методики сбора исходной информации. Экспериментальные данные обработаны методом статистического анализа.

Соответствие паспорту специальности. Диссертационная работа выполнена в следующих областях исследований: морфологические, биологические, физико-химические свойства патогенных бактерий и токсигенных грибов; прикладные проблемы экологии микроорганизмов; культивирование бактерий и грибов; разработка, стандартизация, технология и контроль производства биопрепаратов на основе микроорганизмов; природа патогенности, явления, процессы и механизмы взаимодействия микро- и макроорганизмов в условиях воздействия экзогенных и эндогенных факторов; методы выделения микроорганизмов из патологического материала, средства и методы диагностики инфекционных болезней животных, индикация патогенных микроорганизмов; общие и специальные мероприятия по борьбе, профилактике и ликвидации инфекционных болезней животных; средства и методы лечения и лекарственной профилактики инфекционных болезней животных; источники возникновения микотоксикозов, их диагностика, лечение и профилактика.

Работа соответствует паспорту специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Апробация работы. Основные результаты работы изложены в отчетах НИР и доложены на IV Международном Агропромышленном молочном форуме (Московская обл., г. Красногорск, 2017) и на международных научно-практических конференциях «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии» (Москва, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, 2014), «Современные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных» (Москва, ФГБНУ ВИЭВ, 2016).

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 5 научных статей в журналах, рекомендованных ВАК (Ветеринария, зоотехния, биотехнология), методические рекомендации, утвержденные РАН и методические рекомендации, утвержденные научно-исследовательским отделом ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина.

Личный вклад автора. Автору принадлежат организация и непосредственное осуществление исследований по изучению антимикробной активности пробиотика-энтеросорбента Сорболин и его компонентов, изучению химического состава и био-

логических свойств препарата, разработке методов контроля препарата, определению острой и хронической токсичности Сорболина, лечебно-профилактической эффективности препарата против сальмонеллеза, микотоксикоза и эймериоза телят, совершенствованию метода определения количества бактерий рода *Bacillus* в новом пробиотике-энтеросорбенте Сорболин. В работе использованы материалы, полученные лично автором, а также в соавторстве:

- Шайбель А.Я. – главный технолог ООО «Пробиотик-Плюс», г. Москва (изучение биологических свойств бацилл-компонентов Сорболина);

- Максе Л.П. – химик-технолог ОДО «Трепел-М», заведующая лабораторией ИК-спектроскопии ресурсного центра УО «Могилевский государственный университет им. А.А.Кулешова», Республика Беларусь (изучение физико-химических и биологических свойств полиминеральной породы Трепел из месторождения «Стальное» Хотимского района Могилевской области, Республика Беларусь);

- Королев Д.А. – директор ЧУП «Аграриум», г. Минск, Республика Беларусь (применение Трепела для профилактики микотоксикозов у телят).

Всем соавторам выражаем глубокую благодарность за помощь и поддержку.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 164 страницах машинописного текста и включают введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, данные о практическом использовании полученных научных результатов, рекомендации по использованию научных результатов, список использованной литературы (180 источников, из которых 87 отечественных и 93 иностранных авторов). Работа содержит 34 таблицы, 27 рисунков, 13 страниц приложений.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту.

1. Результаты изучения антимикробной активности Сорболина в отношении патогенных бактерий, грибов и простейших, вызывающих желудочно-кишечные болезни у крупного рогатого скота.

2. Усовершенствованный метод последовательных десятикратных разведений для определения количества бацилл в пробиотических препаратах.

3. Результаты оценки лечебно-профилактической эффективности пробиотика-энтеросорбента Сорболин при сальмонеллезе, микотоксикозе и эймериозе крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа была выполнена в 2014-2018 г. на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина.

Пробиотик-энтеросорбент Сорболин, а также его компоненты (Хотимский трепел, культуры штаммов *Bacillus subtilis* ВКПМ 10172 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ 10135, наполнитель лактоза от разных производителей) были предоставлены разработчиком препарата ООО «Пробиотик-Плюс», г. Москва.

Изучение антимикробных и биологических свойств компонентов Сорболина, а также эксперименты на лабораторных животных проводили в лаборатории и в виварии кафедры микробиологии. Химический анализ компонентов и изучение физико-химических свойств Сорболина провели в ОДО «Трепел-М» (Республика Беларусь).

Исследования по определению эффективности Сорболина при сальмонеллезе и эймериозе телят проводили на базе ООО «Правда», Истринского района, Московской обл. и в АО «Холдинговая компания – агрофирма «Россия» Тимашевского района Краснодарского края. Производственные испытания Сорболина при микотоксикозах коров и телят проводили в ОАО Агрофирма «Дмитрова гора», Конаковского района, Тверской обл.

Для определения антагонистической активности бактерий-компонентов Сорболина были использованы культуры *E.coli*, *S.dublin*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *K.pneumonia*, *P.vulgaris*, *C.albicans*, *A. niger* из рабочей коллекции штаммов кафедры микробиологии ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина.

Острую и хроническую токсичность Сорболина изучали на лабораторных и сельскохозяйственных животных, в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (2015).

Лечебно-профилактическую эффективность Сорболина определяли на 90 телятах черно-пестрой породы в возрасте 2-3 дней; 40 телятах в возрасте 15-30 дней; 60 телятах в возрасте 3-4 мес., 50 коровах дойного стада.

Было отобрано и исследовано 20 проб Хотимского Трепела, 87 проб кормов, пораженных плесневыми грибами, 60 проб фекалий от телят.

В работе были использованы бактериологический, биологический, гематологический, иммунологический, биохимический методы; ИК-спектроскопия, оптическая микроскопия.

Исследование физико-химических и биологических свойств Хотимского трепела проводили по методам, описанным Голушко В.М., Козинец А.И. и Максе Л.П. (2013). Количество бацилл в 1 г препарата определяли общепринятым методом де-

сятикратных разведений, который был усовершенствован в процессе работы.

Антимикробную активность бацилл-компонентов Сорболина определяли по методикам, описанным в СТО 84120471-0005-2017 «Сорболин, технические условия», а также в Государственной Фармакопее ГФ XIII (2005).

Бактериологические исследования фекалий животных проводили согласно «Методическим рекомендациям по выделению и идентификации условно-патогенных энтеробактерий и сальмонелл при острых кишечных заболеваниях молодняка сельскохозяйственных животных» (2003).

Экспериментальные данные обрабатывали методом корреляционного, вариационного и факторного статистического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определение антимикробной активности компонентов пробиотика – энтеросорбента Сорболин, изучение их химического состава, физико-химических и биологических свойств

Результаты изучения свойств Хотимского трепела. При изучении химического состава Хотимского трепела (полиминеральная порода, добываемая на месторождении «Стальное» Хотимского района Могилевской области, Республика Беларусь) было установлено, что данный цеолит содержит более 40 микро- и макроэлементов, жизненно важных для животных.

Использование микроскопии в поляризованном свете позволило выявить наличие в трепеле минерала из группы смектитов, улучшающего работу желудочно-кишечного тракта животных (рис. 1).

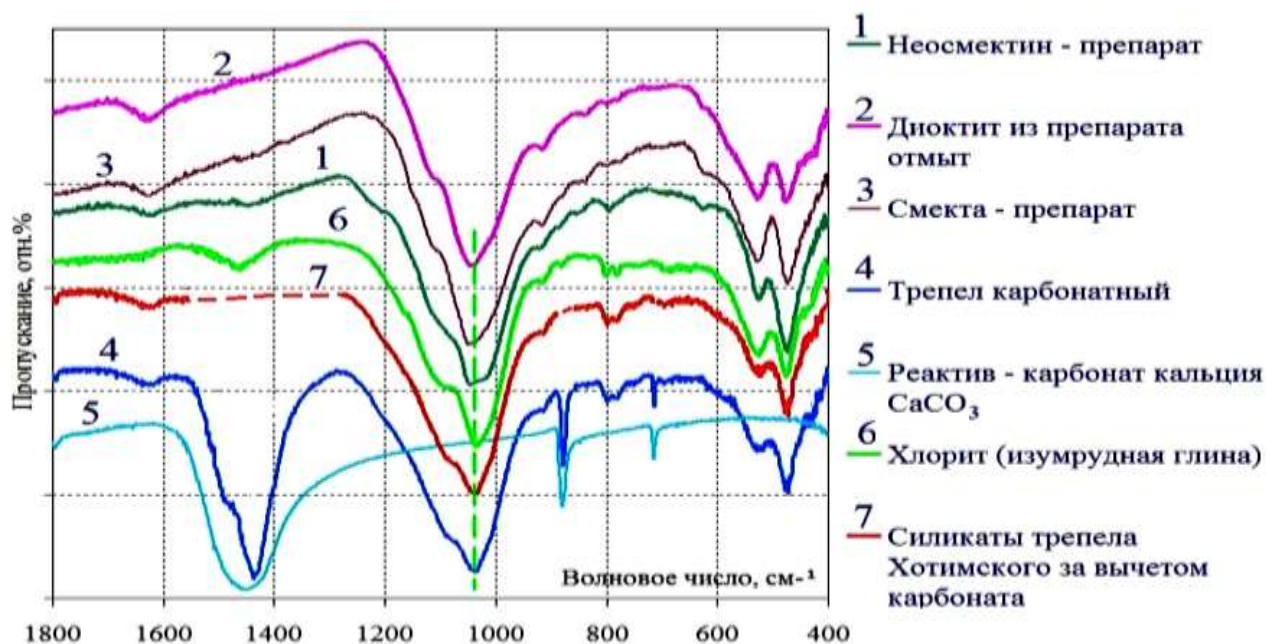


Рисунок 1 - ИК-спектры сравнительного анализа трепела

и фармацевтических препаратов

Благодаря смектитам, Трепел сорбиривал в течение 3-5 мин из водных растворов органические кислоты, газы, красители, силикагель. Методом «отмучивания» было доказано, что Трепел поглощает воду, вступая в конкуренцию с различными сорбирующими веществами органической природы.

Показатель адсорбции Хотимского Трепела составил 0,8 мг/г, активная площадь адсорбции - 43,3 м²/г, объем пор - 0,104633 мл/г, средняя ширина пор - 9,76488 нм., а емкость катионного обмена – 2,3 мг-экв/г массы.

Для изучения адсорбции органических веществ Трепелом в пробирки без дна на вату засыпали Трепел и добавляли избыточный объем водных растворов фуксина, метиленового голубого и суспензии дрожжей, а затем изучали состав растворов, прошедших через слой Трепела, и с помощью прибора ИнфраЛЮМ ФТ-02 регистрировали инфракрасные спектры адсорбированного осадка и фильтрата.

Установлено, что водные растворы красителей и микроорганизмов, прошедшие через слой Трепела, превращались в гелеобразное состояние. Дрожжи в геле сохраняли жизнеспособность, а красители полностью поглощались Трепелом.

Как следует из рис. 2, инфракрасные спектры водной суспензии Трепела и Трепела с мочевиной были практически идентичны, что свидетельствует о связывании мочевины. Поэтому, в организме животных Трепел образует органоминеральный комплекс хлорит-мочевину, что объясняет свойство Хотимского Трепела снижать содержание мочевины в сыворотке крови животных.

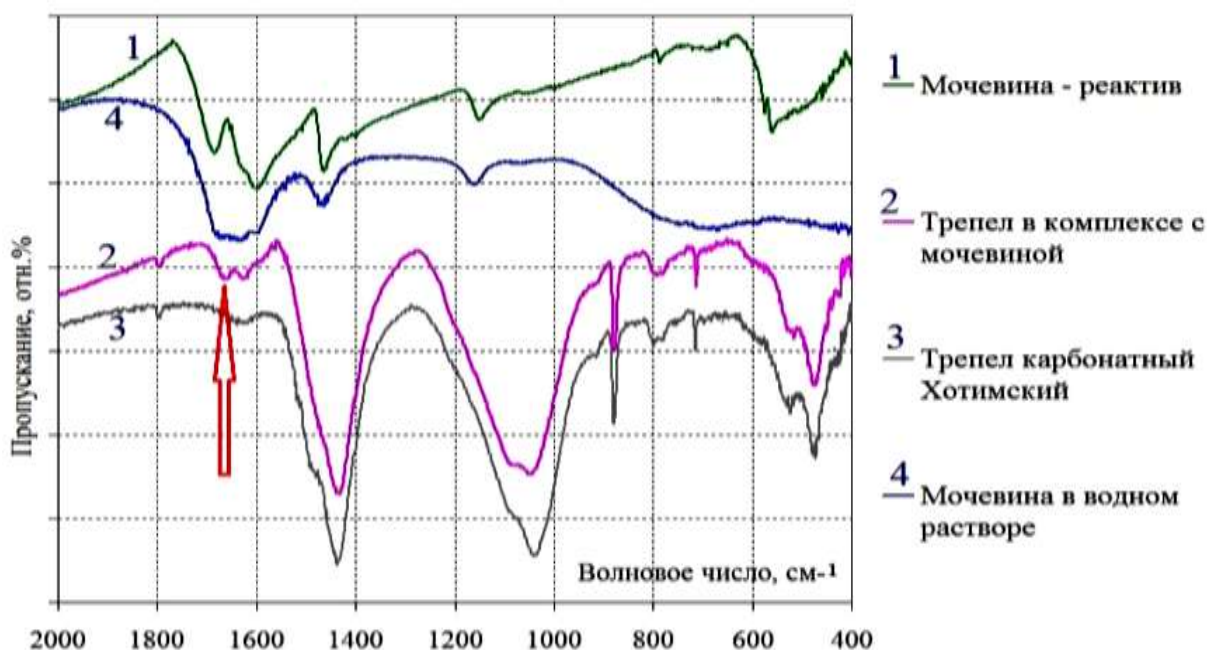


Рисунок 2 - Связывание мочевины Хотимским трепелом

Таким образом, обладая большой активной поверхностью в желудочно-кишечном тракте, Трепел способен адсорбировать аммиак, углекислый газ, метан, сероводород, углеводороды, воду, фенолы, экзо- и эндотоксины, тяжелые металлы, радионуклиды, гнилостные микроорганизмы, благодаря чему может предотвращать диарею.

Поэтому, трепел Хотимский является необходимым компонентом пробиотического препарата с энтеросорбирующим действием, т.к. захватывая с водой взвешенные в ней бактерии и грибы и сорбируя токсины, трепел обладает антимикробным и противотоксическим действием в отношении бактерий и грибов, а также синтезируемых ими токсинов как *in vivo*, так и *in vitro*.

Характеристика культур штаммов *Bacillus subtilis* ВКПМ 10172 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ 10135. При изучении антимикробного действия второго компонента Сорболина - пробиотических штаммов культур бацилл, мы оценивали их антагонистическую активность в отношении возбудителей инфекционных болезней животных, в т.ч. эшерихий, клебсиелл, сальмонелл, протеев, кандид и аспергилл.

Антимикробное действие у обоих штаммов изучаемых бацилл было наиболее выраженным в отношении эшерихий, сальмонелл, протеев и аспергилл. В отношении клебсиелл и кандид бациллы проявляли среднюю антимикробную активность.

Таблица 1 - Антимикробное действие бацилл-компонентов Сорболина в отношении энтеробактерий, дрожжеподобных и плесневых грибов

Культура штамма	Зоны угнетения роста патогенных бактерий и грибов, мм			
	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumonia</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
<i>B.subtilis</i> ВКПМ 10172	18±2	12±3	10±4	16±3
<i>B.licheniformis</i> ВКПМ 10135	15±3	10±2	8±1	21±4

Изучаемые бациллы обладали типичными для этих видов свойствами, высокой скоростью роста, фенотипической гетерогенностью, отсутствием факторов вирулентности, не нуждались в аминокислотах и витаминах, не проявляли взаимного антагонизма при совместном культивировании, споры прорастали в течение 2 ч., процесс споруляции длился 4-6 ч.

Уникальной особенностью бацилл *B.subtilis* ВКПМ 10172 и *B.licheniformis* ВКПМ 10135 являлась способность обоих культур расти как в аэробных, так и в анаэробных условиях, что позволяет отнести *B.subtilis* ВКПМ 10172 к факультативному аэробу, а *B.licheniformis* ВКПМ 10135 – к факультативному анаэробу.

При изучении антибиотикочувствительности изучаемых бацилл к широкому

спектру антибиотиков было установлено, что данные бациллы обладают множественной лекарственной устойчивостью и их можно применять в комплексе с другими препаратами для повышения эффективности лечения животных.

Определение микробной обсемененности лактозы–наполнителя Сорболина.

В качестве наполнителя Сорболина используется лактоза, как наиболее оптимальный компонент по энергетической ценности. Было приобретено по 5 кг лактозы из Германии, Франции, Литвы и Белоруссии.

Каждую партию лактозы изучали на микробную загрязненность (табл. 2).

Таблица 2 - Микробная обсемененность лактозы, используемой в составе пробиотика-энтеросорбента Сорболин

Страна-производитель	Выделенные микроорганизмы	КОЕ/г
Германия	-	-
Франция	-	-
Литва	<i>B.cereus</i>	185±24
	<i>A. niger</i>	55±10
Белоруссия	-	-

При изучении цены и качества лактозы было установлено, что лактоза французского производства является наиболее перспективной для включения в состав Сорболина, а применение лактозы литовского производства, обсемененной патогенными бактериями и плесневыми грибами, является недопустимым. Поэтому, нами были даны рекомендации разработчику и производителю Сорболина использовать в качестве наполнителя препарата лактозу производства Франции, а каждую партию лактозы исследовать на микробную загрязненность.

Изучение биологических свойств Сорболина. В результате проведенных исследований мы установили, что компоненты препарата Сорболин обладают антимикробными и сорбирующими свойствами, которые могут определять высокую лечебно-профилактическую эффективность препарата при бактериальных инфекциях, микозах и микотоксикозах крупного рогатого скота.

Для определения биологической активности Сорболина были проведены физико-химические, химические и биологические исследования препарата на содержание в нем аминокислот, бактериоцинов, ферментов, витаминов, микро-макроэлементов и других веществ. Установлено, что амилалитическая активность Сорболина составляет 53 ± 2 ед/мкл, протеолитическая - 41 ± 3 ед/мкл, пектолитическая - 43 ± 2 ед/мкл; содержание пептидов с антимикробными свойствами - до 460 мкг/г. Сорболин содержит также витамины группы В и комплекс микро-макроэлементов.

Разработка методов контроля качества Сорболина

Для определения качества Сорболина при его производстве были определены такие показатели, как внешний вид, цвет, запах (сухая пористая однородная масса от беловато-сероватого до серого цвета со специфическим запахом), суммарное количество жизнеспособных *B.subtilis* ВКПМ В-10172 и *B.licheniformis* ВКПМ В-10135 (не менее 2×10^9 КОЕ/г), соотношение их количества (1:1), массовая доля влаги (не более 4%), контаминация посторонними микроорганизмами (не более 1000 КОЕ/г сапрофитных бактерий), растворимость (гомогенная взвесь с осадком сероватого цвета), безвредность для белых мышей (должен быть безвреден), подлинность штаммов.

Показатели качества Сорболина и методы его контроля были использованы при разработке проекта инструкции по применению препарата, созданию стандарта предприятия на препарат СТО 84120471-0005-2017 и регламента промышленного производства.

Совершенствование метода определения количества бактерий рода *Bacillus* в пробиотике-энтеросорбенте Сорболин

Сорболин представляет собой многокомпонентную смесь, содержащую живые, но не активные бациллы в виде спор. При проведении контроля качества Сорболина одним из важнейших показателей является количество бацилл в 1 г сухого вещества.

Для измерения этого показателя применяется общеизвестный метод последовательных десятикратных разведений препарата в 0,85%-ом растворе натрия хлористого с последующим высевом микробной суспензии в чашку Петри с мясопептонным агаром. После (21 ± 1) ч инкубации при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ проводится подсчет выросших колоний и определяется количество живых бацилл в 1 г препарата.

Однако, данный метод позволяет учесть только те бациллы, которые перешли из споровой формы в вегетативную и через сутки культивирования на плотной среде образовали колонию, которая учитывается, как клон одной бактериальной клетки.

Мы установили, что от 10^2 до 10^5 спор бацилл, содержащихся в пробиотиках различных фирм-производителей, остаются в неактивной форме и не образуют на среде колонии. Следовательно, для подсчета доступны только те бациллы, которые проросли из спор и превратились в вегетативную форму. Поэтому, учитываются не все споры бацилл, и их количество в единице объема препарата по результатам измерения оказывается значительно меньше, чем есть на самом деле.

В процессе проведения работы по усовершенствованию метода определения ко-

личества бактерий рода *Bacillus* в Сорболине были изменены и оптимизированы несколько этапов и параметров метода десятикратных разведений (рис. 3).

Метод 10-кратных разведений



4,5 см³ 0,85%-ного раствора NaCl

Посев суспензии препарата на МПА сразу после разведения



Культивирование в течение 21 ч.

При подсчете КОЕ бацилл учитывают чашки Петри с МПА, на которых выросло не более 300 и не менее 15 колоний.

Усовершенствованный метод



4,0 см³ МПБ и 0,5 мл 10%-ного раствора Твин-80

Перед посевом суспензию препарата выдерживают 3 ч при 25-35°C



Культивирование в течение 45 ч.

При подсчете КОЕ бацилл учитывают чашки Петри с МПА, на которых выросло не менее 5 колоний.

Рис. 3 - Усовершенствованные этапы и параметры метода десятикратных разведений при определении количества жизнеспособных бацилл в Сорболине

По данной методике было исследовано 255 проб различных пробиотических препаратов (табл. 3).

Таблица 3 - Результаты исследований по определению количества бацилл в пробиотиках общепринятым и усовершенствованным методом

Пробиотический препарат	Кол-во исследованных проб	Количество бацилл, КОЕ/г		
		Нормативный показатель, не менее	Общепринятый метод	Усовершенствованный метод
Сорболин	228	$2 \cdot 10^9$	$(3,5 \pm 1,5) \cdot 10^8$	$(2,8 \pm 0,5) \cdot 10^9$
Олин	18	$2 \cdot 10^9$	$(1,5 \pm 1,0) \cdot 10^8$	$(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^9$
Ветом	9	10^6	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^5$	10^6

Как следует из данных таблицы, усовершенствованный метод позволил учесть количество бацилл на порядок больше, чем общепринятый. Метод является воспроизводимым, доступным и чувствительным и позволяет учитывать до 99,5% жизнеспособных бацилл в единице объема Сорблина.

Определение антимикробной активности Сорболина *in vitro* в отношении патогенных бактерий, грибов и простейших, вызывающих кишечные инфекции у телят

Антибактериальную и противогрибную активность Сорболина определяли в отношении бактерий *E.coli*, *S.dublin*, *S.aureus* и *P.aeruginosa* и плесневого гриба *A.niger* (рис. 4 и 5).

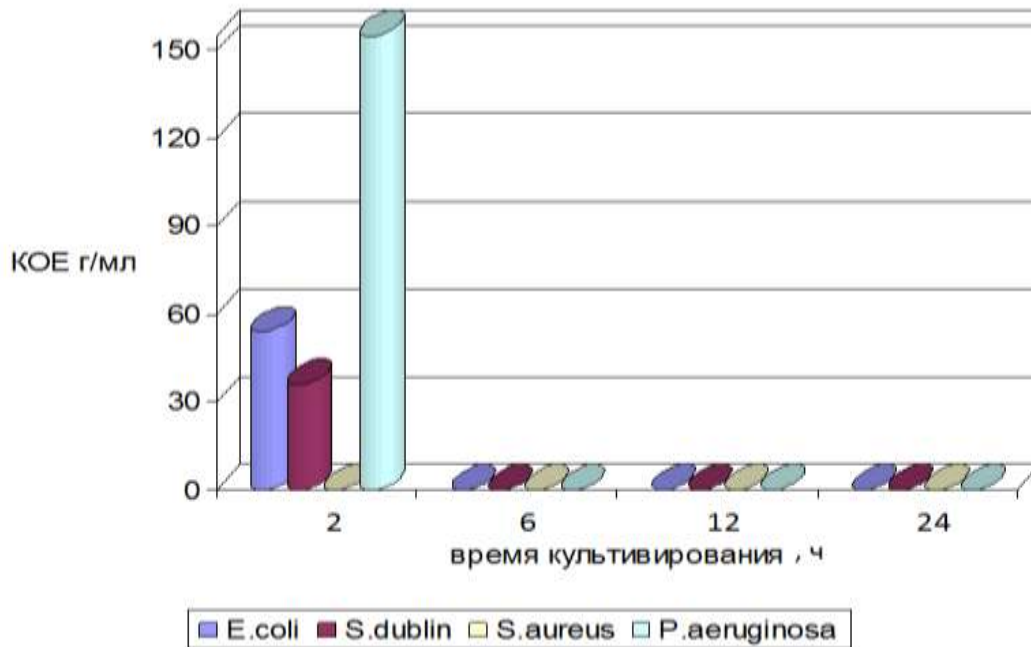


Рисунок 4 - Антибактериальная активность Сорболина

Через 2 часа воздействия Сорболина на бульонную культуру выживали единичные бактерии *E.coli* и *S.dublin*, а через 6 ч эшерихии, сальмонеллы и синегнойная палочка из суспензии не высевались.

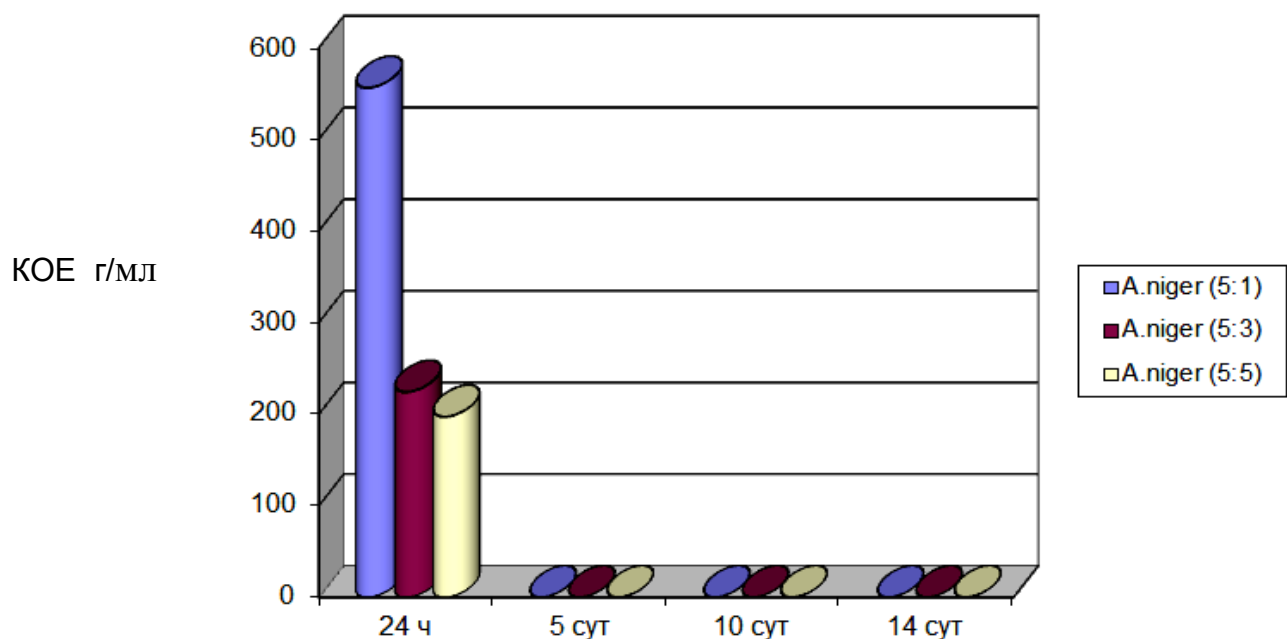


Рисунок 5 - Фунгицидная активность Сорболина

Через 24 ч воздействия одного мл Сорболина на культуру гриба, аспергиллы не погибали, однако количество их спор уменьшилась в 6295 раз, в сравнении с их количеством до постановки опыта. При добавлении в культуру аспергилл 3 и 5 мл Сорболина, через 24 ч инкубирования количество спор грибов уменьшилась в 15625 и в 17766 раз, соответственно.

Таким образом, Сорболин обладает высокой антибактериальной активностью и через 6 часов бульонные культуры эшерихий, сальмонелл, псевдомонад и стафилококков погибают после добавления к ним Сорболина в соотношении объемов препарата и бульонной культуры 1:5.

Сорболин проявляет высокую фунгицидную активность в отношении аспергилл уже через 24 ч воздействия на грибную бульонную культуру, через 5 суток аспергиллы в суспензии не обнаруживаются.

Определение противопаразитарной активности Сорболина в отношении эймерий. Из неблагополучного по эймериозу хозяйства на кафедру микробиологии были доставлены участки толстого отдела кишечника от 3 павших телят с клиническими признаками поноса с прожилками крови и вздутием живота.

Из кишечного содержимого павших телят были выделены эймерии в количестве (22±3) штук в 1 г фекалий. В суспензию эймерий вносили разведенный физраствором Сорболин в соотношениях 1:1 к объему суспензии и выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 60 мин. Затем в 10 полях зрения микроскопа подсчитывали количество живых эймерий.

Было установлено, что Сорболин обладает высокой противопаразитарной активностью *in vitro* в отношении эймерий при экспозиции 60 мин и соотношении препарата и суспензии паразитов 1:1 (табл. 4).

Таблица 4 - Результаты определения противопаразитарной активности Сорболина в отношении эймерий *in vitro*

№ п/п	Испытуемая проба	Количество паразитов в 10 полях зрения микроскопа
1	До начала постановки опыта	22±3
2	Опытная	7±2
3	Контрольная	28±6

При обработке суспензии эймерий Сорболином, их количество уменьшилось в 3 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, Сорболин обладает высокой антибактериальной, фунгицидной и противопаразитарной активностью *in vitro*.

Определение острой и хронической токсичности Сорболина

Сорболин был безвреден для лабораторных и сельскохозяйственных животных при накожном и пероральном применении, не проявлял аллергического действия при однократном и многократном использовании. При нанесении на кожу белым крысам LD₅₀ Сорболина составила более 14850 мг/кг.

Таким образом, Сорболин относится к 4 классу опасности (вещества малоопасные) для животных.

Определение эффективной дозы Сорболина при желудочно-кишечных болезнях телят

Для определения профилактической дозы Сорболина при кишечных инфекциях телят в неблагополучном по сальмонеллезу и эймериозу хозяйстве были сформированы 5 групп животных по 10 голов в каждой (табл. 5).

Таблица 5 - Профилактическая эффективность Сорболина при кишечных инфекциях телят

Группа животных	Кол-во животных	Доза, г/гол	Заболело		Профилактическая эффективность, %
			голов	%	
I опытная	10	1	2	20	80
II опытная	10	3	0	1	90
III опытная	10	5	0	0	100
IV опытная	10	10	0	0	100
Контрольная	10	-	7	70	-

Использование Сорболина в дозе 3 г 1 раз в день в течение 14 дней обеспечивало 90%-ную профилактическую эффективность, в дозе 5 г – 100%-ный эффект. У телят опытных групп наблюдалось стабильное клиническое состояние, энтеропатогенные бактерии в кишечнике не обнаруживались.

Для определения эффективной дозы Сорболина, применяемого в комплексе лечебных мероприятий, сформировали 4 группы телят 2-5- дневного возраста с признаками диареи (табл. 6).

Таблица 6 - Эффективность Сорболина при лечении телят с кишечными инфекциями

Группа животных	Кол-во жив.	Доза, г/гол	Выздоровело		Продолжит. болезни, дн.	Сохранность животных, %
			голов	%		
I опытная	10	5	10	100	5	100
II опытная	10	10	10	100	3	100
III опытная	10	15	10	100	5	100
Контрольная	10	-	8	80	7	80

Животным выпаивали разведенный кипяченой водой Сорболин 2 раза в день в течение 7 дней в дозах 5,0; 10,0 и 15,0 г. Наиболее эффективная терапевтическая доза Сорболина - 10 г при даче препарата 2 раза в день в течение 7 дней. В контрольной группе, где телят лечили антибиотиками, 2 головы пали. Использование Сорболина для лечения телят при кишечных инфекциях вызывало нормализацию состава крови и микробного пейзажа пищеварительного тракта животных.

Эффективность применения Сорболина при сальмонеллезе, микотоксикозе и эймериозе крупного рогатого скота

Сорболин при лечении телят, больных сальмонеллезом, способствовал 100%-ной сохранности животных, при даче препарата телятам с молоком 2 раза в день в течение 7 дней в дозе 10 г.

Для выведения из организма коров микотоксинов при добавлении в корма Сорболина из расчета 20 г на голову и даче препарата 1 раз в день в течение 30 дней, к 10 дню с начала постановки опыта клинические признаки микотоксикозов исчезали.

При лечении телят, больных эймериозом, применение Сорболина 1 раз в день в течение 10 дней, в дозе 20 г способствовало освобождению кишечника от паразитов.

Таким образом, Сорболин является эффективным средством в комплексной терапии крупного рогатого скота при кишечных инфекциях и микотоксикозах.

Определение экономической эффективности применения Сорболина при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят, в сравнительном аспекте

При расчете экономической эффективности применения Сорболина и Олина (по ценам 2017 г) было установлено следующее: стоимость 1 кг Олина составляет 800,0 руб, Сорболина - 748,0 руб; стоимость курса применения Олина - 144 руб, Сорболина – 134,0 руб; продолжительность болезни телят на фоне применения Сорболина на 2 дня короче, чем при использовании Олина, что дает экономию в 15,9 руб на гол.

Кроме этого, применение Сорболина позволяет отказаться от использования 100% кормовых антибиотиков и витаминов группы В; 50% микро- и макроэлементов; 30% аминокислот и белков; 60% ферментов.

Следовательно, экономическая эффективность применения Сорболина может быть еще выше, т.к. в хозяйстве уменьшаются расходы на приобретение различных лечебно-профилактических препаратов, витаминов и премиксов, уровень применения которых при использовании Сорболина снижается в среднем на 60%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы

1. Пробиотик-энтеросорбент Сорболин, содержащий культуры штаммов *B.subtilis* ВКПМ 10172 и *B.licheniformis* ВКПМ 10135 в споровой форме, в соотношении 1:1, в количестве не менее $2,0 \times 10^9$ КОЕ/г, Хотимский трепел и лактозу - по 50% к объему препарата обладает высокой антимикробной активностью в отношении бактерий, микотоксинов и кокцидий и является эффективным лечебно-профилактическим препаратом при сальмонеллезе, микотоксикозе и эймериозе крупного рогатого скота.

2. Биологические и минерально-углеводные компоненты, входящие в состав Сорболина, оказывают разностороннее действие на организм крупного рогатого скота – культуры бацилл *B.subtilis* ВКПМ 10172 и *B.licheniformis* ВКПМ 10135 обладают антагонистической активностью в отношении бактерий, грибов и простейших (в присутствии бацилл патогенные эшерихии, сальмонеллы и аэромонады погибают через 2 часа; количество спор Аспергилл через 24 ч уменьшается в 6295 раз; количество кокцидий через 60 мин уменьшается в 3 раза); Хотимский трепел является энтеросорбентом микотоксинов и паразитов (показатель адсорбции - 0,8 мг/г, активная площадь адсорбции - 43,3 м²/г, объем пор - 0,104633 мл/г, средняя ширина пор - 9,76488 нм., емкость катионного обмена – 2,3 мг-экв/г массы), лактоза - энергетический компонент и наполнитель препарата.

3. Сорболин не обладает острой и хронической токсичностью и является безопасным препаратом при введении в желудок, попадании на кожу и на слизистые оболочки лабораторных и сельскохозяйственных животных.

4. Усовершенствованный метод последовательных десятикратных разведений бактериальной суспензии при определении количества бактерий рода *Bacillus* в препарате Сорболин является доступным, воспроизводимым и чувствительным и позволяет учитывать до 99,5% жизнеспособных бацилл в единице объема препарата при проведении контроля его качества.

5. Использование Сорболина в дозе 3 г 1 раз в день в течение 14 дней обеспечивает 90%-ный профилактический эффект при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят.

6. При лечении телят, больных сальмонеллезом, Сорболин способствует 100%-ной сохранности животных при даче препарата телятам с молоком 2 раза в день в течение 7 дней в дозе 10 г. При лечении телят, больных эймериозом, применение

Сорболина 1 раз в день в течение 10 дней, в дозе 20 г способствует освобождению кишечника от паразитов.

7. При добавлении в корм лактирующим коровам Сорболина из расчета 20 г на голову и даче препарата 1 раз в день в течение 30 дней с целью выведения из организма коров микотоксинов, к 10 дню с начала постановки опыта клинические признаки микотоксикозов исчезают.

8. Экономическая эффективность применения пробиотика-энтеросорбента Сорболин выше препарата-аналога Олина, т.к. стоимость курса применения Сорболина меньше на 15,9 руб, а расходы на приобретение хозяйством антибиотиков, витаминов и премиксов могут быть снижены в среднем на 60%.

Практическое использование полученных научных результатов

1. Изучена антимикробная активность и устойчивость к антибиотикам культур штаммов *B.subtilis* ВКПМ 10172 и *B.licheniformis* ВКПМ 10135, применяемых в составе пробиотика-энтеросорбента Сорболин. В паспорта штаммов бацилл внесены изменения и штаммы депонированы в национальной коллекции DSMZ (Германия).

2. Пробиотик-энтеросорбент Сорболин на основе антагонистически активных штаммов бацилл и природных ископаемых цеолитов и углеводов, обладающих антибактериальным, противогрибным и противокочидиозным действием, может быть использован в качестве альтернативы антибиотикам и кокцидиостатикам при сальмонеллезе, микозах, микотоксикозах и эймериозе крупного рогатого скота.

3. Установленные антимикробные и физико-химические свойства Хотимского трепела и включение его в состав Сорболина позволило придать препарату адсорбционное, ионообменное, пролонгирующее действие, пополнение рационов макро- и микроэлементами. Сорболин способен адсорбировать в кишечном тракте животных углекислый газ, аммиак, метан, сероводород, фенолы, микотоксины, тяжелые металлы, радионуклиды, гнилостные микроорганизмы. Особенностью трепела Хотимского является также то, что он содержит железо в усвояемой, физиологически доступной форме, входящей в состав минерала группы смектитов, и способен снижать содержание мочевины в сыворотке крови животных.

4. Разработаны методы контроля качества Сорболина, которые используются при производстве препарата.

5. В опытах на телятах и коровах изучена антимикробная активность и механизм действия Сорболина при сальмонеллезе, микотоксикозе и эймериозе, дана оценка

влияния препарата на микробиоценоз кишечника, гомеостаз организма крупного рогатого скота, показана высокая эффективность препарата, что подтверждено актами, утвержденными руководителями хозяйств Московской обл. (ООО «Правда», Истринского района), Тверской обл. (ОАО Агрофирма «Дмитрова гора», Конаковского района) и Краснодарского края (АО «Холдинговая компания – агрофирма «Россия» Тимашевского района).

6. Разработан проект инструкции по применению Сорболина, утвержденный научно-исследовательским отделом ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина.

7. Результаты исследований использованы при разработке проектов стандарта предприятия СТО 84120471-0005-2017 «Сорболин» и Технологического регламента производства Сорболина, утвержденные генеральным директором ООО «Пробиотик-Плюс».

8. По результатам исследований разработаны и утверждены руководителем Секции зоотехнии и ветеринарии Отделения сельскохозяйственных наук РАН методические рекомендации «Усовершенствованный метод определения количества бактерий рода *Bacillus* в пробиотических препаратах».

9. Разработаны и утверждены научно-исследовательским отделом ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина методические рекомендации «Экология патогенных бактерий и грибов», предназначенные для самостоятельной работы аспирантов по направлению подготовки 36.06.01 - Ветеринария и зоотехния.

10. Результаты исследований используются в учебном процессе в ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина при изучении дисциплины «Микробиология».

Рекомендации по использованию научных результатов

1. Рекомендовать пробиотик-энтеросорбент Сорболин зооветеринарным специалистам и владельцам животных в качестве профилактического средства при желудочно-кишечных болезнях телят, вызванных энтеропатогенными бактериями, грибами и кокцидиями, а также как средство заместительной терапии при сальмонеллезе, микотоксикозах и эймериозе крупного рогатого скота после использования антибиотиков и кокцидиостатиков.

2. Методические рекомендации «Усовершенствованный метод определения количества бактерий рода *Bacillus* в пробиотических препаратах», утвержденные РАН РФ, рекомендуется использовать на биопредприятиях при определении КОЕ бацилл

в пробиотических и вакцинных препаратах.

3. Для профилактики сальмонеллеза и других бактериальных кишечных инфекций телят рекомендуется использовать Сорболин в дозе 3 г 1 раз в день в течение 14 дней с водой или с кормом. Для лечения больных телят Сорболин необходимо применять 2 раза в день, в течение 7 дней в дозе 10 г.

4. Для профилактики и лечения коров и телят при микотоксикозах рекомендуется применять Сорболин с кормом или водой из расчета 20 г на голову, при даче препарата 1 раз в день в течение 30 дней.

5. При эймериозе телят рекомендуется использовать Сорболин 1 раз в день в течение 10 дней в дозе 20 г на голову.

6. Результаты исследований рекомендуется использовать в учебном процессе в высших учебных заведениях по направлениям подготовки «Ветеринария» и «Зоотехния».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Грязнева Т.Н. Эффективность применения пробиотика СОРБОЛИН при инфекционных болезнях животных / Т.Н.Грязнева, С.Ф. Василевич //Прикладная микробиология.- 2014.- № 3.- С. 28-31.

2. Грязнева Т.Н. Усовершенствованный метод определения количества бактерий рода *Vacillus* в пробиотических препаратах: методические рекомендации / Т.Н. Грязнева, С.Ф. Василевич.- М.: ФГБОУ ВО МГАВМиБ– МВА имени К.И. Скрябина.- 2015.- 14 с.

3. Механизм антимикробного действия пробиотиков на основе бактерий рода *Vacillus* / Т.Н. Грязнева, Е.А. Смирнова, П.А. Игуменцев, С.Ф. Василевич // Труды ВИЭВ.- 2016.- Т. 79.- С. 128-136.

4. Грязнева Т.Н. Экология патогенных бактерий и грибов: методические рекомендации / Т.Н. Грязнева, С.Ф. Василевич.- М.: ФГОУ ВО МГАВМиБ– МВА имени К.И. Скрябина.- 2016.- 61 с.

5. *Василевич С.Ф. Антимикробная активность минерально-углеводной кормовой биодобавки для телят / С.Ф. Василевич //Ветеринария, зоотехния и биотехнология.- 2017.- № 1.- С. 97-99.

6. *Василевич С.Ф. Биологические свойства пробиотической минерально-углеводной кормовой добавки «Сорболин» и ее компонентов / С.Ф. Василевич //Ветеринария, зоотехния и биотехнология.- 2017.- № 8.- С. 56-62.

7. *Грязнева Т.Н. Антимикробная активность Сорболина *in vitro* в отношении бактерий, грибов и простейших, вызывающих кишечные инфекции у телят / Т.Н. Грязнева, С.Ф. Василевич, А.Я. Шайбель // Ветеринария, зоотехния и биотехнология.- 2017.- № 10.- С. 48-52.

8. *Определение количества жизнеспособных бактерий в пробиотике Сорболин с использованием усовершенствованного метода десятикратных разведений /Т.Н. Грязнева, Е.А. Смирнова, С.Ф. Василевич, С.-Ф.М. Борунова // Ветеринария, зоотехния и биотехнология.- 2017.- № 11.- С. 51-56.

9. * Грязнева Т.Н. Эффективность применения пробиотических кормовых добавок «Сорболин» и «Олин» при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят /Т.Н. Грязнева, Е.А. Смирнова, С.Ф. Василевич // Ветеринария, зоотехния и биотехнология.- 2018.- № 1.- С. 56-60.

*- издания, рекомендованные ВАК РФ