

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Якутский научный центр сибирского отделения
Российской Академии наук»
ЯКУТСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОГО
ХОЗЯЙСТВА ИМЕНИ М.Г. САФРОНОВА
(ЯНИИСХ)

На правах рукописи

РЕШЕТНИКОВА АЛЬБИНА ИВАНОВНА

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ
КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ
BACILLUS SUBTILIS, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МИКРОБИОТЫ ДИКИХ
КОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ**

4.2.2 Санитария, гигиена, экология, ветеринарно-санитарная экспертиза и
биобезопасность

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук, профессор
Надежда Петровна Тарабукина

Якутск - 2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота.....	13
1.2 Пробиотические кормовые добавки в скотоводстве	17
1.2.1 Кормовые добавки на основе лакто- и бифидобактерий.....	19
1.2.3 Кормовые добавки на основе бактерий рода <i>Bacillus</i>	21
1.2.4 Дрожжевые кормовые добавки	25
1.2.5 Поликомпонентные кормовые добавки	27
1.3 Технологические аспекты приготовления пробиотических добавок	29
1.4 Заключение по обзору литературы.....	31
ГЛАВА 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	34
2.1 Материалы и методы исследований	34
2.1.1 Объекты исследований	34
2.1.2 Методы, применяемые при работе с изолятами и штаммами бактерий <i>B. subtilis</i>	34
2.1.3 Методы, применяемые при разработке технологии получения кормовой добавки	38
2.1.4 Методы, применяемые при научно-хозяйственных опытах	40
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	42
3.1 Результаты исследований антагонистической активности изолятов <i>B. subtilis</i> , выделенных из микробиоты диких копытных животных	42
3.1.1 Изучение антагонистической активности изолятов <i>B. subtilis</i> в отношении условно-патогенных микроорганизмов.....	42
3.1.2 Определение ингибирующей активности <i>B. subtilis</i> в отношении условно-патогенных микроорганизмов.....	43
3.1.3 Изучение антагонистической активности изолятов <i>B. subtilis</i> в отношении плесневых и токсигенных грибов	45
3.2 Оценка биосовместимости отобранных изолятов <i>B. subtilis</i>	48
3.3 Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств изолятов <i>B. subtilis</i> 27L и <i>B. subtilis</i> 11K	49
3.4 Оценка вирулентности, токсичности и токсигенности изолятов <i>B. subtilis</i> 27L и <i>B. subtilis</i> 11K.....	51
3.5 Антибиотикочувствительность изолятов <i>B. subtilis</i> 27L и <i>B. subtilis</i> 11K.....	54
3.6 Молекулярно-генетическое подтверждение и депонирование штаммов бактерий <i>B. subtilis</i> 11K и <i>B. subtilis</i> 27L.....	56

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ.....	58
4.1 Разработка питательной среды для культивирования штаммов бактерий <i>B. subtilis</i> 27L VKPM В-14800 и <i>B. subtilis</i> 11K VKPM В-14816.....	58
4.2 Технология получения пробиотической кормовой добавки.....	64
4.3 Изучение безопасности пробиотической кормовой добавки	67
4.3.1 Исследования острой и хронической токсичности на лабораторных мышах.....	67
4.3.2 Исследования общей токсичности на простейших <i>Tetrahymena pyriformis</i>	69
4.4 Изучение стабильности пробиотической кормовой добавки	70
4.5 Расчёт экономической эффективности при применении новой питательной среды в технологии получения пробиотической кормовой добавки	71
4.6 Научно-хозяйственные опыты по применению пробиотической кормовой добавки	73
4.6.1 Применение ПКД «Пробисубтил» в рационе ремонтного молодняка крупного рогатого скота для профилактики желудочно-кишечных заболеваний	73
4.6.2 Применение ПКД «Пробисубтил» для профилактики и лечения диареи телят	77
4.6.3 Производственные испытания пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» .	80
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	98
ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	100
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	101
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	103
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	135

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Развитие животноводства, в частности, скотоводства, в экстремально холодных климатических условиях Якутии сопряжено с рядом специфических и системных вызовов, которые значительно ограничивают продуктивность и устойчивость отрасли. Продолжительный зимний стойловый период (до 8-9 месяцев в год), обусловленный суровыми природно-климатическими факторами, наряду с низким качеством и дефицитом кормовых ресурсов в этот период, приводит к критическому снижению иммунной резистентности животных. Кроме того, в северном скотоводстве регулярно наблюдаются дисбактериозы желудочно-кишечного тракта у молодняка крупного рогатого скота, что влечет за собой значительные экономические потери для аграрного сектора [62, 63, 76].

Эффективным и экологически безопасным решением данных проблем являются пробиотические кормовые добавки. Пробиотики не только стимулируют естественные защитные механизмы организма животных и улучшают их общее физиологическое состояние, но и способствуют формированию здоровой микрофлоры, оптимизируя пищеварение без риска развития антибиотикорезистентности [87, 114, 120]. В качестве основы для таких добавок особое внимание привлекают аэробные спорообразующие бактерии из рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*). Эти микроорганизмы обладают выраженной антагонистической активностью к широкому спектру условно-патогенных и патогенных микроорганизмов (бактерии, грибы и вирусы), интерферониндуцирующей и иммуностимулирующей активностью, а также способностью стимулировать рост и развитие полезной микрофлоры кишечника, в частности бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [43, 60, 89, 113].

С технологической точки зрения, штаммы рода *Bacillus* крайне неприхотливы: они эффективно растут как на синтетических, так и на простых питательных средах, обладают статусом GRAS (Generally Recognized As Safe) как безопасные микроорганизмы, стабильны при хранении и устойчивы к

оптимальным термическим воздействиям. Эти характеристики создают благоприятные условия для разработки инновационных и экономически эффективных биотехнологических решений с их участием [51, 108, 203].

Республика Саха (Якутия) обладает значительным потенциалом в области микробиологических ресурсов и активно развивающимися биотехнологиями в сельском хозяйстве. Именно в этих условиях, где проблема снижения иммунитета и дисбактериозов особенно остра, поиск и разработка местных, адаптированных решений становится критически важным. Исследования по выделению и использованию аборигенных штаммов микроорганизмов приобретают особую значимость, поскольку эти штаммы, сформировавшиеся в уникальных местных экстремальных условиях, обладают особыми характеристиками, которые могут обеспечивать повышенную эффективность в условиях Севера, а также представлять интерес для применения в других регионах благодаря своей устойчивости и широкому спектру действия. Многочисленные исследования подтверждают, что природа Якутии, в частности микробиом диких животных, богаты уникальным микробным сырьем – бактериями *B. subtilis*, перспективными для современной биотехнологии [15, 122, 123]. Более того, на базе Якутского НИИСХ разработаны биопрепараты из штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из мерзлотных почв Якутии, одним из которых является пробиотик «Сахабактисубтил», успешно применяемый при формировании и коррекции микробиоты сельскохозяйственных животных [13, 64, 115].

Таким образом, предлагаемая разработка биобезопасной технологии пробиотической добавки, помимо решения локальных проблем животноводства, отражает стремление к достижению стратегических национальных приоритетов, обозначенных в Указе Президента РФ «О Стратегии научно-технологического развития РФ» [66]. Она, в частности, соотносится с направлениями, касающимися «перехода к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, разработке и внедрению систем рационального применения средств... биологической защиты сельскохозяйственных растений и животных,

...созданию безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания».

Из вышеизложенного очевидно, что актуальность данной темы имеет не только фундаментальное научное, но и практическое значение для устойчивого развития животноводства.

Степень разработанности темы. Вопросы разработки и применения пробиотических кормовых добавок на основе бактерий рода *Bacillus* для молодняка крупного рогатого скота являются предметом активных исследований и широко освещены в мировой научной литературе. Многочисленные исследования подтверждают высокую эффективность применения штаммов *B. subtilis* в оптимизации пищеварения, укреплении иммунитета и повышении продуктивности животных [5, 105, 109, 124, 170, 185, 194].

В контексте наших исследований особый интерес представляют аборигенные штаммы бактерий *B. subtilis*, выделенные от копытных животных Якутии. Их свойства остаются малоизученными, что ограничивает возможности создания региональных пробиотических добавок, адаптированных к специфическим условиям региона. Кроме того, требует дальнейшего развития поиск технологических решений, позволяющих снизить производственные затраты и получить эффективные биологически активные пробиотические кормовые добавки.

Цель работы. Разработать технологию получения пробиотической кормовой добавки на основе штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из микробиоты диких копытных животных.

Для достижения поставленной цели в работе поставлены следующие задачи:

1. Провести отбор изолятов *B. subtilis*, выделенных из микробиоты диких копытных животных Якутии, по антагонистической активности для создания кормовой добавки, восстанавливающих нормальную микрофлору и подавляющих патогены.

2. Изучить безопасность отобранных изолятов *B. subtilis* путём оценки их вирулентности, токсичности, токсигенности для разработки пробиотической кормовой добавки на их основе.

3. Разработать технологию получения пробиотической кормовой добавки на основе отобранных штаммов *B. subtilis* для молодняка крупного рогатого скота.

4. Изучить безопасность пробиотической кормовой добавки, включая оценку острой, хронической и общей токсичности.

5. Провести научно - хозяйственные опыты по испытанию пробиотической кормовой добавки на молодняке крупного рогатого скота для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний.

Научная новизна. Впервые выделены, идентифицированы и депонированы в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов Научно-исследовательского центра «Курчатовский институт» штаммы бактерий *Bacillus subtilis* 27L (регистрационный номер: VKPM B-14800 от 06.09.2024 г.) и *Bacillus subtilis* 11K (регистрационный номер: VKPM B-14816 от 06.09.2024 г.).

Научная новизна разработок подтверждена тремя патентами Российской Федерации: RU 2849485 C1 «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 11K VKPM B-14816, используемый для изготовления пробиотической кормовой добавки» (приложение Е); RU 2857879 C1 «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM B-14800, используемый для изготовления пробиотической кормовой добавки» (приложение Ж); RU 2858896 C1 «Твердая питательная среда для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM B-14800 и *Bacillus subtilis* 11K VKPM B-14816» (приложение И).

Теоретическая и практическая значимость работы. В ходе работы получены новые данные о штаммах бактерий *B. subtilis* 11K VKPM B-14816 и *B. subtilis* 27L VKPM B-14800, выделенных из микробиоты диких копытных животных Якутии, для использования в качестве основы пробиотической кормовой добавки.

Штаммы бактерий *B. subtilis* 27L VKPM B-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM B-14816 депонированы в БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» в порядке международного патентного депонирования.

Предложена новая питательная среда для культивирования *B. subtilis*, состоящая из 3 % овсяного отвара, 1 % хлорида натрия, 0,5 % дрожжевого автолизата и 1,1 % пищевого агар-агара. Среда позволяет добиться роста *B. subtilis* из инокулята с разведением на порядок ниже контрольного уровня в течение 24 часов. При этом физиолого-биохимические свойства штаммов проявляются более отчётливо, чем при культивировании на стандартном мясо-пептонном агаре (МПА).

Разработана пробиотическая кормовая добавка «Пробисубтил» предназначенная для профилактики и лечения дисбактериозов, способствующая нормализации микробиоты желудочно-кишечного тракта в период перехода к заменителям цельного молока (ЗЦМ), а также повышению сохранности поголовья молодняка крупного рогатого скота.

Материалы диссертационной работы вошли в методические пособия: «Изготовление и использование питательных сред на основе овсяного отвара для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis*» - Якутск, 2025 г. (утв. Ученым советом ЯНИИСХ, протокол № 5 от 18.09.2025 г.) и «Технология приготовления и применения кормовой добавки «Пробисубтил» для молодняка крупного рогатого скота» - Якутск, 2026 г. (утв. Ученым советом ЯНИИСХ, протокол №2 от 12.03.2026 г.).

Материалы данной диссертационной работы могут быть использованы: в производстве пробиотических препаратов и кормовых добавок; в научной среде - в рамках научно-исследовательской деятельности; в образовательном процессе ветеринарных и сельскохозяйственных учебных заведений, включая курсы повышения квалификации.

Методология и методы исследования. Диссертационная работа выполнена в лаборатории по разработке микробных препаратов Якутского научно-исследовательского института сельского хозяйства имени М.Г.

Сафронова, который является обособленным подразделением Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Якутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук».

Методологической основой проведенных исследований послужил комплексный анализ научных трудов отечественных и зарубежных ученых, дополненный собственными экспериментальными данными.

При выполнении исследований использованы следующие методы: бактериологические, микробиологические, биологические, молекулярно-генетические, токсикологические, гистологические, биохимические, экономические и статистические.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

По специальности 4.2.2. Санитария, гигиена, экология, ветеринарно-санитарная экспертиза и биобезопасность диссертационная работа выполнена в следующих направлениях:

1. Теоретическое обоснование и разработка комплекса зоогигиенических мероприятий по повышению продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы, их устойчивости к инфекционным, инвазионным и незаразным болезням.

2. Теоретическое обоснование и разработка способов (технологий) получения экологически чистых кормов и продуктов питания животного происхождения.

3. Изучение механизмов токсического действия (острой и хронической токсичности, кожно-резорбтивного, кожно-раздражающего, аллергенного действия, кумуляции, эмбриотоксического, гонадотоксического, тератогенного и мутагенного действия) химических, биологических, других средств защиты животных на патогенные микроорганизмы, насекомых, клещей и грызунов.

4. Разработка технических средств и систем для мониторинга, контроля и аудита потенциально опасных объектов для обеспечения защиты работающего персонала и животных от биологических факторов. Разработка методов и

средств индикации и идентификации биологических агентов в объектах внешней среды, технологий производства нового поколения средств защиты животных от биологических агентов, современных средств диагностики, профилактики и лечения животных, пострадавших от воздействия биологических факторов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты отбора перспективных природных изолятов *Bacillus subtilis* по безопасности, антагонистической активности, антибиотикочувствительности для дальнейшего использования в составе пробиотических добавок.

2. Технология получения опытного образца пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» на основе штаммов бактерий *B. subtilis* 11K VKPM B-14816 и *B. subtilis* 27L VKPM B-14800, выделенных из микробиоты диких копытных животных Якутии.

3. Результаты комплексной оценки контроля качества и стабильности, безопасности новой пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил», включающие данные по острой, хронической и общей токсичности.

4. Результаты научно-хозяйственных опытов и производственных испытаний по применению пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» на молодняке крупного рогатого скота.

Вклад автора. Автор лично принимал активное участие на всех этапах исследования: поиске и анализе литературы, постановке цели и задач исследования, подборе исследовательских методик, планировании, организации и проведении исследований, статистической обработке результатов, а также в подготовке материалов для публикаций и их апробации.

Степень достоверности и апробация результатов. При выполнении диссертационной работы использовались действующие нормативно-технические документы, в которых изложены методики проведения исследований, общепринятые методы в микробиологии, разработки питательных сред и пробиотических препаратов, а также правила доклинических и клинических испытаний. Все исследования проводились с использованием

сертифицированного оборудования и с применением статистической обработки данных.

Обработку числовых данных производилась с использованием программы «Microsoft Excel» и включала расчеты средних арифметических значений, коэффициента вариации и достоверности различия сравниваемых показателей с использованием критерия Стьюдента. Исследования по молекулярно-генетической идентификации и депонированию штаммов, общей токсичности пробиотической кормовой добавки (ПКД) на простейших *Tetrahymena pyriformis*, а также гистологические исследования, представленные в работе, проводились в аккредитованных лабораториях и БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовском институте».

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих мероприятиях: заседаниях Ученого совета ЯНИИСХ в период с 2022 по 2026 гг.; Научно-практической конференции «Ларионовские чтения-2023» (17 февраля 2023 г., Якутск); XXVI Международном научно-практическом форуме «Аграрная наука – сельскохозяйственному производству Евразии», посвященном памяти академика Б. Бямбаа (6-7 ноября 2023 г., Улаанбаатар, Монголия); Республиканской научной конференции «Аспирантские чтения-2023» (23 ноября 2023 г., Якутск); Международной научно-практической конференции «Достижения и проблемы ветеринарной медицины на Крайнем Севере Российской Федерации», посвященной 115-летию организации Якутской бактериологической лаборатории и проведению научных исследований по ветеринарной медицине в Якутии (7-8 декабря 2023 г., Якутск); II Арктическом конгрессе «Арктика – территория стратегических научных исследований» (20-22 сентября 2024 г., Якутск); V Молодежной конференции Федерального исследовательского центра «Якутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (8 ноября 2024 г., Якутск); Молодежной технологической конференции «Biomed Polygon» в рамках XV Национального конгресса с международным участием «Экология и здоровье человека на Севере» (11 ноября 2024 г., Якутск); Международной научно-практической

конференции «Прошлое, настоящее и будущее ветеринарной науки Сибири», посвященной 85-летию основания Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока. (18-19 июня 2025 г., Новосибирск); Международной научной конференции «Приоритетные направления повышения эффективности, конкурентоспособности и устойчивости аграрной отрасли», посвященной 105-летию ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН (10-11 июля 2025 г., Казань).

Публикации результатов исследований. Результаты диссертационных исследований опубликованы в 14 научных работах, включая 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и публикации, приравненные к рецензируемым - 3 патента РФ, а также 2 методические пособия и 5 работ в сборниках научных трудов и материалах конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 157 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, методы исследования, описание собственных исследований, результаты исследований, обсуждение полученных данных, заключение, практические рекомендации, список использованных источников и приложения. Иллюстративный материал представлен 4 рисунками и 21 таблицами. Список литературы включает 204 источников, из них 66 иностранных авторов.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота

Молодняк крупного рогатого скота играет ключевую роль в сельскохозяйственном производстве и животноводстве, представляя собой потенциал для формирования высокопродуктивных стад и открывая экономические возможности для фермеров и хозяйств, специализирующихся на производстве натуральных и безопасных продуктов, таких как молоко и мясо [9, 61, 126]. Основные задачи при выращивании молодняка включают обеспечение его сохранности и увеличение массы за счет правильного содержания и надлежащего ухода [80, 133].

Развитие микробиома новорожденных телят до отъема определяется как прямыми, так и косвенными факторами, среди которых взаимодействие с матерью, окружающая среда, рацион, условия содержания и практика отъема. Некоторые из этих факторов могут быть стрессовыми и определять колонизацию кишечника микроорганизмами, что может иметь долгосрочные последствия [177].

Сохранность поголовья зависит от нормальной микрофлоры, формирующейся с момента рождения. Жвачные животные рождаются с неразвитым, нефункциональным рубцом. Вопреки заблуждениям, жвачные животные не рождаются со стерильным желудочно-кишечным трактом. Во время родов теленок подвергается воздействию микробов из вагинального канала и промежности, к которым относятся микроорганизмы, такие как *Truoperella pyogenes* и виды родов *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ureaplasma* и *Mannheimia*. Микробиота теленка продолжает колонизироваться микробами, поступающими из кожи во время сосания и из полости рта во время вылизывания. Это приводит к появлению бактерий, обычно встречающихся на коже вымени, *Citrobacter* spp. и *Leuconostoc* spp., которые были обнаружены в желудочно-кишечном тракте телят уже через 6 ч после рождения. В дополнение к видам бактерий, интродуцированным от матери теленка, эукариотические

виды, простейшие (например, *Entodinium*) и грибы (например, *Neocallimastix*), обнаруженные в ЖКТ, заводятся через слюну, когда мать вылизывает своего теленка [153, 155]. Микробиомы рубца коров и телят имеют общие свойства, что подтверждает возможность направленного изменения микробиома рубца телят путем управления состоянием коровы во время стельности [198, 204].

Организация кормления телят в послеродовой период и до отъема от матери оказывает существенное влияние на их рост, развитие, здоровье и благополучие. Немедленная и достаточная подача молозива после рождения является необходимым условием для успешного выращивания, так как оно богато питательными и непитательными факторами, способствующими развитию иммунной системы и кишечника теленка. Потребление молозива запускает анаболические процессы и стимулирует постнатальный рост и развитие органов. После молозивного периода для реализации полного потенциала роста требуется интенсивное кормление молоком — не менее 20% от массы тела в день. Недостаточное потребление молока замедляет рост и негативно сказывается на развитии органов. Соматотропная ось, регулирующая рост, стимулируется высоким потреблением молозива и молока, способствуя анаболическому метаболизму [156, 195].

Важным элементом пищеварительной системы жвачных является рубец — уникальная взаимодействующая и меняющаяся экосистема. Его микроорганизмы жизненно важны для поддержания жизнедеятельности и продуктивности, поскольку они эффективно расщепляют и усваивают трудноперевариваемую клетчатку, обеспечивая до 70% энергии и 60–85% аминокислот. Рубец населяют преимущественно бактерии, но относительно крупные простейшие могут составлять до 40–50% от общего числа микроорганизмов [165]. Созревание преджелудка у телят до отъема, стимулированное потреблением твердого корма, вызывает резкое изменение микробиома кишечника при переходе с молочного рациона на твердое питание [157]. Разнообразие и состав микробных сообществ, колонизирующих нижние отделы желудочно-кишечного тракта, оказывают значительное влияние на рост,

развитие теленка, его метаболизм питательных веществ, иммунную модуляцию, устойчивость или восприимчивость к инфекциям, а также на продуктивность и поведение во взрослом возрасте [147]. Формирование здорового микробиома рубца также влияет на качественные характеристики продукции: изучается его влияние на накопление жировой ткани и мраморность мяса [168, 171, 188]. Например, отдельные бактерии рубца, такие как *Moryella*, связаны с высоким содержанием внутримышечного жира в говяжьих тушах [159].

Традиционно, индивидуальное содержание телят для биобезопасности ограничивает их активность и социальное взаимодействие. Исследования показывают, что групповое содержание благоприятно влияет на благополучие телят [139]. Однако совместное содержание, скученность и неоптимальный микроклимат в коровниках могут приводить к высокому уровню использования противомикробных препаратов и повышенной смертности [143].

Одним из наиболее серьезных вызовов в животноводстве является диарея у телят, которая является распространенной проблемой и основной причиной смертности среди молодняка в течение первого месяца жизни (около 5%), приводя к значительным экономическим потерям и долгосрочным негативным последствиям, включая задержку первого отела и нарушение роста [169]. Диарея новорожденных телят (ДНТ) — это многофакторное заболевание, к которому телята особенно восприимчивы из-за кишечных инфекций и дисбактериоза микробиома [103, 149, 191]. При диарее у больных телят в микробиоте кишечника отмечается более низкое бактериальное разнообразие [119, 151, 167]. Диарею связывают с переходом от облигатных к факультативным анаэробам и увеличением количества бактерий, вырабатывающий лактат, что приводит к ацидемии, снижению концентрации бикарбоната и увеличению количества ацидогенных бактерий [154]. В большинстве случаев ДНТ наблюдается совместное появление нескольких патогенов, часто вирусных агентов и *Cryptosporidium parvum* [178]. Патогенная *Escherichia coli*, вызывающая более 50% смертности от диареи, значительно изменяет состав микробиоты, увеличивая количество протеобактерий и патогенных *E. coli* и *Shigella*, при

одновременном снижении фирмикутов, лактобактерий и короткоцепочечных жирных кислот [158]. Выявление биомаркеров дисбиоза на разных стадиях развития открывает новые возможности для возрастоспецифической пробиотической терапии и ранних вмешательств [202].

Терапия заболеваний у телят и взрослого скота привело к устойчивости к антибиотикам. Помимо лечения, факторами, способствующими формированию устойчивости, являются применение заменителей цельного молока, содержащих антибиотики, и кормление нетоварным или отработанным молоком [34, 144, 148, 184, 192, 201].

Гены устойчивости к антибиотикам повсеместно признаны новыми загрязняющими веществами, происходящими из разнообразных источников. Установлено, что существенным источником этих генетических элементов, способствующих распространению устойчивых микроорганизмов, являются животноводческие комплексы, где использование кормов и ветеринарных препаратов, содержащих антибиотики, приводит к их накоплению в навозе. Оттуда устойчивые микроорганизмы широко распространяются в окружающей среде, контаминируя сельскохозяйственные почвы, водные объекты и атмосферу, что создает потенциальную угрозу как для экологических систем, так и для здоровья человека [152, 162, 163]. Многочисленные исследования подтверждают повсеместное распространение множественной устойчивости к тетрациклину, ампициллину и другим антибиотикам в различных регионах мира [140, 142, 145, 187].

Проблема антибиотикорезистентности требует поиска безопасных альтернатив для лечения и профилактики инфекционных заболеваний, а также для сокращения распространения устойчивости к антибиотикам среди бактерий и других организмов. Понимание взаимосвязей между микробиомом желудочно-кишечного тракта, факторами внешней среды, развитием иммунитета и формированием антибиотикорезистентности позволяет разрабатывать эффективные стратегии профилактики распространенных заболеваний, таких как диарея, и снижать потребность в антимикробных препаратах.

В связи с этим возникает потребность в разработке альтернативных антибиотикам методов модуляции желудочно-кишечного тракта телят, например, путем введения в рацион пробиотических добавок.

1.2 Пробиотические кормовые добавки в скотоводстве

В течение многих лет кормовые добавки на основе антибиотиков показывали многообещающие результаты, однако их использование в кормах для животных было запрещено из-за опасений общественности по поводу их остатков в молоке и мясе животных, получавших такие добавки. Некоторые микроорганизмы, обладающие полезными свойствами, рассматриваются как перспективная альтернатива антибиотикам для улучшения здоровья кишечника и ферментации в рубце. Обычно оцениваются такие микроорганизмы, как некоторые виды бактерий и дрожжей. Добавление микроорганизмов в рацион жвачных животных улучшает их здоровье, пищеварение, ферментацию в рубце, продуктивность (мясную и молочную) и эффективность использования корма. Кроме того, добавление микроорганизмов в рацион помогает телятам быстро адаптироваться к потреблению твёрдого корма и предотвращает рост популяций кишечных патогенов в желудочно-кишечном тракте, вызывающих диарею [166].

Существует различные классификации микроорганизмов, используемых в качестве основы пробиотических кормовых добавок и пробиотиков, но можно выделить четыре основные группы:

1. Бактерии, продуцирующие молочную и пропионовую кислоты (рода *Lactobacterium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* и др.);
2. Спорообразующие аэробы рода *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*);
3. Дрожжи, которые чаще всего используются в качестве сырья при производстве пробиотиков (род *Saccharomyces*);
4. Комбинации этих микроорганизмов.

По мнению ряда исследователей, микроорганизмы, претендующие на статус пробиотиков, должны соответствовать строгим критериям. К ним

относятся: выделение штаммов из природных субстратов и их точная идентификация до вида по фено- и генотипическим признакам с наличием генетического паспорта. Важно, чтобы штаммы обладали широким спектром антагонистической активности против патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, не угнетая при этом нормальный микробиоценоз. Они должны оказывать положительный эффект на организм хозяина, например, повышая противоинфекционную резистентность. Необходимым условием является наличие жизнеспособных клеток или продуктов их метаболизма в составе пробиотика. Микроорганизмы должны демонстрировать способность к выживанию и активной жизнедеятельности в условиях кишечного микроокружения, что подразумевает резистентность к низким значениям pH, органическим кислотам, высокому содержанию желчи и солей натрия. Также они должны быть способны к быстрому размножению и/или адгезии на эпителиальных клетках кишечника с последующей колонизацией. Критически важны непатогенность и нетоксичность, а также безопасность для людей, включая иммунологическую безопасность. Наконец, производственные штаммы должны быть стабильны по биологической активности, сохранять жизнеспособные бактерии в течение длительного срока хранения и удовлетворять технологическим требованиям [84, 137, 183].

Известно, что пробиотики улучшают показатели роста, потребление корма и его эффективность, ферментацию в рубце, иммунную и антиоксидантную способность, а также общее состояние здоровья телят до отъёма [146, 197].

Эффективность применения микробиологических препаратов или пробиотиков в молочном скотоводстве значительно варьируется в зависимости от специфических микробиологических факторов кишечной среды хозяина и его естественной микрофлоры. Взаимодействия (как синергические, так и антагонистические) между микробной экосистемой и физиологией животного-хозяина, включающие эпителиальные клетки, иммунную систему, гормональный фон, активность ферментов и эпигенетические механизмы,

играют ключевую роль в определении эффективности различных пробиотиков [150, 186].

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что пробиотические бактерии играют важную роль в скотоводстве, выступая в качестве дополнительного защитного механизма для организма животных.

1.2.1 Кормовые добавки на основе лакто- и бифидобактерий

Лактобактерии (род *Lactobacillus*), продуцирующие молочную и пропионовую кислоты, широко используются в качестве пробиотиков. Они эффективно подавляют рост патогенных бактерий в кишечнике благодаря снижению pH среды и конкурентному прикреплению к эпителию кишечника.

Исследования И. В. Пухаева и Н. С. Персаева (2023) [92] показали, что профилактическое применение молочнокислых препаратов, включающих штаммы *Enterococcus durans* P10, *Lactobacillus paracasei* 3-37 и *Lactobacillus gallinarum* И-2.3, эффективно предотвращает развитие диспепсии у телят и значительно повышает неспецифическую естественную резистентность организма по сравнению с контрольной группой.

По данным литературы (Li Y. et al., 2023) [174], штаммы *Lactobacillus reuteri* L81 и *Lactobacillus johnsonii* L29, выделенные из фекалий крупного рогатого скота после трансплантации фекальной микробиоты, даже в низкой концентрации способны улучшать показатели роста, иммунную и антиоксидантную функции, а также барьерную функцию кишечника у телят после отъема.

Бифидобактерии, также относящиеся к классическим пробиотикам, обладают широким спектром полезных свойств. Они участвуют в процессах ферментации, синтезируют витамины группы В и К, оптимизируют белковый, липидный и минеральный обмены. Кроме того, бифидобактерии способствуют эффективному усвоению кальция и витамина D [33].

В качестве примера бифидосодержащих добавок можно привести «Бэмби» – культуральную жидкость живых антагонистически активных бактерий

Bifidobacterium bifidum штамм №1. Применение этой добавки способствует повышению среднесуточных приростов молодняка на 14,9 % и его сохранности благодаря выраженному положительному воздействию на обменные процессы и повышению уровня неспецифического иммунитета [134].

Согласно данным Бовкуна Г.Ф. и соавторов (2021) [11], выпаивание бифидосодержащего пробиотика «Бифинорм» в комбинации с пребиотической добавкой «Ветелакт» телятам с антенатальной гипотрофией и сопутствующей простой диспепсией, вызванной функциональным дисбактериозом, способствует колонизации слизистой кишечника бифидофлорой, нормализации микробиоценоза, репарации слизистой желудочно-кишечного тракта, устранению синдром функционального дисбактериоза. Такой подход обеспечивает 96,7%-ную сохранность молодняка, клинически ускоряет купирование диареи, нормализует пищеварение, снижает частоту и продолжительность диарей в дальнейшем, а также обеспечивает позитивную динамику роста.

Особую эффективность демонстрируют кормовые добавки, содержащие комплекс лакто- и бифидобактерий, часто в сочетании с другими пробиотическими микроорганизмами. Например, микробиологический комплекс «Бонака-АПК», представляющий собой сухую лиофилизированную форму биомассы живых термостабильных штаммов пробиотических бактерий на адсорбирующем носителе, имеет следующий состав: *Lactococcus lactis subsp. lactis*, молочнокислых бактерий (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*), бифидобактерий (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*), пропионовокислых бактерий (*Propionibacterium shermanii*, *Propionibacterium freudenreichii*). Применение «Бонака-АПК» в рационе шестимесячных тёлочек голштинской породы способствовало улучшению микробиоценоза за счёт увеличения полезной пробиотической микрофлоры на пять порядков [47, 67].

Таким образом, лакто- и бифидобактерии являются ключевыми компонентами пробиотических добавок, активно используемых в животноводстве. Их применение способствует нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта, подавлению патогенной микрофлоры, улучшению процессов пищеварения и усвоения питательных веществ.

1.2.3 Кормовые добавки на основе бактерий рода *Bacillus*

Род *Bacillus* представлен грамположительными, аэробными и спорообразующими микроорганизмами, обладающими широким спектром применения в сельскохозяйственных отраслях, включая производство пробиотических препаратов и продуцентов ферментов [30, 74, 91, 110]. Способность спорообразующих бактерий оказывать пробиотическое действие привела к разработкам на их основе препаратов, отнесенных к поколению так называемых «самоэлиминирующихся антагонистов» [56, 90].

Оценивая перспективы использования бактерий рода *Bacillus* для создания пробиотических препаратов, выделены следующие их преимущества перед другими представителями экзогенной микрофлоры:

- безвредность подавляющего большинства представителей рода для макроорганизма даже в концентрациях, значительно превышающих рекомендуемые для применения;
- способность повышать неспецифическую резистентность организма хозяина;
- антагонистическая активность к широкому спектру патогенных и условно-патогенных микроорганизмов;
- высокая ферментативная активность;
- устойчивость к литическим ферментам и обусловленная этим высокая жизнеспособность на протяжении всего желудочно-кишечного тракта;
- технологичность в производстве;
- стабильность при хранении;
- экологическая безопасность [129, 164, 172].

Согласно СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», *B. subtilis* не относится к патогенным для человека микроорганизмам [88]. *B. subtilis* не содержит эндотоксинов и считается подходящим для квалифицированного статуса презумпции безопасности (QPS) Европейского органа по безопасности пищевых продуктов. *B. subtilis* классифицируется как "общепризнанно безопасная бактерия" (GRAS), которую можно использовать в виде безопасного пищевого продукта [32, 200].

В настоящее время известно более полусотни препаратов на основе спорообразующих бактерий, применение которых демонстрирует широкий спектр положительных эффектов на здоровье и продуктивность сельскохозяйственных животных. Например, кормовая добавка «БиоПримум» способна нормализовать микрофлору кишечника, оказывать благоприятное действие, барьерную функцию на организм, а также восполнять дефицит хрома, повышать продуктивность и сохранность животных [102].

Кормовая добавка «Симбитокс» способствует увеличению среднесуточной продуктивности и жирности молока, что приводит к повышению рентабельности производства молока на 9,45% [82]. Дополнительно, применение пробиотического препарата улучшает кроветворную функцию организма и положительно влияет на показатели гуморального иммунитета у телят [117].

Дальнейшие исследования подтверждают позитивное влияние этих добавок на различные аспекты животноводства. При нарушении пищеварительных процессов у телят, пробиотик «Эмпробио» в дозировке 40 мл на голову дважды в сутки, в течение 14 дней, оказывает лечебное действие и способствует улучшению показателей роста и развития молодняка [10].

Для повышения скорости роста и снижения затрат на питательные вещества при производстве 1 кг прироста живой массы телок рекомендуется включать в их рацион пробиотик «Споротермин» в дозе 10 г на голову в сутки.

Начинать это следует с первой порции молозива с момента рождения и продолжать до 45-дневного возраста [28].

В условиях группового содержания телят наибольшую эффективность показывает пробиотик «Олин», применяемый в дозировке 4 г на голову в сутки. В результате живая масса увеличивается на 5,4% по сравнению с контрольной группой, а приросты абсолютный и среднесуточный – на 10,8%. Относительный прирост составляет 4,78%, а себестоимость 1 кг прироста живой массы снижается на 6,7%. При индивидуальном содержании телят в домиках оптимальным вариантом является применение «Олин» в дозе 3 г на голову в сутки, что ведет к увеличению абсолютного и среднесуточного прироста живой массы на 8,3%, приросту энергии роста на 4,83% и снижению себестоимости 1 кг прироста живой массы на 5,2% [2].

Использование комплексной терапии с пробиотиком «Ветоспорин-Ж» способствует восстановлению минерального обмена веществ у быков. Результаты продемонстрировали значительный рост показателей: концентрация калия увеличилась на $5,38 \pm 0,16$ ммоль/л, кальция — на $4,36 \pm 0,12$ ммоль/л и фосфора — на $3,23 \pm 0,1$ ммоль/л [31].

По данным И. А. Алексеев, И. В. Царевский, Р. А. Егоров (2019) [3], в результате применения пробиотической кормовой добавки «Басулифор» в рационе телят отмечено улучшение ряда физиологических показателей. Добавка положительно влияла на экстерьерные характеристики и среднесуточный прирост живой массы, который вырос в среднем на 7,56%, естественную резистентность на 7,04% и сохранность на 5,46% ($P < 0,05$). В 60-дневном возрасте у подопытных телят высота в холке, длина туловища и обхват груди были больше, чем у контрольных сверстников на 4,62-5,30% ($P < 0,05$).

Применение добавок на основе *Bacillus* также положительно влияет на мясную и молочную продуктивность. Использование пробиотической добавки «Ветоспорин-актив» в рационе черно-пестрых коров улучшило обмен веществ и качество молока, что повысило его пригодность для производства творога [121]. Для бычков-кастратов симментальской породы добавка также оказала

положительное влияние на мясные качества. Наибольший эффект отмечался при дозировке 0,10 г на 1 кг корма, увеличив предубойную живую массу молодняка на 18,7 кг (4,0%) [29].

Изучено влияние пробиотической добавки «Муцинол» на молочную продуктивность и воспроизводительную способность лактирующих коров. Добавление к основному рациону коров, начиная с 10-го дня после отела в течение 60 дней кормовой пробиотической добавки «Муцинол-базовый» в дозировке 30 г в сутки на голову способствовало повышению суточных и валовых удоев за период, содержания жира в молоке, а также улучшению ряда показателей воспроизводства [55].

Введение в рацион животных добавки «Профорт» в дозе 30 г на голову в сутки в течение 80 дней периода раздоя способствовало нормализации обменных процессов в их организме, повышению среднесуточных удоев на 9,04-12,86% ($P < 0,05$), увеличению процента жира и белка [130].

Добавление прямого вскармливания микроорганизмов на основе *Bacillus* повысило потребление корма, усвояемость сухого вещества и протеина, а также количество питательных веществ, усвоенных коровами с канюлированным рубцом, получавшими рацион на основе корма [175]. У телок, получавших прямое вскармливание микроорганизмов на основе *Bacillus*, была выше оценка упитанности при отеле и концентрация глюкозы в плазме крови в послеродовой период, в то время как их потомство имело одинаковую массу тела при рождении, но более высокие показатели роста при относительно высоком содержании белка и энергии в рационе по сравнению с потомством телок, не получавших добавку прямого вскармливания на основе *Bacillus* [161]. Ежедневное добавление 13 г *B. subtilis* PB6 на одного бычка может повысить эффективность кормления крупного рогатого скота на откорме [190].

У молочных телят, получавших обычный заменитель молока и ежедневную дозу пробиотика *B. subtilis* в размере 7,5 мл, наблюдался более интенсивный рост и более благоприятный метаболический профиль в течение первых 90 дней жизни [141]. Добавление прямого кормления микроорганизмами,

содержащего *B. licheniformis* и *B. subtilis*, повысило эффективность кормления лактирующих молочных коров, получавших PMR, а также способствовало улучшению усвояемости сухого вещества [193]. Результаты исследований показывают, что добавление пробиотиков *B. subtilis* + *B. licheniformis* может стать альтернативой для улучшения здоровья и общей продуктивности крупного рогатого скота.

Таким образом, кормовые добавки на основе бактерий рода *Bacillus* зачастую включают комбинации из двух или более штаммов, таких как *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* и *Bacillus faecium*. Эти добавки эффективно применяются как при откорме молодняка, так и у взрослого скота для комплексного повышения их продуктивности, улучшения здоровья, укрепления иммунитета и повышения экономической эффективности животноводства.

1.2.4 Дрожжевые кормовые добавки

Дрожжи являются ценным компонентом кормовых добавок, поскольку представляют собой богатый источник витаминов группы В, белков, аминокислот и других питательных веществ. Их включение в рацион эффективно повышает питательную ценность кормов, улучшает их усвояемость и использование сельскохозяйственным животным и птицам, стимулирует иммунную систему и подавляет рост вредных микроорганизмов [180].

Механизм действия дрожжей как пробиотиков многогранен. Известно, что дрожжевая культура сокращает лаг-фазу, продлевает логарифмическую фазу роста и значительно увеличивает общее количество микробной флоры, способствуя размножению полезных кишечных бактерий, таких как *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. Регулирующее действие дрожжевой культуры на кишечную флору животных проявляется не только в пролиферации полезной микрофлоры, но и в ингибировании роста вредных бактерий, например, кишечной палочки (*Escherichia coli*), в том числе путем производства энтеротоксинов. Антибактериальное действие дрожжевой культуры отчасти обусловлено изменением питательного состава среды для флоры. Кроме того,

маннан-олигосахариды и β -глюканы, входящие в состав клеточной стенки дрожжей, обладают бактериостатическим действием [176].

Объём выпуска кормовых добавок, содержащих активные дрожжи (преимущественно различные штаммы *Saccharomyces cerevisiae*), постоянно растёт, увеличиваясь на 5–10 % ежегодно, что свидетельствует о признании их эффективности [107].

Практическое применение дрожжевых добавок демонстрирует значительные улучшения в различных аспектах животноводства. Исследования показывают, что использование пробиотиков на основе дрожжей способствует существенному увеличению живой массы и показателей линейного роста молодняка. Так, пробиотик «Актив Ист» привел к увеличению живой массы телят на 8% [57], а «И-Сак 1026» обеспечил прирост массы на 6,7—13,2% при одновременном снижении затрат кормов [50]. Аналогично, «Актисаф» улучшал аппетит и увеличивал скорость роста молодняка, позволяя телятам превосходить контрольную группу по живой массе и приросту [58]. Живые дрожжи *S. cerevisiae* в целом значительно улучшают показатели роста и эффективность кормления телят на откорме [181].

Помимо прямого влияния на рост, дрожжевые добавки активно способствуют улучшению здоровья и повышению резистентности животных. Например, пребиотик «Кормомикс-МОС» содействовал более быстрому восстановлению общего состояния и аппетита у телят, перенесших заболевания в молочный период [44]. «Био-Мос» продемонстрировал высокую связывающую способность в отношении бактерий группы кишечной палочки, что выразилось в снижении заболеваемости респираторными болезнями на 9% и желудочно-кишечными (диареей) на 27,3% среди телят по сравнению с контролем. Общая продолжительность болезней у животных, получавших добавку, также сократилась, что указывает на повышение резистентности к условно-патогенной микрофлоре [16]. Комплекс «Целобактерин», содержащий живые бактерии, способствует разрушению клетчатки и улучшает усвояемость зерновых,

одновременно подавляя развитие патогенной микрофлоры в пищеварительном тракте, что снижает затраты на кормление телят [125].

Экономическая эффективность и продуктивность также значительно возрастают благодаря использованию дрожжевых добавок. Использование «Оптисаф» в дозе 10 г/гол/сутки привело к повышению скорости роста телят и снижению себестоимости прироста, увеличив рентабельность производства [116]. Введение «Кормового биопротеина» в рацион бычков на откорме улучшает их физиологическое состояние и обмен веществ [138], а «Био-Мос» способствует повышению эффективности конверсии корма и увеличению мясной продуктивности [45]. Для молочного скота также зафиксированы положительные эффекты: дрожжевой пробиотик «Румин-про» (0,1% от массы сухого вещества рациона) и кормовые дрожжи «КауСелл» положительно влияют на молочную продуктивность коров [26]. Кроме того, «И-САК-1026» доказал свою эффективность в профилактике субклинического ацидоза у высокопродуктивных молочных коров и увеличении их продуктивности.

Таким образом, дрожжи, входящие в состав кормовых добавок, оказывают благоприятное многостороннее действие на организм телят, а также способствуют увеличению мясной и молочной продуктивности у крупного рогатого скота.

1.2.5 Поликомпонентные кормовые добавки

Поликомпонентные пробиотики (симбиотики), представляют собой кормовые добавки, содержащие несколько штаммов полезных бактерий различных видов, которые работают вместе, усиливая и дополняя действия друг друга. Термин «симбиотик» происходит от греческого слова "Symbiosi", обозначающего тесное сожительство организмов нескольких видов, полезное для всех участников. Важно, что любой биотехнологический продукт, содержащий два или три вида бактерий, может считаться симбиотиком [4].

Применение таких комбинированных добавок демонстрирует комплексное положительное влияние на продуктивность и здоровье

сельскохозяйственных животных. В частности, пробиотическая добавка «Профорт», применяемая коровам в первые три месяца лактации, обеспечивает физиологически обоснованное течение метаболических процессов. Это приводит к повышению среднесуточных удоев на 2,50-3,17 кг и увеличению валового надоя молока на 3138 кг. Улучшаются и качественные характеристики: содержание белка и жира в молоке увеличивается на 0,02-0,15% и 0,03-0,10% соответственно, что повышает валовой надой молока в базисной жирности на 17,01% [131]. Аналогично, скармливание кормовой добавки «Яросил» коровам в период лактации увеличивает молочную продуктивность на 12,12%, сокращая расход кормов и денежные затраты на производство молока, обеспечивая экономический эффект в 28,20% [38, 39].

Комбинированные добавки также оказывают значительное влияние на рост и приросты молодняка. Кормовая пробиотическая добавка «Бацелл-М» (на основе *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus paracasei* и *Enterococcus faecium*) позволила повысить среднесуточные приросты у бычков на 18,54-19,36% и увеличить массу мякоти в тушах на 8,3-13,3% [1]. Применение этого же препарата телятам в дозе 30 г/гол/сут повысило среднесуточный и абсолютный приросты живой массы на 43,50 г и 2,61 кг соответственно [81]. Использование пробиотика «Пробитокс супер» (10 г на голову в составе ЗЦМ) увеличивает среднесуточный, абсолютный и относительный прирост телят в возрасте 3 месяцев [59]. Комбинация мультивидовой пробиотической смеси значительно улучшила показатели роста телят и снизила частоту диареи в первые 4 недели жизни [199].

Влияние симбиотиков на здоровье кишечника и резистентность животных также очень существенно. Комплексное применение пробиотика «Пролам» (жидкая форма с множеством штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*) и пробиотической добавки «Бацелл-М» (сухая форма) обеспечивает формирование благоприятной микрофлоры, снижая количество потенциально патогенной микрофлоры и положительно влияя на клинический статус животных, снижая заболеваемость ЖКТ и повышая сохранность молодняка [132]. Введение активатора рубцового пищеварения «МегаБуст Румен» оказало

положительное действие на поедаемость кормов, продуктивность и рентабельность производства молока, увеличивая суточные удои на 10,9% и рентабельность на 2,5% [8]. Фактическое количество полезной микрофлоры у коров, получающих активатор, увеличилось на 11,9% [40]. Комплексная кормовая добавка «Бонака-АПК» (содержащая *Bacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*) позволила повысить суточный прирост живой массы телок на 9,7% и снизить потребление корма на 1 кг прироста живой массы на 24%, что удешевило рацион. Сохранность поголовья в опытной группе составила 100% против 98% в контроле [48]. Применение пробиотического препарата «Интестевит-ТМ» смягчает действие стресс-факторов и помогает животным адаптироваться к новым условиям [128]. Комбинации дрожжевой культуры с маннан-олигосахаридами и *B. subtilis* (синбиотик) способствуют более быстрому набору веса и улучшению здоровья, что важно для молочной промышленности [179]. Рацион с добавлением комплексных пробиотиков (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Bacillus subtilis*) улучшает развитие рубца и общее состояние здоровья новорождённых телят [196].

Таким образом, синергизм симбиотических микроорганизмов обеспечивает более широкий спектр действия и комплексные положительные эффекты по сравнению с использованием монокультур или близкородственных сочетаний микроорганизмов, что делает их высокоэффективными для улучшения продуктивности и здоровья молодняка крупного рогатого скота.

1.3 Технологические аспекты приготовления пробиотических добавок

Выбор и реализация технологий приготовления пробиотических добавок определяются спецификой используемых микроорганизмов (их видом и штаммом), а также конечными целями применения продукта. Эти факторы задают требования к условиям культивирования, методам стабилизации и форме выпуска.

Этапы технологического процесса:

Подбор и оптимизация питательной среды. На этом этапе идентифицируют компоненты, обеспечивающие максимальное накопление биомассы целевых микроорганизмов. Приоритет отдаётся натуральным и экономически эффективным составляющим.

Примеры сред:

- для *Lactobacillus spp.* — среды на основе гидролизованного молока или кукурузного экстракта с дрожжевым автолизатом [6];
- для *Bacillus spp.* — соево-пептонный агар или среды с мелассой [160];
- для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — среды с мальтозной патокой и минеральными добавками [189].

Выбор метода культивирования. В зависимости от масштаба производства и свойств микроорганизма применяют:

- культивирование в промышленных ферментерах — для точного контроля параметров (температура, pH, аэрация) в крупных объёмах;
- культивирование в шейкерах — для лабораторных и полупромышленных масштабов с обеспечением перемешивания и аэрации.

Концентрация биомассы и определение формы выпуска. После культивирования микробную биомассу концентрируют. Форма выпуска подбирается с учётом логистики и применения:

Порошкообразные формы. Для удаления влаги и стабилизации микроорганизмов применяют различные методы сушки (лиофильную, распылительную), что обеспечивает длительное хранение и удобство транспортировки. Пример такого продукта — «СИБМОС-про» [135] — кормовая пробиотическая добавка на основе лиофилизированных штаммов *B. subtilis* и *B. licheniformis*.

Жидкие формы. Жизнеспособность микроорганизмов сохраняется в растворе или в среде культивирования; такие продукты отличаются быстрой усвояемостью и готовы к немедленному применению. В качестве примера

можно привести «Субтиспорин» [14] — жидкий пробиотик на основе спорообразующих бактерий *B. subtilis*, предназначенный для коррекции микробиоценоза и профилактики желудочно-кишечных расстройств у сельскохозяйственных животных.

Определение оптимальной дозировки. Эффективная дозировка пробиотиков основывается на анализе научных данных по конкретным штаммам и результатах испытаний. Цель — достичь максимального зоотехнического или терапевтического эффекта при экономической целесообразности. Недостаточная доза снижает эффективность, избыточная — увеличивает затраты без значимого результата.

Дозировка нормируется по количеству жизнеспособных микроорганизмов — в колониеобразующих единицах на единицу массы или объёма (КОЕ/г, КОЕ/мл).

Контроль качества готовой продукции. Проверяют:

- жизнеспособность и чистоту культур;
- отсутствие патогенов и контаминантов;
- соответствие заявленной концентрации КОЕ;
- стабильность при заявленных условиях хранения.

Разработка технологии производства пробиотических добавок требует комплексного подхода, включающего выбор штаммов, оптимизацию среды культивирования, стабилизацию биомассы, валидацию дозировок и многоступенчатый контроль качества. Конечная цель — обеспечить стабильность продукта, удобство применения для фермеров и экономическую эффективность производства.

1.4 Заключение по обзору литературы

Анализ современной научной литературы убедительно демонстрирует значительный и многогранный потенциал пробиотических кормовых добавок в животноводстве, особенно в свете ограничений на использование кормовых антибиотиков в качестве альтернативы. Эти добавки, содержащие полезные

микроорганизмы или их компоненты, становятся ключевым инструментом для оптимизации здоровья и продуктивности сельскохозяйственных животных.

Лактобактерии и бифидобактерии, как традиционные и хорошо изученные пробиотические штаммы, зарекомендовали себя как эффективные модуляторы кишечной микрофлоры. Они способствуют подавлению роста патогенных бактерий, нормализации пищеварения, улучшению усвоения питательных веществ, а также стимуляции иммунной системы. Многочисленные исследования подтверждают их способность предотвращать желудочно-кишечные расстройства, повышать неспецифическую резистентность и улучшать продуктивные показатели, включая среднесуточные приросты и сохранность молодняка.

Дрожжевые добавки, представленные преимущественно различными штаммами *Saccharomyces cerevisiae*, являются ценным источником питательных веществ (витамины группы В, белки, аминокислоты) и играют важную роль в улучшении пищеварения и иммунитета. Их механизм действия включает стимуляцию полезной кишечной флоры, ингибирование патогенов, а также участие маннан-олигосахаридов и β -глюканов в антибактериальной защите. Применение дрожжей приводит к значительному увеличению живой массы, улучшению аппетита, эффективности конверсии корма и повышению продуктивности как молодняка, так и взрослого скота.

Особое место занимают бактерии рода *Bacillus* благодаря своим уникальным свойствам. Будучи спорообразующими микроорганизмами, они демонстрируют высокую выживаемость и стабильность в различных условиях, проявляют выраженную антагонистическую активность к патогенам и обладают высокой ферментативной активностью. Безопасность *B. subtilis* подтверждена международными стандартами. Пробиотики на основе *Bacillus* значительно улучшают рост и развитие молодняка, повышают иммунитет, способствуют восстановлению минерального обмена, а также повышают молочную и мясную продуктивность, обеспечивая экономическую выгоду.

Наиболее перспективным направлением является разработка и применение комбинированных пробиотических добавок, или симбиотиков. Объединение нескольких штаммов различных видов бактерий и/или дрожжей, часто с пребиотическими компонентами, обеспечивает синергетический эффект, превосходящий действие монокультур. Такие комплексные препараты демонстрируют более широкий спектр действия, оказывая одновременное положительное влияние на все ключевые аспекты животноводства: повышение продуктивности (надой, приросты, качество мяса и молока), укрепление иммунитета, нормализацию микробиоценоза, снижение заболеваемости и улучшение экономической эффективности производства.

В целом, представленные литературные данные подтверждают, что пробиотические кормовые добавки являются высокоэффективным и безопасным решением для современного животноводства, способствующим устойчивому развитию отрасли за счет улучшения здоровья животных, повышения их продуктивности и экономической рентабельности фермерских хозяйств. Однако, несмотря на обширные исследования, сохраняется острая необходимость в разработке и внедрении аборигенных штаммов, в частности *B. subtilis*, а также соответствующих им технологий получения пробиотических добавок, адаптированных к специфическим условиям регионального животноводства, что и определяет актуальность дальнейших научных изысканий.

ГЛАВА 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

2.1.1 Объекты исследований

Диссертационная работа выполнена с 2022 г. по 2026 г. в лаборатории по разработке микробных препаратов Якутского научно-исследовательского института сельского хозяйства имени М.Г. Сафронова – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Якутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук».

Объектами лабораторных исследований были коллекционные изоляты и штаммы бактерий *B. subtilis*, новые питательные среды, новая пробиотическая кормовая добавка, белые беспородные мыши, простейшие *Tetrahymena pyriformis*, телята холмогорской породы, ремонтные телочки симментальской породы, кровь, фекалии, а также культуры микроорганизмов, выделенные из кишечной микрофлоры.

2.1.2 Методы, применяемые при работе с изолятами и штаммами бактерий *B. subtilis*

При работе с изолятами и штаммами бактерий *B. subtilis* использовали следующие приборы: вортекс BM-3 TAGLER, денситометр Den-1B, микроскоп Биолаб-7, термостат ТС-1/80 СПУ и шейкер-инкубатор ES-20.

Антагонистическую активность изолятов бактерий *B. subtilis* определяли методом отсроченного антагонизма (перпендикулярных штрихов) в соответствии с МУК 4.2.2602-10 [54]. В качестве тест-культур использовали свежевыделенные два изолята *St. aureus spp.* и изолят *E. coli spp.* Представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Тест-культуры условно-патогенных микроорганизмов, используемые в определении антагонистической активности

№	Тест-культура	Источник выделения, использования	Предоставленные
1	Изолят <i>St. aureus</i> 3.5 spp.	Клинически больного мытом жеребенка	Лаборатория ветеринарной биотехнологии ЯНИИСХ
2	Изолят <i>St. aureus</i> A spp.	Из микробиоты дикой перелетной птицы	Лаборатория по разработке микробных препаратов ЯНИИСХ
3	Изолят <i>E. coli</i> A spp.		

В исследовании использовали шесть изолятов бактерий *B. subtilis*, выделенных из микробиоты диких копытных животных Республики Саха (Якутия) и хранящихся в рабочей коллекции микроорганизмов лаборатории по разработке микробных препаратов ЯНИИСХ.

Изоляты *B. subtilis* 27-7/1л и *B. subtilis* 36-3/1L выделены из микробиоты диких лосей (*Alces alces*), а изоляты *B. subtilis* 24-23/к, *B. subtilis* 5-1/2к, *B. subtilis* 11-4/1к и *B. subtilis* 3-1/1к выделены из микробиоты диких косуль (*Capreolus pygargus*). Эти изоляты *B. subtilis* являются новыми, идентифицированными по культурально-морфологическим и некоторым физиолого-биохимическим свойствам, а также молекулярно-генетически по 16S рРНК в центре коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск). Однако они не паспортизированы и не депонированы.

Отобранные изоляты бактерий *B. subtilis* 27-7/1л и *B. subtilis* 11-4/1к в дальнейшем определены как *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K.

Ингибирующую активность к условно-патогенным микроорганизмам изучали методом культивирования условно-патогенных тест-культур на твердой среде с метаболитами исследуемых штаммов бактерий *B. subtilis* [75]. Тест-культуры представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Тест-культуры условно-патогенных микроорганизмов, используемые в определении ингибирующей активности

№	Тест-культура	Источник выделения или использования	Предоставленные
1	Изолят <i>St. aureus</i> 3.5 spp.	Клинически больного мытом жеребенка	Лаборатория ветеринарной биотехнологии ЯНИИСХ
2	Штамм <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>enteritidis</i> ATCC 13076	Контрольный штамм для проверки сред	
3	Штамм <i>Salmonella abortus equi</i> БН-12 (ВГНКИ)	Выделен из мерзлотных почв Якутии	
4	Штамм <i>E. coli</i> М-01-02	Контрольный штамм для проверки сред	
5	Изолят <i>St. aureus</i> А spp.	Из микробиоты дикой перелетной птицы	Лаборатория по разработке микробных препаратов ЯНИИСХ

Антагонистическая активность (антифунгальная) в отношении плесневых и токсигенных грибов определяли методом агаровых блоков [72]. Степень ингибирования роста колонии рассчитывали по формуле Аббота:

$$СИ = \frac{Дк - Дo}{Дк} \cdot 100 \quad (1)$$

Где, СИ- степень ингибирования колонии, %;

Дк - диаметр колонии гриба в контроле (мм);

До - диаметр колонии гриба в опыте (мм).

В качестве тест-культур использовали 12-дневные культуры плесневых и токсигенных грибов рода *Aspergillus* spp., *Penicillium citrinum* и *Mucor* spp.; список культур приведен в таблице 3.

Таблица 3 – Тест-культуры плесневых и токсигенных грибов

№	Тест-культура	Источник выделения
1	<i>Aspergillus</i> spp.	из сена
2	<i>Penicillium citrinum</i>	из сена
3	<i>Mucor</i> spp.	из семян овса

Биосовместимость изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K методом наложения капель [127].

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства изолятов *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K изучали в питательных средах: мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), МПБ с добавлением NaCl (от 2 до 10%) для определения солетолерантности, яичный бульон для тестирования лецитиназной активности, казеиновый и картофельный агары для определения ферментативных свойств, среду Кларка для постановки реакции Фогаса-Проускауэра на определение ацетоина, а также диагностические среды Гисса с мальтозой, маннитом, глюкозой, лактозой, сорбитом, галактозой, ксилозой, дульцитом и арабинозой. Каталазную активность выявляли в реакции с H_2O_2 . Учитывали рост на скошенных МПА при низких плюсовых температурах +5°C, +10°C, +15°C, а также в среде Китта-Тароцци для учета роста в анаэробной среде. Оценивали также подвижность штаммов. Морфологию клеток и спорообразование изучали микроскопированием мазков, окрашенных по Граму в световом микроскопе Биолаб-7.

Биобезопасность изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K изучалась в опытах *in vivo* по показателям вирулентности, токсичности и токсигенности в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.2602-10 [53].

Антибиотикочувствительность изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K определили диско-диффузным методом (ДДМ) в соответствии с МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [111]. Для определения чувствительности использовали диски с антибиотиками Bioanalyse® Antimicrobial Susceptibility Test Discs.

Молекулярно-генетическое подтверждение и депонирование изолятов (штаммов) бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K проведены в Биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

2.1.3 Методы, применяемые при разработке технологии получения кормовой добавки

Конструирование новой твердой питательной среды для культивирования штаммов бактерий *B. subtilis* проводились в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [118] и методическими рекомендациями по изготовлению и использованию питательных сред и растворов для микробиологических целей [27].

При работе использовали следующие приборы: термостат ТС-1/80 СПУ, шейкер-инкубатор ES-20, стационарный pH-метр Seven Easy от Mettler Toledo, вортекс BM-3 TAGLER, денситометр (мутномер) Den-1B производства Biosan для определения мутности бактериальной суспензии и микроскоп Биолаб-7.

Опытный образец пробиотической кормовой добавки (ПКД) «Пробисубтил» содержит равное сочетание живых клеток спорообразующих бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K, суспензированные в изотоническом растворе хлорида натрия. В количестве не менее 1×10^8 КОЕ/см³.

Токсикологические исследования. Исследования общей токсичности кормовой добавки «Пробисубтил» проводились на простейших *Tetrahymena pyriformis* в Испытательном лабораторном центре (ИЛЦ) «ВетФармТест» Федерального научного центра Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук. Методика соответствовала п.4.3 ГОСТ 31674-2012 [18].

Оценка острой токсичности осуществлялась согласно ГОСТ 32644-2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека; Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности» [20].

Изучение хронической токсичности проводили в соответствии с ГОСТ 32647-2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека; комбинированные исследования хронической токсичности и канцерогенности» [21], а также МУК 4.2.2602-10 «Система

предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов» [53].

Гистологические исследования органов лабораторных белых мышей после тестов на острую и хроническую токсичность были выполнены в Государственном бюджетном учреждении Республики Саха (Якутия) «Якутская республиканская ветеринарно-испытательная лаборатория» (ЯРВИЛ). Работы проводились в соответствии методическим руководством «Морфологические исследования в ветеринарных лабораториях» (МСХ РФ ДФ г. Москва, 2002 г.) [54].

Контроль качества и стабильность ПКД «Пробисубтил» осуществляли в течение 12 месяцев. Хранили добавку в холодильнике при +2 до +8°C. Учитывали внешний вид, цвет, запах определяли согласно ГОСТ 26573.0-2017 «Премиксы. Технические условия» [17]. Количество жизнеспособных бактерий (колониеобразующих единиц – КОЕ/см³) устанавливали в соответствии с ОФС 1.7.2.0008.15 [69]. Подлинность определяли по ГОСТ 31928-2013 [19]. Микробиологическую чистоту определяли в соответствии с ГОСТ Р 55291-2023 «Средства лекарственные пробиотические для ветеринарного применения. Методы микробиологического анализа» [22]. Значение pH измеряли стационарным pH-метром Seven Easy (Mettler Toledo) с погрешностью ±0,01 pH согласно ОФС.1.2.1.0004 [70]. Безвредность оценивали на белых мышах путем перорального введения тест-дозы 0,5 см³ нативным методом в соответствии с ГОСТ 31674-2012 [18].

Расчет экономической эффективности разработанной питательной среды проводили путем сравнения себестоимости с себестоимостью коммерческого аналога МПА. Себестоимость экспериментальной новой среды рассчитывалась на основе прямых затрат, включающих стоимость сырья, электроэнергии, а также трудозатраты. Стоимость сырья определялась по актуальным закупочным ценам, затраты на электроэнергию – по действующим тарифам и фактическому потреблению оборудования. Трудозатраты рассчитывались исходя из нормативов времени на приготовление среды и

утвержденных ставок оплаты труда лаборанта-исследователя. Данный подход к оценке экономической эффективности базируется на общепринятых принципах финансового анализа и расчёта себестоимости продукции.

2.1.4 Методы, применяемые при научно-хозяйственных опытах

Научно-хозяйственные опыты по применению пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» проведены в животноводческих хозяйствах Республики Саха (Якутия): ООО Багарах и ООО Экоферма «Немюгю» в соответствии с общепринятыми методиками исследований в животноводстве.

Для изучения кишечной микрофлоры молодняка крупного рогатого скота до и после применения кормовой добавки использовали различные питательные среды.

Для определения количества МАФАНМ (мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов) использовали мясо-пептонный агар (МПА).

Для выделения и количественного учета специфических групп бактерий использовали следующие селективные и дифференциально-диагностические среды: азидная среда – для выделения и учета энтерококков, среда Эндо - для выделения и дифференциации энтеробактерий, бифидум среда – для количественного учета бифидобактерий, лактобакагар – для определения молочнокислых микроорганизмов, среда Байрд – Паркера – для выделения патогенных и непатогенных стафилококков, МПА (после прогрева до 85°C в течение 15 минут) – для спорообразующих аэробных бактерий, скошенный МПА – для выделения *Proteus spp.*, среда с бромтимоловым синим для выделения *Yersinia spp.*, магниевая среда для накопления патогенных энтеробактерий, среда Олькеницкого – трехсахарный агар с мочевиной для дифференциации кишечных бактерий.

Подсчет колоний осуществляли с помощью счетчика колоний. Учет результатов посевов проводили через 18, 24, 48 часов.

При изучении кишечной микрофлоры животных родовую и видовую идентификацию выделенных микроорганизмов проводили согласно «Определителю зоопатогенных микроорганизмов» [112] и «Определителю бактерий Берджи» (1997).

Живая масса молодняка крупного рогатого скота определяли методом промеров по Фровейну [46]; при производственных испытаниях использовались платформерные весы. Измерения были выполнены совместно автором исследования и квалифицированным персоналом (зоотехниками) хозяйств.

Биохимические показатели сыворотки крови ремонтного молодняка (телок от 6 месяцев) анализировали на инфракрасном анализаторе Spectra Star 2000 в сотрудничестве с лабораторией биохимии ЯНИИСХ.

Статистическую обработку результатов проводили на основе общепринятых статистических методов [7]. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя арифметическая, m – стандартная ошибка средней арифметической. Оценку значимости различий средних арифметических проводили с использованием t - критерия Стьюдента.

Наиболее подробные методики исследований представлены в соответствующих главах диссертационной работы.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Результаты исследований антагонистической активности изолятов *B. subtilis*, выделенных из микробиоты диких копытных животных

3.1.1 Изучение антагонистической активности изолятов *B. subtilis* в отношении условно-патогенных микроорганизмов

Антагонистическую активность определяли методом отсроченного антагонизма. Для этого изоляты бактерий *B. subtilis* высевали штрихом по диаметру чашки Петри с помощью бактериологической петли шириной 3,5 мм на подсушенную в течение 24 часов МПА. Инкубировали при температуре 37°C в течение 48 часов. После 48 часов перпендикулярно к штриху выросшей культуры *B. subtilis* подсевали тест-культуры. Суспензию суточной культуры тест-микроорганизмов наносили штрихом, используя петлю шириной 2 мм, не касаясь штриха бацилл. Чашки вновь инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов. Контролем роста тест-культур *St. aureus* и *E. coli* служили параллельные посевы на чашки Петри без исследуемых изолятов бактерий *B. subtilis*.

Учет результатов - по зоне ингибирования роста тест-культур на границе со штрихом *B. subtilis*. Результаты по антагонистической активности представлены в таблице 4.

Таблица 4 -Результаты исследования антагонистической активности изолятов *B. subtilis* [93]

Исследуемые изоляты бактерий <i>B. subtilis</i> по номерам	Зоны задержки роста тест-культур, мм		
	<i>St. aureus A spp.</i>	<i>St. aureus 3.5 spp.</i>	<i>E. coli A spp.</i>
27-7/1л	14,0±1,0	13,0±1,0	6,0±1,0
36-3/1L	12,0±2,0	17,0±1,0	3,0±1,0
24-23/к	17,0±1,0	8,0±2,0	7,0±1,0
5-1/2к	11,0±1,0	13,0±1,0	7,0±2,0
11-4/1к	18,0±1,0	15,0±1,0	7,0±1,0
3-1/1к	12,0±2,0	11,0±2,0	2,0±1,0

Изоляты *B. subtilis* (таблица 4), выделенные из микробиоты диких копытных животных Якутии, проявляют выраженную антагонистическую активность против *St. aureus* и менее выраженную - против *E. coli*.

Для дальнейшей работы отобраны *B. subtilis* 27-7/1л и *B. subtilis* 11-4/1к благодаря их сбалансированной антагонистической активности против всех трех тест-культур. Эти штаммы демонстрируют высокие показатели против *S. aureus*: 14-18 мм и (*St. aureus* A spp.) и 13–15 мм (*St. aureus* 3.5 spp.); относительно стабильные значения против *E. coli* (6–7 мм), что превосходит показатели других изолятов (например, 2–3 мм у *B. subtilis* 3-1/1к и *B. subtilis* 36-3/1L).

Другие изоляты исключены из-за нестабильности по отношению к тест-культурам и критически низких показателей против *E. coli* A spp. (≤ 3 мм).

В дальнейших исследованиях отобранные изоляты определены в *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K.

3.1.2 Определение ингибирующей активности *B. subtilis* в отношении условно-патогенных микроорганизмов

Ингибирующую активность метаболитов *B. subtilis* в отношении условно-патогенных бактерий изучали методом совместного культивирования. Для этого использовали скошенные поверхности агара (косяки) в пробирках с МПА: на них предварительно выращивали испытуемые изоляты *B. subtilis* в течение 120 ч при 37 °С для накопления метаболитов. По завершении инкубации колонии *B. subtilis* с поверхности агара тщательно смывали стерильным физиологическим раствором (ФР), удаляли из пробирок и трижды промывали поверхность агара для полного удаления бактериальных клеток. Затем на очищенную поверхность агара петлей вносили клетки одного из тест-культур микроорганизмов и инкубировали при 37°С в течение 72 часов. Контролем служили посевы тест-культур на скошенном МПА без предварительного культивирования *B. subtilis*, проведенные в идентичных условиях инкубации.

Учет результатов проводили по степени ингибирования тест-культур: «угнетение роста» - отсутствие видимого роста тест-культуры (выраженный

ингибирующий эффект); «ограничение/замедление» - снижение плотности или скорости роста по сравнению с контролем (слабый ингибирующий эффект); «отсутствие влияния» - рост, сопоставимый с контролем. Результат исследования по ингибирующей активности изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K представлен в таблице 5 и на рисунке 1.

Таблица 5 – Результаты ингибирующей активности изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K

Тест-культуры	<i>B. subtilis</i> 27L	<i>B. subtilis</i> 11K
<i>St. aureus</i> 3.5spp.	-	±
<i>St. aureus</i> A spp.	±	±
<i>Sal. enteritidis</i> 13076	-	-
<i>Sal. abortus equi</i> «БН-12»	-	-
<i>E. coli</i> 01-17	-	-

Примечание: «-» - рост отсутствует, «±» - незначительный рост.

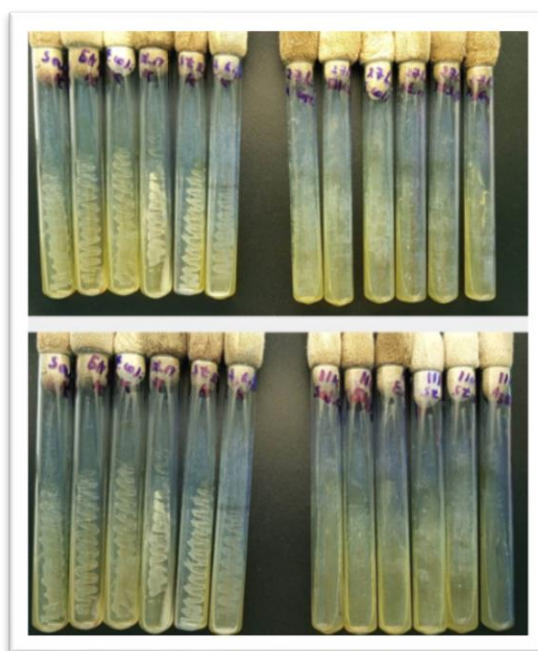


Рисунок 1 - Ингибирующая активность изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K

Анализируя данные, представленные в таблице 5 и рисунке 1, можно сделать следующие выводы. Изолят *B. subtilis* 27L показал надежное ингибирующее действие (угнетение роста, обозначено как «-») в отношении *St.*

aureus 3.5spp. и всех исследованных представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Sal. enteritidis* 13076, *Sal. abortus equi* «БН-12», *E. coli* 01-17). В отношении *St. aureus* A spp. метаболиты *B. subtilis* 27L оказывали частичный ингибирующий эффект: наблюдалось ограничение и замедление роста тест-культур с формированием единичных колоний.

Метаболиты изолята *B. subtilis* 11K также проявляли выраженную ингибирующую активность. Они обеспечивали полное подавление роста всех представителей *Enterobacteriaceae* (*Sal. enteritidis* 13076, *Sal. abortus equi* «БН-12», *E. coli* 01-17) и оказывали сдерживающее воздействие на рост стафилококков: отмечали ограничение и замедление роста *St. aureus* 3.5spp. и *St. aureus* A spp. (обозначено как «±»).

Необходимо отметить, что ингибирующее действие метаболитов *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K подтверждает их антагонистическое воздействие в отношении бактерий родов *Staphylococcus* и *Enterobacteriaceae*.

3.1.3 Изучение антагонистической активности изолятов *B. subtilis* в отношении плесневых и токсигенных грибов

Антагонизм по отношению к плесневым и токсигенным грибам изучали методом агаровых блоков. Для этого культуру *B. subtilis*, выращенную на МПБ в течение 120 часов, вносили в 2% расплавленный агар, охлажденный до 40 °С, в соотношении 1:1. После застывания агара в середину чашки предварительно асептически вырезали отверстие пробочным сверлом диаметром 5мм и в него помещали агаровый блок МПА с колонией тест-культуры (*Aspergillus* spp., *Penicillium citrinum*, *Mucor* spp.). Чашки культивировали при температуре 25–27 °С, завернув в стерильную бумагу. Контролем служили чашки с тест-культурами на МПА без внесения бактерий.

Учет результатов проводили на 3-й, 6-й и 12-й сутки; степень ингибирования роста колонии рассчитывали по формуле Аббота. Также отмечали характер ингибирующей активности. Каждый опыт выполняли в

трехкратной повторности. Результаты антифунгальной активности изолятов бактерий *B. subtilis* представлены в таблице 6, а также на рисунках 2, 3, 4.

Таблица 6 – Результаты антагонистической активности изолятов бактерий *B. subtilis* в %

Тест-культура	Сутки	<i>B. subtilis</i> 27L, % ингибирования	Характер антифунгальной активности <i>B. subtilis</i> 27L	<i>B. subtilis</i> 11K, % ингибирования	Характер антифунгальной активности <i>B. subtilis</i> 11K
<i>Aspergillus spp.</i>	3	81	Z+B	81	Z+B
	6	88	Z+B	88	Z+B
	12	92	Z+B	92	Z+B
<i>Penicillium citrinum</i>	3	68	Z	68	Z
	6	80	Z	83	Z+B
	12	92	Z	93	Z+B
<i>Mucor spp.</i>	3	70	B	70	B
	6	78	B	77	B
	12	71	B+M	74	B

Примечание: «Z» - четкая прозрачная зона лизиса; «Z+B» - зона лизиса с одновременным бактериальным ростом; «B» - бактериальный рост / подавление роста гриба без видимой прозрачной зоны; «B+M» - бактериальный и грибной рост

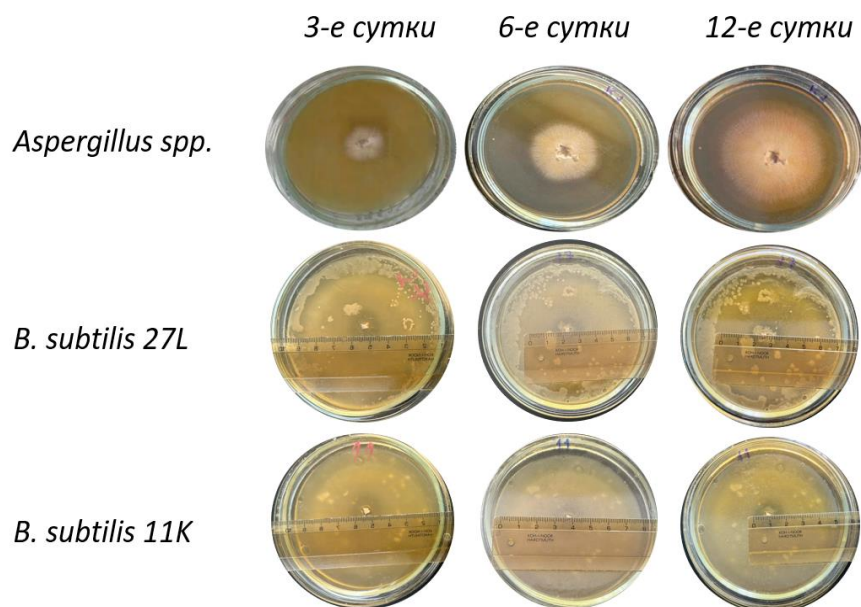


Рисунок 2– Антагонистическая активность изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K в отношении *Aspergillus spp.*

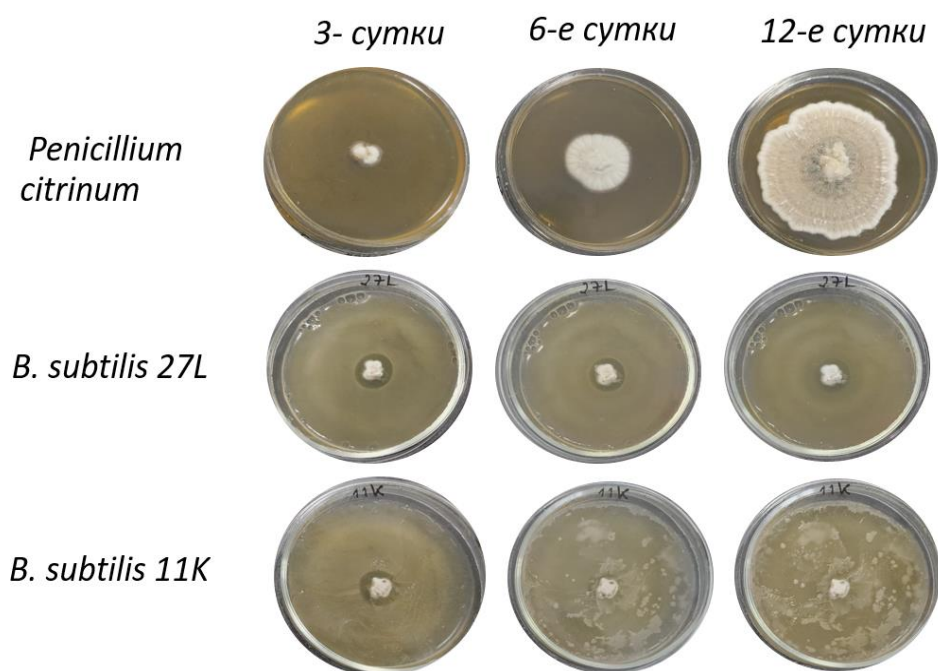


Рисунок 3 – Антагонистическая активность изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K в отношении *Penicillium citrinum*.

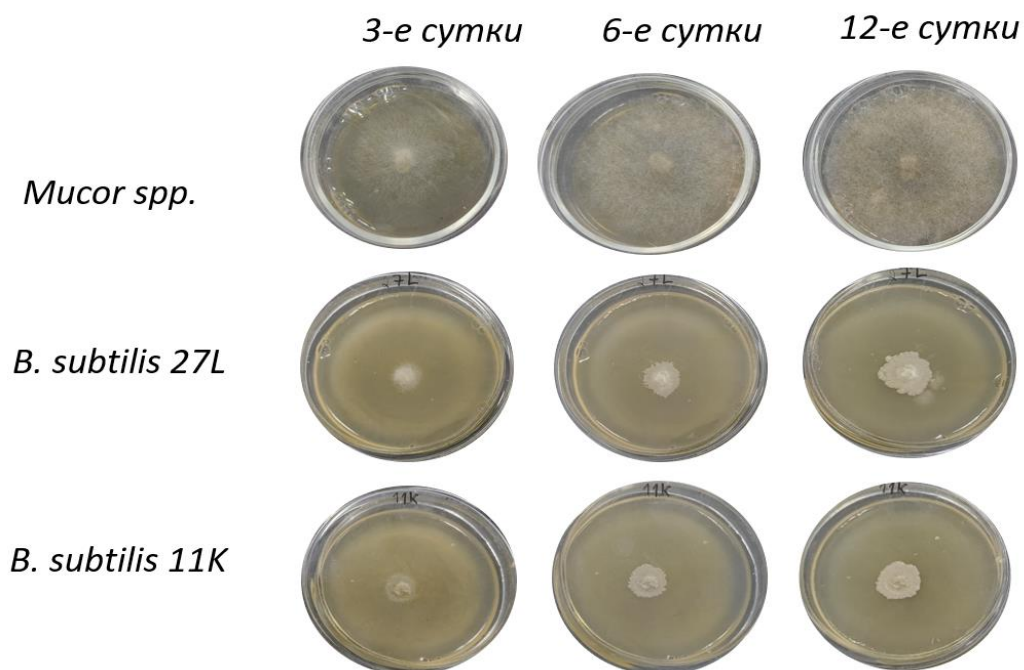


Рисунок 4 – Антагонистическая активность изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K в отношении *Mucor spp.*

Оба изолята *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L продемонстрировали выраженную антагонистическую активность (таблица 6); наибольший эффект

отмечен против *Aspergillus spp.* (81% на 3-й сутки, 88% на 6-й, 92% на 12-й) при этом характер активности Z+B (рисунок 2). Против *Penicillium citrinum* наблюдается нарастание эффекта во времени (68%, 80-83%, 92-93%); изолят бактерий *B. subtilis* 11К несколько более высокий эффект на 6-й и 12-й сутки и чаще проявляет характер Z+B (рисунок 3). В отношении *Mucor spp.* фиксируется средний уровень ингибирования (70-78%) без четкой прозрачной зоны лизиса (характер В), что указывает на подавление роста с одновременным бактериальным разрастанием (рисунок 4).

Результаты исследований свидетельствуют о потенциале изолятов бактерий *B. subtilis* 11К и *B. subtilis* 27L в качестве фунгистатических агентов для борьбы с грибной контаминацией кормов. Это способствует предотвращению накопления микотоксинов и снижению риска микотоксикозов у сельскохозяйственных животных.

3.2 Оценка биосовместимости отобранных изолятов *B. subtilis*

Возможность создания поликомпонентной или монокультурной пробиотической добавки определялась биосовместимостью исследуемых изолятов. Для оценки биосовместимости применяли метод наложения капель: суспензию одной из исследуемых культур наносили на поверхность среды в виде капли, после подсыхания которой с отступом 1–2 мм от края первой капли наносили такой же объем суспензии тестируемого изолята, обеспечивая затекание капли до половины диаметра первой. Культивирование проводили при температуре 37°C в течение 24–48 часов. Результаты оценивали визуально по наличию или отсутствию зон подавления роста (ингибирования) в зоне контакта и по периферии капель.

При совместном культивировании изолятов *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11К установлено отсутствие зон ингибирования роста между культурами, равномерный рост обеих культур в зоне контакта без признаков взаимного подавления.

Таким образом, изоляты *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K являются биосовместимыми.

3.3 Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств изолятов *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K

Для формирования первичной документации (паспорта штамма) и обоснования возможности депонирования в коллекцию микроорганизмов изучили культурально-морфологические и физиолого-биохимических свойства изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K.

Изолят *B. subtilis* 27L выделен из микробиоты слепой кишки дикого лося (*Alces alces*), а изолят *B. subtilis* 11K - из микробиоты толстого отдела кишечника дикой косули (*Capreolus pygargus*). Биологические материалы получены от диких копытных животных, обитающих в Намском районе, резко континентальной зоне Республики Саха (Якутия).

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства изучали методом посева изолятов на следующие питательные среды: МПА, МПБ, среда Китта-Тароцци, МПБ с различной концентрацией NaCl, диагностические среды Гисса, яичный бульон, картофельный агар и среда Кларка. Культивирование проводили в термостате: при 37°C – в течение 24 ч во всех указанных средах; также для оценки роста на МПА при +5°C, +10°C и +15°C вели наблюдение в течение 120 ч. Контролем служили соответствующие питательные среды без внесения исследуемых штаммов. Каждое исследование выполняли в трехкратной повторности. Результаты изучения культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K

Свойства	Признак	<i>B. subtilis</i> 27L	<i>B. subtilis</i> 11K
Культурально	Культивирование на МПА	через 18-24 часа культивирования образуют плоские колонии белого цвета с шероховатой поверхностью	

	Культивирование на МПБ	через 24 часа культивирования штаммы образуют пленку на поверхности среды, пристеночное кольцо и вызывают слабое помутнение среды		
	Описание мазков	характерные грамположительные палочки с центральной спорой, расположенные одиночно, попарно или цепочкой		
	Культивирование в анаэробных условиях	облигатные аэробы		
	Культивирование на МПА при низких плюсовых температурах			
	+5°C	±	±	
	+10°C	±	±	
	+15°C	+	+	
	Культивирование на МПБ с NaCl*			
	2%	++	++	
	5%	+	+	
	6%	+	+	
	7%	+	+	
	8%	-	-	
	9%	-	-	
	10%	-	-	
	Физиолого-биохимические свойства	Наличие каталазы	+	+
		Разложение казеина	-	+
Гидролиз крахмала		-	-	
Реакция Фогес-Проскауэра		-	-	
Лецитиназа		±	±	
Образование кислоты из:				
мальтозы		±	±	
маннита		+	+	
глюкозы		+	±	
сорбозы		+	±	
галактозы		+	+	
лактозы		±	+	
ксилозы		+	+	
дульцита		±	±	
арабинозы		-	±	

Примечание: «-» - отрицательная реакция, «+» - положительная реакция, «±» - сомнительная реакция, *интенсивность роста «+» - слабый рост, «++» - умеренный рост.

По приведённым данным (таблица 7) оба изолята соответствуют типичным признакам *B. subtilis*: грамположительные палочки со спорами; на МПА они образуют плоские белые колонии с шероховатой поверхностью, на МПБ – поверхностную пленку и пристеночное кольцо, что подтверждает их

спорообразующую аэробную природу и типичное поведение на питательных средах. Оба изолята растут при +15°C; при +5°C и +10°C рост выражен слабо ($\pm$). Оптимум роста соответствует мезофильным температурам (37°C). Оба изолята хорошо растут при 2% NaCl (++) и сохраняют рост при 5-7% (+), с прекращением роста при $\geq 8\%$, что свидетельствует об умеренной солеустойчивости. Оба изолята каталазоположительные – это типично для аэробных *Bacillus*. Различие по разложению казеина (*B. subtilis* 27L – отрицательно, *B. subtilis* 11K – положительно) указывает на более выраженную протеолитическую активность у изолята *B. subtilis* 11K. По углеводному профилю маннит, галактоза и ксилоза ферментируются обоими изолятами. По ферментации глюкозы, сорбита, лактозы и арабинозы наблюдаются различия.

3.4 Оценка вирулентности, токсичности и токсигенности изолятов *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K

Род *Bacillus* в целом рассматривают как безопасный (многие штаммы включены в список QPS/GRAS); однако безопасность новых штаммов должна проверяться *in vivo* – посредством исследований. В настоящей работе проведены исследования вирулентности, токсичности и токсигенности изолятов бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L с целью оценки их биобезопасности.

Для оценки вирулентности использовали белых беспородных мышей (15 $\pm$ 1 г), n=10 на каждую дозу. Из культур, выросших на МПА в течение 24 часов в термостате при температуре 37°C, готовили бактериальные суспензии с концентрациями от 5×10^8 до 5×10^9 КОЕ/мл. Полученные суспензии вводили внутрибрюшинно и перорально. Контрольной группе вводили 0,9% физиологический раствор теми же способами. Наблюдение вели в течение 7 суток. Результаты оценки вирулентности изолятов бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты вирулентности изолятов бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L

Наименование изолятов бактерий	Кол-во животных, п	Вводимая доза (КОЕ/мл)	Кол-во заболевших мышей (штук)	Кол-во умерших мышей (штук)	Кол-во выживших мышей (штук)
<i>B. subtilis</i> 11K	Внутрибрюшинно				
	10	5×10^8	0	0	10
	10	1×10^9	0	0	10
	10	2×10^9	0	0	10
	Перорально				
	10	2×10^9	0	0	10
	10	3×10^9	0	0	10
	10	5×10^9	0	0	10
<i>B. subtilis</i> 27L	Внутрибрюшинно				
	10	5×10^8	0	0	10
	10	1×10^9	0	0	10
	10	2×10^9	0	0	10
	Перорально				
	10	2×10^9	0	0	10
	10	3×10^9	0	0	10
	10	5×10^9	0	0	10
Контроль	Внутрибрюшинно				
	10	0,9%NaCl	0	0	10
	Перорально				
	10	0,9%NaCl	0	0	10

Как видно из представленных данных (таблица 8), изоляты бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L не проявляют вирулентности в исследованных концентрациях.

Для оценки токсигенности изоляты бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L выращивали в течение 10 суток на МПБ в термостате при температуре 37°C. По истечении указанного срока культуральную жидкость подвергали центрифугированию при 5000 об/мин в течение 30 минут. Надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования, вводили мышам внутрибрюшинно в объемах 0,5 мл и 1,0 мл (n=10 на дозу); контроль - стерильный МПБ. Наблюдение вели в течение 7 суток.

Для оценки токсичности изоляты *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L выращивали на МПА в течение 24 часов в термостате при температуре 37°C, затем смывали 0,9%-ным физиологическим раствором, готовили суспензии,

которые инактивировали нагреванием на водяной бане при 75 °С в течение 30 минут. Суспензии изолятов бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L вводили однократно внутривенно по 1,0 мл (n=5 на дозу). Контроль – физиологический раствор в аналогичных объемах. Наблюдение вели в течение 5 суток. Результаты приведены в таблице 9.

Таблица 9 - Результаты испытаний токсигенности и токсичности изолятов бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L

Токсигенность	Наименование изолятов бактерий	Кол-во животных	Вводимая доза	Кол-во заболевших мышей(штук)	Кол-во умерших мышей(штук)	Кол-во выживших мышей(штук)
	<i>B. subtilis</i> 11K	10	0,5 мл	0	0	10
		10	1мл	0	0	10
	<i>B. subtilis</i> 27L	10	0,5 мл	0	0	10
		10	1мл	0	0	10
	Контроль	10	0,5 мл стерильный МПБ	0	0	10
		10	1 мл стерильный МПБ	0	0	10
Токсичность	<i>B. subtilis</i> 11K	5	2x10 ⁹ КОЕ/мл	0	0	5
		5	3x10 ⁹ КОЕ/мл	0	0	5
		5	5x10 ⁹ КОЕ/мл	0	0	5
	<i>B. subtilis</i> 27L	5	2x10 ⁹ КОЕ/мл	0	0	5
		5	3x10 ⁹ КОЕ/мл	0	0	5
		5	5x10 ⁹ КОЕ/мл	0	0	5
	Контроль	5	0,9% NaCl	0	0	5

В течение 5-7 суток наблюдения (таблица 9) подопытные животные сохраняли клинически удовлетворительное состояние: активность, реакция на внешние раздражители и потребление корма не отличались от исходных показателей. Изменений шерстного покрова и других признаков интоксикации

не выявлено. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии проявлений токсигенности и токсичности изолятов бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L.

По результатам проведенных испытаний *in vivo* можно заключить, что изоляты бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L не обладают признаками вирулентности, токсигенности и токсичности для лабораторных мышей при примененных дозах и режимах введения.

3.5 Антибиотикочувствительность изолятов *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K

Оценка антибиотикочувствительности изолятов *B. subtilis* представляет собой ключевой аспект биобезопасности при использовании их как основы пробиотической кормовой добавки. Она позволяет гарантировать, что используемые в пробиотической добавке изоляты бактерий *B. subtilis* не будут способствовать распространению антибиотикорезистентности.

Антибиотикочувствительность изолятов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K определяли диско-диффузионным методом. Для этого готовили инокулят из агаровой суточной культуры *B. subtilis*, разведя его в физиологическом растворе до плотности 0,5 по стандарту МакФарланда.

Готовый инокулюм (объемом 1-2мл) наносили пипеткой на поверхность чашки Петри с мясопептонным агаром (МПА) и равномерно распределяли по поверхности покачиванием чашки. Избыток инокулята удаляли стерильной пипеткой. Чашку приоткрывали и подсушивали в ламинарном шкафе при комнатной температуре в течение 10-15 мин.

На поверхность засеянной питательной среды наносили диски с антибиотиками. На одну чашку Петри помещали не более 5 дисков с антибиотиками. После аппликации дисков чашки Петри помещали в термостат кверху дном и инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч.

По окончании инкубации измеряли диаметр зон подавления роста вокруг дисков с точностью до 1мм.

Результаты оценки антибиотикочувствительности изолятов бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L приведены в таблице 10.

Таблица 10- Результаты антибиотикочувствительности изолятов бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L

№	Наименование антибиотика	Диаметры зоны задержки роста, мм	
		<i>B. subtilis</i> 27L	<i>B. subtilis</i> 11K
1	Канамицин (30мкг)	27,0±0,5	23,0±0,5
2	Амоксициллин (30мкг)	31,0±0,5	29,0±1,0
3	Тетрациклин (30мкг)	13,0±0,5	13,0±0,5
4	Эритромицин(15мкг)	32,0±0,5	31,0±1,0
5	Азитромицин (30мкг)	28,0±0,5	28,0±0,5
6	Хлорамфеникол (30мкг)	26,0±0,5	31,0±1,0
7	Стрептомицин (25мкг)	19,0±0,5	20,0±0,7
8	Пенициллин G (10ЕД)	30,0±0,5	30,0±0,5
9	Цефазолин (30мкг)	47,0±0,5	42,0±1,0
10	Левифлоксацин (5мкг)	30,0±1,0	31,0±0,5

Как видно из таблицы 10, между изолятами бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K не наблюдалось существенных различий в профиле антибиотикочувствительности. Оба изолята демонстрируют высокую чувствительность к большинству протестированных антибиотиков (цефазолин, эритромицин, азитромицин, левофлоксацин, амоксициллин, хлорамфеникол, пенициллин G, канамицин) с диаметрами зон ингибирования ≥ 23 мм и умеренную чувствительность к тетрациклину и стрептомицину (зоны ингибирования 13–20 мм).

В целом полученные результаты позволяют заключить, что исследуемые изоляты *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K, выделенные из микробиоты диких копытных животных Якутии, обладают широкой чувствительностью к основным классам антибиотиков. Это является одним из основополагающих критериев биобезопасности пробиотических штаммов. Высокая чувствительность к большинству применяемых антибиотиков предполагает, что пробиотическая кормовая добавка на основе данных штаммов будет безопасной: без риска развития перекрестной антибиотикорезистентности, и передачи ее через продукцию животноводства.

3.6 Молекулярно-генетическое подтверждение и депонирование штаммов бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L

Видовую принадлежность изолятов (штаммов) бактерий *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L определяли молекулярно-генетическими методами: секвенированием переменных участков 16S рРНК и ПЦР с видоспецифическими праймерами. Исследования выполнены в НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИ генетика (приложение А, приложение Б).

Молекулярно-генетическая характеристика. Первичный скрининг последовательности переменных участков 16S rDNA (база GenBank) показал, что оба изоляты принадлежат к систематической группе: *Bacteria*; *Bacillota*; *Bacilli*; *Bacillales*; *Bacillaceae*; *Bacillus*. Результаты выравнивания и анализа в программе BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) выявили:

- для *B. subtilis* 11K – 99,7% сходства с двумя типовыми штаммами:
 - *Bacillus subtilis* strain IAM 12118 16S ribosomal RNA, complete sequence;
 - *Bacillus subtilis* strain DSM 10 16S ribosomal RNA, partial sequence;
- для *B. subtilis* 27L – 99,52 % сходства с четырьмя типовыми штаммами:
 - *Bacillus subtilis* strain IAM 12118 16S ribosomal RNA, complete sequence;
 - *Bacillus subtilis* strain DSM 10 16S ribosomal RNA, partial sequence;
 - *Bacillus subtilis* strain JCM 1465 16S ribosomal RNA, partial sequence;
 - *Bacillus subtilis* strain NBRC 13719 16S ribosomal RNA, partial sequence.

Для уточняющей идентификации применяли ПЦР с видоспецифическими праймерами. Полученный ампликон размером 1050 п.н. при использовании праймеров *secYsubF* и *secYsubR*, специфичных для *B. subtilis*, подтверждает отнесение исследуемых изолятов к виду *B. subtilis*.

Таким образом, на основании комплексного анализа - данных секвенирования 16S рРНК (схожесть $\geq 99\%$ с референсными штаммами *B.*

subtilis), положительной видоспецифической ПЦР и согласующихся физиолого-морфологических признаков — тестируемые изоляты отнесены к виду *Bacillus subtilis* с достоверностью $\geq 99\%$.

Депонирование штаммов бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K. Штаммы бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K депонированы в БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» в порядке международного патентного депонирования. Регистрационные номера: *B. subtilis* 27L VKPM В-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM В-14816. Дата депонирования - 06.09.2024 (приложение Б, приложение Г).

Таким образом, результаты проведенных исследований 6 изолятов *B. subtilis*, выделенных из микробиоты диких копытных животных Республики Саха (Якутия) позволили выявить 2 наиболее перспективных изолятов для дальнейших исследований – *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K обладающие наиболее выраженными антагонистическими свойствами по отношению к условно-патогенным микроорганизмам (*Staphylococcus* и *Enterobacteriaceae*), плесневым и токсигенным грибам (*Aspergillus spp.*, *Penicillium citrinum*, *Mucor spp*), также отсутствием вирулентности, токсигенности, токсичности и антибиотикочувствительности. Штаммы *B. subtilis* 27L VKPM В-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM В-14816 депонированы в БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт». На основе результатов исследований получены 2 патента РФ на изобретение:

- «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 11K, используемый для изготовления пробиотической кормовой добавки» (патент №2849485 С1, дата подачи заявки: 21.01.2025, опубликовано: 27.10.2025 Бюл. №30) [77];

- «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM В-14800, используемый для изготовления пробиотической кормовой добавки» (Патент №2857879 С1, дата подачи заявки: 21.01.2025, опубликовано: 11.03.2026 Бюл. №8) [78].

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ

В настоящее время на внутреннем рынке Российской Федерации отмечается устойчивый рост спроса на пробиотические кормовые добавки (ПКД) отечественного производства. Эта тенденция, в сочетании с острой необходимостью импортозамещения ассортимента кормовых добавок (КД) и внедрением инновационных технологических решений, стимулирует активное развитие в данной области [95].

При этом важными направлениями являются изыскание эффективных и безопасных пробиотических штаммов, питательных сред для их культивирования, что обеспечивает значительный научно-технологический прогресс в производстве пробиотической кормовой добавки [94, 96].

Исходя из этого, нами изучены и депонированы новые штаммы бактерий *B. subtilis*, выделенных из микробиоты диких копытных животных Якутии, для последующего использования в качестве основы КД для молодняка крупного рогатого скота.

Для изготовления ПКД выбраны штаммы *B. subtilis* 27L VKPM B-14800 (из микробиоты дикого лося) и *B. subtilis* 11K VKPM B-14816 (из микробиоты дикой косули), депонированные в БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт».

Основанием для выбора штаммов послужили их безопасность (отсутствие вирулентности, токсичности и токсигенности), биосовместимость, а также выраженная антагонистическая и антифунгальная активность в отношении условно-патогенных микроорганизмов и грибов (включая плесневые и токсигенные виды), наряду с чувствительностью к широкому ряду антибиотиков.

4.1 Разработка питательной среды для культивирования штаммов бактерий *B. subtilis* 27L VKPM B-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM B-14816

Стоимость производства пробиотической кормовой добавки в значительной степени определяется затратами на технологию ее изготовления.

Одним из основных элементов себестоимости является питательная среда, используемая для культивирования микроорганизмов. Правильно подобранная питательная среда обеспечивает повышенный выход биомассы пробиотических бактерий с сохранением их физиолого-биохимических и пробиотических свойств.

С целью выбора оптимальной технологии изготовления пробиотической кормовой добавки проведены экспериментальные исследования по подбору питательных сред для культивирования *B. subtilis* на основе зерновых отваров [97,99]. В ходе тестирования различных вариантов разработана твердая питательная среда на основе овсяного отвара с дополнительными компонентами, обеспечивающая стабильный рост *B. subtilis* [98].

Твердая питательная среда на основе овсяного отвара (г/л):

- овес — 30 г;
- вода — 1 л;
- хлорид натрия — 10 г;
- дрожжевой автолизат — 5 г;
- агар-агар пищевой — 11 г.

Способ приготовления питательной среды. Приготовление 3% овсяного отвара: семена овса промывали водопроводной водой, высушивали и размалывали на крупорушке до фракции 0,3 мм. На 1 л водопроводной воды брали навеску размолотого зерна овса массой 30 г. Смесь кипятили на водяной бане 15-20 мин, затем фильтровали через сито. Затем полученный отвар переливали в колбу Эрленмейера.

В 1 л овсяного отвара добавляли 10 г хлорида натрия, 5 г дрожжевого автолизата и 11г агар-агара пищевого. Смесь ставили на водяную баню до полного расплавления агар-агара, после чего определяли рН среды доводили его до 6,8-7,0. Стерилизацию производили при 1,1 атм. в течение 20-30 мин. После осуществляли розлив по чашкам Петри. Застывшая среда представляет собой твердую массу кремово-серого цвета.

В готовую твердую овсяную среду вносили свежеприготовленную суспензию штаммов бактерий *B. subtilis* с содержанием 5×10^9 КОЕ/см³ из расчета 0,1 мл суспензии на чашку Петри.

Культивирование производили в термостате при температуре 37°C в течение 24 часов.

Чувствительность и скорость роста штаммов бактерий *B. subtilis* определяли в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

Чувствительность среды – это максимальное разведение культуры, обеспечивающее визуально обнаруживаемый рост колоний искомого штамма в течение определенного времени и температуры на всех засеянных пробирках с питательной средой.

Скорость роста (ч) определяют как минимальное время инкубации посевов, за которое при соответствующем разведении наблюдают отчетливый рост легко дифференцируемых колоний культур на пробирках с плотной средой, различимый невооруженным глазом.

Учет роста штаммов бактерий *B. subtilis* проводили по характерному росту споровых аэробных бацилл на твердых средах и микроскопией с окраской по Граму. В качестве контролей использовали среду МПА. Описание роста штаммов бактерий *B. subtilis* в твердых питательных средах представлен в таблице 11.

Таблица 11 – Рост штаммов бактерий *B. subtilis* в питательных средах

Культивируемые штаммы бактерий	Характер роста культур на средах	
	МПА	Твердая овсяная среда
<i>B. subtilis</i> 27L VKPM B-14800	Сплошной рост, колонии имеют светло-желтоватый цвет	Сплошной обильный рост, культура имеет беловато-желтый цвет
<i>B. subtilis</i> 11K VKPM B-14816	Сплошной рост, колонии имеют светло-желтоватый цвет	Сплошной обильный рост, культура имеет беловато-желтый цвет

Как показывают данные таблицы 11, при просмотре через 24 часа рост испытуемых культур более обильный на твердой овсяной среде. При микроскопии штаммов, выросших в обеих средах, видны грамположительные палочки.

Для исследования чувствительности и скорости роста в средах готовили взвесь культуры с оптической плотностью 10МЕ по стандартному образцу мутности. Из полученной суспензии готовили 10-кратные разведения (10^{-5} – 10^{-8}) путем последовательного переноса 1 см³ взвеси культуры в пробирки с 9 см³ стерильной 0,9%-го раствора натрия хлорида. Посев осуществляли по 0,1 см³ на три скошенные пробирки с твердой овсяной средой. В качестве контроля использовали МПА. Инкубацию посевов проводили при 37°C в термостате. Учет роста культур проводили через 12, 18, 24, 30 и 48 ч.

Таблица 12 – Чувствительность и скорость роста штаммов бактерий *B. subtilis* на твердой овсяной среде

Исследуемые вариации	Чувствительность сред (№ разведения)	Скорость роста штаммов бактерий в средах (ч)				
		12	18	24	30	48
<i>B. subtilis</i> 27L VKPM B-14800						
Культивирование на МПА (контроль)	10 ⁻⁶	-	+	+	+	+
	10 ⁻⁷	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁸	-	-	-	-	-
Культивирование на твердой овсяной среде	10 ⁻⁶	-	+	+	+	+
	10 ⁻⁷	-	-	+	+	+
	10 ⁻⁸	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> 11K VKPM B-14816						
Культивирование на МПА (контроль)	10 ⁻⁶	-	+	+	+	+
	10 ⁻⁷	-	-	+	+	+
	10 ⁻⁸	-	-	-	-	-
Культивирование на твердой овсяной среде	10 ⁻⁶	-	+	+	+	+
	10 ⁻⁷	-	-	+	+	+
	10 ⁻⁸	-	-	+	+	+

Примечание: «-» - роста нет, «+» - рост есть

Из приведенных данных таблицы 12 видно, что твердая овсяная среда способствует росту из разведений на порядок ниже. Так, *B. subtilis* 27L VKPM B-14800 в контроле растет при разведении 10^{-6} , а на твердой овсяной среде - при

разведении 10^{-7} ; *B. subtilis* 11K VKPM В-14816 в контроле – при разведении 10^{-7} , а на твердой овсяной среде - при разведении 10^{-8} .

Скорость роста на твердой овсяной среде сопоставима с контролем при одинаковых разведениях (*B. subtilis* 27L VKPM В-14800: рост из разведения 10^{-6} виден через 18 ч; *B. subtilis* 11K VKPM В-14816: рост из разведения 10^{-7} виден через 24 ч). Однако даже при разведениях на порядок ниже видимый рост на твердой овсяной среде наблюдается в течение 24 ч.

Для возможности влияния твердой овсяной среды на проявление физиолого-биохимических свойств штаммов бактерий *B. subtilis* проводили пересевы на диагностические питательные среды Гисса с мальтозой, маннитом, глюкозой, сорбитом, галактозой, лактозой, ксилозой, дульцитом и арабинозой. В исследованиях также использовали готовые питательные среды, такие как мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), МПБ с добавлением NaCl (от 2 до 10%), яичный бульон для тестирования лецитиназной активности, казеиновый и картофельный агар для определения ферментативных свойств, а также среду Кларка для постановки реакции Фогеса-Проскауэра на определение ацетона. Каталазную активность выявляли в реакции с перекисью водорода (H_2O_2). В качестве контроля использовали культуры, выросшие на МПА. Результаты исследования физиолого-биохимических свойств штаммов бактерий *B. subtilis*, культивированных на твердых средах, представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Результаты исследования физиолого-биохимических свойств штаммов бактерий *B. subtilis*, культивированных на твердых средах

№	Признак	Исследуемые штаммы			
		<i>B. subtilis</i> 27L VKPM В-14800 на МПА (контроль)	<i>B. subtilis</i> 27L VKPM В-14800 на твердой овсяной среде	<i>B. subtilis</i> 11K VKPM В-14816 на МПА (контроль)	<i>B. subtilis</i> 11K VKPM В-14816 на твердой овсяной среде
1	Наличие каталазы	+	+	+	+
2	Разложение казеина	-	-	+	+
3	Гидролиз крахмала	-	-	-	-

4	Реакция Фогес-Проскауэра	-	-	-	-
5	Рост на среде				
	с 2% NaCl*	++	+++	++	+++
	с 5% NaCl*	+	+++	+	+++
	с 6% NaCl*	+	++	+	+++
	с 7% NaCl*	+	+	+	+
	с 8% NaCl*	-	-	-	-
	с 9% NaCl*	-	-	-	-
	с 10% NaCl*	-	-	-	-
6	Лецитиназа	±	±	±	±
7	Образование кислоты из:				
	мальтозы	±	+	±	+
	маннита	+	+	+	+
	глюкозы	+	+	±	+
	сорбозы	+	+	±	+
	галактозы	+	+	+	+
	лактозы	±	+	+	+
	ксилозы	+	+	+	+
	дульцита	±	±	±	±
	арабинозы	-	±	±	+

Примечание: «-» - отрицательная реакция, «+» - положительная реакция, «±» - сомнительная реакция, *интенсивность роста «+» - слабый рост, «++» - умеренный рост, «+++» - обильный рост.

Из приведенных данных видно (таблица 13), что штаммы бактерий *B. subtilis* 27L VKPM В-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM В-14816, культивируемые на разработанной твердой овсяной среде, обладают более отчетливыми свойствами, характерными для *B. subtilis*.

Таким образом новая питательная среда на основе 3%-ного овсяного отвара, 1% хлорида натрия, 0,5% дрожжевого автолизата, 1,1%-ного агар-агара пищевого обладает более высокой чувствительностью и скоростью роста, а также более выраженных физиолого-биохимическим свойств штаммов бактерий *B. subtilis* по сравнению с стандартным мясо-пептонным агаром (ГОСТ 29112-91).

Научная новизна разработки новой питательной среды для культивирования штаммов бактерий *B. subtilis* подтверждена получением

патента РФ «Твердая питательная среда для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM В-14800 и *Bacillus subtilis* 11K VKPM В-14816» [79].

В результате проведенных исследований опубликовано методическое пособие «Изготовление и использование питательных сред на основе овсяного отвара для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis*» (2025 г.) [101].

4.2 Технология получения пробиотической кормовой добавки

Полученные результаты позволяют применить новую питательную среду для разработки основы пробиотической кормовой добавки.

Для изготовления опытных образцов пробиотической кормовой добавки, использовали односуточные культуры штаммов бактерий *B. subtilis* 27L VKPM В-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM В-14816, культивированных на МПА в пробирках. Из них готовили суспензии с использованием физиологического раствора хлорида натрия (0,9%) таким образом, чтобы обе культуры имели одинаковую мутность по стандарту Мак-Фарланда, которую определяли на денситометре Den-1В.

Посев производили отдельно на матрасы с разработанной твердой средой - по 1 мл суспензии на каждый матрас. Использовали равное количество матрасов для каждого штамма (по 6 штук). Культивирование проводили в термостате при температуре 37°C в течение 3 суток.

После культивирования биомассу с поверхности матрасов смывали стерильным физиологическим раствором, получая первичные концентраты каждого штамма. Полученные концентраты разбавляли физиологическим раствором хлорида натрия (0,9%) до достижения сопоставимой мутности, затем соединяли и доводили общую концентрацию смеси до значения 9 по шкале Мак-Фарланда.

Получали около 2,5 л готовой пробиотической кормовой добавки, которую разливали в ПЭТ-бутылки объемом 250 мл, 300 мл и 500 мл.

Разработанному опытному образцу пробиотической кормовой добавки присвоили наименование «Пробисубтил» - оно образовано от сочетания «пробиотик» и *Bacillus subtilis*.

Определение внешнего вида, цвета и запаха

Для установления наличия механических примесей, хлопьев, пленок, а также целостности и прочности укупорки ПЭТ-бутылок проводили визуальный осмотр при дневном свете.

Установлено, что содержимое представляет собой полупрозрачную жидкость белого или светло-бежевого цвета с характерным придонным осадком. При встряхивании осадок легко разбивается, образуя гомогенную взвесь с мелкими хлопьями. Запах при открытии специфический, без посторонней примеси.

Определение количества жизнеспособных клеток

Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/см³) определяли чашечным методом посева на питательную среду МПА. Из пробиотической кормовой добавки готовили серии десятикратных разведений суспензий в стерильном физиологическом растворе. Посев производили поверхностно на предварительно подсушенную плотную среду МПА: по 0,1 см³ микробной суспензии из двух последовательных разведений высевали на четыре чашки Петри и равномерно распределяли шпателем Дригальского.

Засеянную поверхность подсушивали, выдерживая чашки в горизонтальном положении в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем чашки переворачивали дном вверх и помещали в термостат при 37°C на 24 часа.

После инкубации производили подсчёт выросших колоний на чашках, где число КОЕ находилось в диапазоне 30–300. Рассчитывали среднее количество КОЕ для каждого разведения и определяли концентрацию жизнеспособных клеток в исходной кормовой добавке с учётом объёма посевного материала (0,1 см³) и кратности разведения.

Установлено, что количество жизнеспособных клеток *B. subtilis* в кормовой добавке составляет не менее 1×10^8 КОЕ/см³.

Определение подлинности и pH

Для определения подлинности пробиотической добавки образцы в ПЭТ-бутылках высевали нативно по 0,1 см³ на МПБ в пробирках и на чашки Петри с МПА. После 24-48 ч инкубирования на МПА при 37°C производили визуальный анализ выросших колоний, готовили мазки, окрашивали по Граму и проводили микроскопию. На МПБ культивировали при 37°C до 5 суток. Для определения pH кормовой добавки использовали потенциометрический метод. Значение pH измеряли стационарным pH-метром Seven Easy (Mettler Toledo).

При культивировании на МПА наблюдали округлые крупные серовато-белые колонии с неровными краями. При микроскопии мазков - грамположительные палочки, нередко со спорами. На МПБ образовывали кольцо и пленку, которая при встряхивании выпадала в осадок, бульон имел легкую мутность. Несоответствий культурально-морфологическим свойствам не выявлено. pH кормовой добавки соответствовала уровню от 5,0 до 7,0.

Определение микробиологической чистоты

Для определения микробиологической чистоты из каждой ПЭТ-бутылки готовили ряд последовательных десятикратных разведений. Из первого разведения кормовой добавки проводили посев по 0,1 см³ в чашки Петри с питательными средами: МПА, Эндо, Китта-Тароцци и агар Сабуру.

Посевы на МПА, Эндо, Китта-Тароцци инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Посевы на агаре Сабуру выдерживали при температуре (32±1°C) в течение 5 сут.

По окончании культивирования фиксировали следующие результаты: на МПА - сплошной рост; на среде Эндо - рост мелких колоний серовато-бежевого цвета с неровными краями; на агаре Сабуру на 5-е сутки бактерии *B. subtilis* образовывали крупные морщинистые колонии. На среде Китта-Тароцци отмечали поверхностный рост. При микроскопии мазков из выросших колоний

на МПА, Эндо и Сабуро, окрашенных по Граму, выявляли грамположительные палочки, чаще со спорами. Наличие посторонней микрофлоры не обнаружено.

Определение безвредности

Для проведения испытаний на безвредность готовили с соблюдением стерильности смешанную пробу кормовой добавки из трех бутылок ПЭТ, которую тщательно перемешивали до получения гомогенной взвеси. Пяти мышам с помощью шприца с тупой изогнутой иглой однократно вводили через рот в желудок 0,5 см³. Наблюдали за мышами в течение 3 суток, не ограничивая их в корме и воде. В качестве контрольного испытания пяти мышам вводили 0,5 см³ дистиллированной воды. После окончания испытаний мышей усыпляли медицинским эфиром и проводили вскрытие.

Во все сроки испытаний в течение 3 суток наблюдения кормовая добавка не вызвала гибели белых мышей. После усыпления при патологоанатомическом вскрытии изменений во внутренних органах не было обнаружено.

4.3 Изучение безопасности пробиотической кормовой добавки

4.3.1 Исследования острой и хронической токсичности на лабораторных мышах

Безопасность опытной пробиотической кормовой добавки (ПКД) «Пробисубтил» оценивали в ходе исследований острой и хронической токсичности [100].

Опыт выполнен на 20 белых беспородных мышах, разделённых на четыре группы (по 5 особей в каждой):

- группа 1 (опытная) — для оценки острой токсичности;
- группа 2 (контрольная для острой токсичности) — введение физиологического раствора;
- группа 3 (опытная) — для оценки хронической токсичности;
- группа 4 (контрольная для хронической токсичности) — без введения ПКД.

При изучении острой токсичности животным опытной группы 1 однократно перорально вводили 1 мл ПКД на голову. Контрольная группа 2 получала 0,9% физиологический раствор в аналогичном объёме. После введения проводился 6-дневный период наблюдения с ежедневной регистрацией клинических показателей.

Оценка хронической токсичности проводилась на животных опытной группы 3 путём ежедневного перорального введения 0,5 мл ПКД на голову в течение 30 дней. Контрольная группа 4 не получала добавку. Содержание и кормление лабораторных животных всех 4-х групп аналогичное. Мониторинг состояния животных осуществлялся на протяжении всего периода введения.

В ходе исследования у животных опытных и контрольных групп оценивали следующие показатели:

- потребление корма и воды;
- координацию движений;
- состояние волосяного покрова;
- функциональность кишечника и мочевых путей;
- общее клиническое состояние (активность, реакция на раздражители и т. д.).

Результаты оценки острой и хронической токсичности пробиотической кормовой добавки приведены в таблице 14.

Таблица 14 – Результаты оценки острой и хронической токсичности

Группа	Кол-во животных	Режим введения	Вводимая доза	Кол-во заболевших мышей (штук)	Кол-во умерших мышей (штук)	Кол-во выживших мышей (штук)
Острая токсичность						
1 опытная	5	Однократно	1 мл ПКД на голову	0	0	5
2 контрольная	5	Однократно	0,9% NaCl 1 мл	0	0	5
Хроническая токсичность						
3 опытная	5	Ежедневно	0,5 мл ПКД на голову	0	0	5
4 контрольная	5	-	-	0	0	5

Согласно данным таблицы 14, пробиотическая добавка «Пробисубтил» не проявляет острой и хронической токсичности. Во всех группах клиническое состояние животных оставалось нормальным: потребление корма и воды было в норме, координация движений - стабильной, волосяной покров - без патологических изменений, функции желудочно-кишечного тракта и мочевыделительной системы - в пределах физиологических показателей.

Токсических эффектов и летальных случаев не выявлено. После завершения исследований мышей эвтаназировали эфиром. Патологоанатомическое исследование не обнаружило изменений во внутренних органах. Отек легких, обнаруженный при вскрытии, обусловлен методом эвтаназии (угнетение дыхания под воздействием эфира) и не связан с токсичностью кормовой добавки.

Результаты гистологических исследований внутренних органов, включая желудок и отделы кишечника не выявили патологоморфологических изменений. Протокол испытаний №4072-4074/В от 19.12.2024г. ГБУ РС(Я) «Якутской республиканской ветеринарно-испытательной лаборатории» (приложение Л),

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о безопасности применения ПКД «Пробисубтил» в опытах *in vivo* на мышах. Добавка не оказывает негативного влияния на жизнеспособность животных, не вызывает симптомов интоксикации при остром и хроническом воздействии, а также не провоцирует патологических изменений во внутренних органах. Соответственно, пробиотическая кормовая добавка «Пробисубтил» соответствует требованиям биобезопасности.

4.3.2 Исследования общей токсичности на простейших *Tetrahymena pyriformis*

Исследования общей токсичности пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» проведены на простейших *Tetrahymena pyriformis* в Федеральном научном центре Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р.

Коваленко Российской академии наук (Испытательный лабораторный центр «ВетФармТест»).

Исследовали три флакона по 100 мл опытного образца «Пробисубтил». Биотестирование проводили нативным методом: кормовую добавку вносили непосредственно в культуру *Tetrahymena pyriformis*.

Результаты представлены в Протоколе испытаний № 28/25 от 13.02.2025 г. (приложение К). По результатам проведенных исследований кормовая добавка «Пробисубтил» не оказала токсического воздействия на простейших *Tetrahymena pyriformis*, что свидетельствует об отсутствии общей цитотоксичности продукта *in vitro*.

4.4 Изучение стабильности пробиотической кормовой добавки

Для определения стабильности отобрали 45 бутылок ПЭТ объемом 250 мл, представляющих три партии ПКД «Пробисубтил» (№1, 2, 3). Образцы хранили в течение 12 месяцев при температуре от +2 до +8°C в холодильнике. Отбор проб осуществляли в контрольных точках: 0, 3, 6, 9 и 12 месяцев, причём с каждой серии на каждом временном интервале отбирали по 3 бутылки из ПЭТ для анализа. Определяли следующие показатели качества кормовой добавки: внешний вид, цвет, запах (органолептические характеристики), количество жизнеспособных клеток (КОЕ/см³), подлинность, микробиологическую чистоту, уровень pH и безвредность (таблица 15).

Таблица 15 – Результаты оценки стабильности кормовой добавки «Пробисубтил» при хранении в условиях холодильника (температура от +2 до +8°C) в течение 12 месяцев

Показатели	Характеристика и норма	Сроки исследования (месяцы)				
		0	3	6	9	12
Внешний вид	Полупрозрачная жидкость белого или светло-бежевого цвета с характерным придонным осадком. При встряхивании осадок легко разбивается, образуя гомогенную взвесь с мелкими хлопьями.	-	-	-	-	-

Цвет	светло-бежевый	-	-	-	-	-
Запах	специфический	-	-	-	-	-
Количество жизнеспособных клеток КОЕ/см ³	Не менее 1×10^8 (<i>B. subtilis</i>)	-	-	-	-	-
Подлинность	Содержит только бактерии <i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-
Микробиологическая чистота	Отсутствие посторонней микрофлоры	-	-	-	-	-
рН	5,0-7,0	6,0-6,9	5,9-6,8	5,8-6,7	5,6-6,6	5,5-6,5
Безвредность на белых мышах в тест дозе 0,5 см ³	Безвреден		-	-	-	-

Примечание: (-) – нет изменений, нарушений, (+) – есть изменения, нарушения.

Таким образом, пробиотическая кормовая добавка «Пробисубтил» сохраняет стабильность органолептических характеристик, микробиологических показателей, уровня рН и безвредности на протяжении 12 месяцев хранения при температуре от +2 до +8°C.

4.5 Расчёт экономической эффективности при применении новой питательной среды в технологии получения пробиотической кормовой добавки

Приготовление новой питательной среды является ключевым технологическим этапом при получении ПКД «Пробисубтил», поскольку данная среда используется для культивирования целевых микроорганизмов.

Затраты на приготовление 1 л твердой овсяной питательной среды рассчитывались исходя из расходов на сырье, электроэнергию и трудозатрат.

Стоимость сырья для приготовления 1 л овсяной твердой среды:

- Овес (30 г): 3 руб.
- Хлорид натрия (10 г): 2,8 руб.
- Дрожжевой автолизат (5 г): 8,6 руб.
- Агар-агар пищевой/загуститель (11 г): 33 руб.
- Водопроводная вода (1 л): 0,8 руб.

Общая стоимость сырья: 48,2 руб.

Затраты на электроэнергию:

- Электроплитка (потребление за 25 мин: 0,9167 кВт·ч при тарифе 7,47 руб/кВт·ч): 6,85 руб.
- Автоклав (потребление за один рабочий цикл стерилизации (1,1 атм, 121°C, 45 мин): 3,81 кВт·ч при тарифе 7,47 руб/кВт·ч): 28,46 руб.

Общие затраты на электроэнергию: 35,31 руб.

Трудозатраты: при нормативе выработки лаборанта-исследователя (8 часов = 1500 руб.) и объеме работ по приготовлению 1л среды, оцениваемом в 1,5 часа, трудозатраты составляют: (1500 руб. / 8 час.) 1,5 час. = 281,25 руб.

Общая расчетная себестоимость приготовления 1 л твердой овсяной питательной среды (новой среды): 48,2руб. (сырье) + 35,31 руб. (энергия) + 281,25 руб. (трудозатраты) = 364,76 руб.

Расчет экономической эффективности

Прямая экономия на производстве среды:

- Стоимость 1 л твердой овсяной среды: 364,76 руб.
- Стоимость 1 л аналога МПА: 5600 руб.

Экономия на 1 л: 5600 руб. - 364,76 руб. = 5235,24 руб.

Коэффициент экономической эффективности (выгоды на рубль инвестиций):

$$E = \frac{5600 \text{руб. (стоимость МПА)} - 364,76 \text{руб (стоимость новой среды)}}{364,76 \text{руб. (стоимость новой среды)}}$$

$$E = \frac{5235,24}{364,76} \approx 14,35$$

Каждый рубль, инвестированный в производство твердой овсяной среды, приносит примерно 14,35 рубля экономии по сравнению с использованием МПА.

Расчет показал, что приготовление 1 л новой среды составляет 5235,24 руб. Коэффициент экономической эффективности использования твердой овсяной среды - приблизительно 14,35 рубля экономии на каждый рубль инвестиций по сравнению с МПА.

Помимо прямой финансовой выгоды, внедрение твердой овсяной среды приносит значительные качественные преимущества. Её на порядок более высокая чувствительность позволяет существенно повысить точность скрининга и количественного учета микроорганизмов, снизить риск ложноотрицательных результатов и сократить время на исследования. Более выраженные физиолого-биохимические свойства новой среды способствуют более глубокой и полной характеристике штаммов, ускоряя процесс их отбора и разработки новых пробиотических продуктов. Эти не прямые экономические выгоды, хотя и не выражены в данном коэффициенте, являются критически важными для повышения эффективности научно-исследовательской и производственной деятельности.

4.6 Научно-хозяйственные опыты по применению пробиотической кормовой добавки

4.6.1 Применение ПКД «Пробисубтил» в рационе ремонтного молодняка крупного рогатого скота для профилактики желудочно-кишечных заболеваний

Научно-хозяйственный опыт по испытанию новой пробиотической кормовой добавки (ПКД) «Пробисубтил» проведен в ООО «Экоферма «Немюгю» Республики Саха (Якутия) в период стойловой зимовки.

Исследование проводилось на ремонтных телках симментальской породы в возрасте от 6 месяцев. Целью данного исследования являлось определение оптимальной длительности применения добавки на молодняке крупного рогатого скота (КРС) и оценка её влияния на организм животных.

Для проведения опыта были сформированы три группы животных: контрольная группа (n=5), животные которой не получали кормовую добавку; опытная группа 1 (n=5), получавшая ПКД в дозе 10 мл/голову ежедневно в течение 10 дней и опытная группа 2 (n=5), получавшая ПКД в дозе 10 мл/голову ежедневно в течение 30 дней.

Рацион всех ремонтных телок включал сено и комбикорм. Вода подавалась через автоматическую поилку, тип привязного содержания.

В ходе опытов отбирали пробы фекалий для микробиологического исследования: до начала опыта, на 10-е сутки - для животных первой опытной группы (после завершения 10-дневного курса применения добавки) и на 30-й день - для животных второй опытной группы (после завершения 30-дневного курса применения добавки). Забор проб крови проводили до начала и на 30-й день опыта. Учет живой массы молодняка осуществляли до начала и по завершении опыта.

Значительный интерес представляет оценка воздействия пробиотической кормовой добавки на микрофлору желудочно-кишечного тракта молодняка. Известно, что состояние микробиома кишечника напрямую коррелирует со здоровьем, иммунитетом и продуктивностью животных, особенно при использовании пробиотических добавок. В связи с этим проведены микробиологические исследования фекалий опытных групп с целью изучения изменений в составе кишечной микрофлоры до и после применения пробиотической добавки.

Результаты микробиологического исследования фекалий опытных групп при применении ПКД «Пробисубтил» представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Результаты микробиологических исследований фекалий опытных групп при применении ПКД «Пробисубтил»

Наименование микроорганизмов	1 опытная группа (10дней)		2 опытная группа (30дней)	
	До применения	После применения (на 10-й день)	До применения	После применения (на 30-й день)
Аэробные бациллы	4×10^4	4×10^5	6×10^2	1×10^5
Лактобактерии	1×10^2	2×10^2	2×10^2	3×10^2
Бифидобактерии	+++	+++	+++	+++
10^1	+++	+++	+++	+++
10^3	+++	+++	+++	+++
10^6	++	++	-	+
<i>E. faecium</i>	8×10^3	3×10^4	8×10^3	2×10^4
<i>E. faecalis</i>	5×10^3	6×10^3	4×10^3	-
Эшерихии Л+	1×10^5	2×10^5	8×10^4	8×10^4

Эшерихии Л-	-	-	-	-
-------------	---	---	---	---

Примечание: «+++» — обильный рост; «++» — умеренный рост; «+» — слабый рост; «-» — рост не обнаружен.

Результаты микробиологических исследований демонстрируют положительное влияние ПКД «Пробисубтил» на состав микрофлоры кишечника молодняка (таблица 16). В обеих опытных группах наблюдается увеличение численности полезных микроорганизмов, таких как аэробные бациллы (до 10^5 КОЕ/см³), лактобактерии (2×10^2 КОЕ/см³ и 3×10^2 КОЕ/см³) и *E. faecium* (до 10^4 КОЕ/см³), при сохранении отсутствия патогенных форм (Эшерихии Л-). Более выраженные изменения в сторону увеличения полезной микрофлоры отмечены во 2-й опытной группе, получавшей добавку в течение 30 дней. Это свидетельствует о потенциальной способности ПКД «Пробисубтил» модулировать кишечную микрофлору, способствуя созданию более благоприятной среды для здоровья и развития животных.

Также для комплексной характеристики влияния ПКД «Пробисубтил» на организм молодняка были проведены биохимические исследования сыворотки крови животных. Анализы выполнялись на инфракрасном анализаторе «SpectraStar 2200». В частности, изучалась динамика ключевых биохимических показателей, включая содержание общего белка и его фракций (таблица 17).

Таблица 17 - Содержание общего белка и белковых фракций сыворотки крови молодняка крупного рогатого скота до и после применения ПКД

«Пробисубтил»

Группы	Общий белок, г/л	Альбумин, %	Глобулины, %		
			Альфа	Бета	Гамма
Норма	60-85	30-50	12-20	10-16	25-40
До применения					
Контрольная	76,0±0,7	41,0±0,4	17,4±0,2	14,0±0,2	28,2±0,9
Опытная 1	74,4±0,6	40,0±0,4	17,0±0,2	13,1±0,2	30,2±0,9
Опытная 2	74,0±0,5	39,4±0,3	17,0±0,2	13,0±0,1	30,7±0,7

На 30-й день					
Контрольная	77,2±0,7	41,3±0,4	18,9±0,2	14,1±0,23	26,5±0,9
Опытная 1	75,3± 1,2	40,2±0,7	17,2±0,4	13,5±0,4	29,0±1,5
	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
Опытная 2	75,2±1,2	40,1±0,7	17,1±0,4	13,4±0,3	29,2±1,5
	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001

Данные таблицы 17 показывают, что все показатели (общий белок, альбумин, глобулиновые фракции) у ремонтных телок во всех группах оставались в пределах физиологической нормы как до, так и после применения добавки. Динамика изменений в опытных группах не имела принципиальных отличий от контрольной группы: колебания значений были незначительными и сопоставимыми между группами. Статистически значимые различия ($P \leq 0,001$) наблюдались по всем параметрам, однако измеренные значения оставались в пределах референсных интервалов (норм), что свидетельствует о безопасности применения добавки.

Применение ПКД «Пробисубтил» способствовало повышению среднесуточного прироста живой массы ремонтных телок симментальской породы на 4,7% (733 г против 700 г в контрольной группе) при 100% сохранности поголовья. Абсолютный прирост за 30 дней в опытных группах (22 кг) превысил контрольный показатель (21 кг) на 4,8%, несмотря на исходно более низкую живую массу в опытных группах (255 ± 3 кг и 246 ± 5 кг против 259 ± 5 кг в контрольной группе).

Таким образом, на основании полученных данных в качестве профилактики желудочно-кишечных заболеваний в период стойловой зимовки у 6-месячных телок рекомендуется применение ПКД «Пробисубтил» в течение 10 дней.

4.6.2 Применение ПКД «Пробисубтил» для профилактики и лечения диареи телят

Научно-хозяйственный опыт по испытанию новой ПКД «Пробисубтил» проведен в животноводческом хозяйстве ООО «Багарах» села Хатассы, Республика Саха (Якутия) в период перехода от цельного молока к заменителю (ЗЦМ). Исследование проводилось на телятах холмогорской породы в возрасте от 10 до 47 дней.

Были сформированы две опытные группы. Опытная группа 1 (n=16) включала клинически здоровых телят с лёгким нарушением стула (неустойчивая консистенция фекалий без признаков дегидратации), получала ПКД. Опытная группа 2 (n=14) состояла из телят с диарейным синдромом (водянистый стул, признаки обезвоживания) и получала ПКД. Контрольная группа (n=7) состояла из клинически здоровых телят без диарейного синдрома, не получала кормовую добавку. Обе опытные группы получали ПКД в дозе 10 мл/голову ежедневно в течение 10 дней.

Рацион телят включал цельное молоко — 1 л 1 раз в день, воду — 1–2 раза в день объёмом от 0,5 до 2 л, заменитель цельного молока (ЗЦМ) — 2 раза в день по 2–3 л в зависимости от возраста животных, а также сено в свободном доступе.

Телята до месячного возраста содержались индивидуально в деревянных загонах, а телята старше месяца — группами по 5–8 голов.

В ходе опыта проводился ежедневный клинический осмотр животных, контроль живой массы (до начала опыта и на 30-й день), а также учёт сохранности поголовья.

Для микробиологических исследований осуществляли забор проб фекалий (n=5 из каждой группы) до начала опыта, а также на 3-и, 5-е и 10-е сутки после начала применения добавки.

Результаты микробиологических исследований фекалий телят представлены в таблице 18.

Таблица 18 - Результаты микробиологических исследований фекалий телят при применении ПКД «Пробисубтил»

Наименование микроорганизмов	Контрольная группа (n=5)		Опытная группа 1 (n=5)				Опытная группа 2 (n=5)			
	До опыта	10-е сутки	До опыта	3 день	5 день	10 день	До опыта	После 3-х суток	После 5-ти суток	После 10-ти суток
Аэробные бациллы	$4,6 \times 10^5$	9×10^4	$4,6 \times 10^5$	5×10^4	$1,6 \times 10^5$	$5,4 \times 10^4$	$3,6 \times 10^5$	8×10^4	2×10^5	$2,6 \times 10^5$
Лактобактерии	1×10^7	$1,6 \times 10^8$	$3,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	2×10^4	9×10^7	8×10^7	$1,7 \times 10^9$
Бифидобактерии 10^1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Бифидобактерии 10^3	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Бифидобактерии 10^6	++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Энтерококки	3×10^3	$1,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	9×10^4	2×10^5	$5,4 \times 10^4$	3×10^3	9×10^4	$2,2 \times 10^5$	1×10^5
Эшерихии лактозоположительные (Л+)	отсутствуют	$3,6 \times 10^4$	6×10^4	$1,9 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	отсутствуют	6×10^4	$1,2 \times 10^5$	1×10^5
Эшерихии лактозоотрицательные (Л-)	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
<i>Y. enterocolitica</i>	отсутствуют	отсутствуют	1×10^2	6×10^2	отсутствуют	отсутствуют	1×10^5	3×10^3	$2,3 \times 10^2$	отсутствуют

Примечание: «+++» — рост обильный; «++» — рост умеренный; «+» — рост слабый; «отсутствуют» — рост не обнаружен

Микробиологические исследования фекалий телят (таблица 18) показали выраженное корректирующее действие ПКД «Пробисубтил» на кишечную микрофлору.

В опытной группе 1 (телята с лёгким нарушением стула), где исходно были обнаружены *Yersinia enterocolitica*, применение пробиотика привело к значительному увеличению представителей нормافлоры. К 5-му дню *Y. enterocolitica* была полностью элиминирована из микробиома, что подтверждает корректирующее действие пробиотика при дисбиотических нарушениях.

В опытной группе 2 (телята с диарейным синдромом), исходно имевшей признаки дисбактериоза (сниженный уровень нормофлоры и присутствие *Y. enterocolitica*), ПКД «Пробисубтил» продемонстрировал выраженный нормализующий эффект. К 10-му дню эксперимента зафиксировано достоверное увеличение численности лактобактерий ($1,7 \times 10^9$ КОЕ/см³) и бифидобактерий (обильный рост до 10^6 КОЕ/см³), а также полная элиминация патогенного микроорганизма *Y. enterocolitica*.

В контрольной группе, где микробный состав оставался стабильным на протяжении всего периода наблюдения, отмечался умеренный рост представителей нормافлоры, но в конце опыта, по количеству лактобактерий и лактозоположительных эшерихий уступал опытным группам. Это позволяет заключить, что применения пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» эффективно профилактирует диарейные дисбактериозы телят при переходе от цельного молока к заменителю (ЗЦМ).

Параллельно с микробиологическими исследованиями оценивали влияние ПКД «Пробисубтил» на динамику живой массы и сохранность телят с разным исходным физиологическим состоянием.

При формировании групп контрольная группа и опытная группа 1 имели сопоставимую начальную массу ($51,8 \pm 0,9$ кг и $51,7 \pm 0,4$ кг соответственно), тогда как телята опытной группы 2 изначально уступали им ($38,6 \pm 0,6$ кг).

За 30-дневный период среднесуточный прирост в контрольной группе достиг 396 г, в опытной группе 1 наблюдался прирост на 6 % выше (420 г), а в опытной группе 2 среднесуточный привес составляет 263 г, что ниже, чем контрольной и опытной группы 1, но при 100% выздоровления и отсутствие признаков диареи. При 100% сохранности поголовья во всех группах результаты подтверждают безопасность и эффективность добавки.

Таким образом, результаты научно-хозяйственного опыта подтверждают эффективность применения пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» для профилактики и лечения диарейных заболеваний телят.

По итогам исследований опубликовано методическое пособие «Технология приготовления и применения кормовой добавки «Пробисубтил» для молодняка крупного рогатого скота» (приложение М).

4.6.3 Производственные испытания пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил»

Производственные испытания пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» проведены в 7 отделениях ГКП РС(Я) «Якутский скот»: «Таастаах», «Өргөннөөх», «Кустуур», «Күллэги имени Д.П. Карманова», «Сүлдбүкээр», «Онхой», «Чкалов имени О.П. Маркова» - в период с 11.02.2026 по 01.06.2026.

Пробиотическую кормовую добавку «Пробисубтил» с содержанием *B. subtilis* в 1×10^8 КОЕ/мл давали телятам в возрасте 1-2 месяцев в дозе 10 мл на голову в течение 5-10 дней для профилактики дисбактериозов.

Результаты производственных испытаний пробиотической добавки «Пробисубтил» представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Результаты производственных испытаний пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил»

№	Наименование отделения/улусов (районов)	Голов	Сохранность поголовья
1	«Таастаах», Намский улус, с. Таастаах.	105	100%
2	«Өргөннөөх», Мегино-Кангаласский улус, с. Сыымах.	38	100%
3	«Саккырыыр», Эвено-Бытантайский улус, с. Саккырыыр	44	100%
4	«Күллэги имени Д.П. Карманова», Амгинский улус, с. Болугур.	31	100%
5	«Сүлдүкээр», Мирнинский район, с. Сүлдүкээр.	45	100%
6	«Онхой», Верхневилуйский улус, с. Липпэ Атах.	33	100%
7	«Чкалов имени О.П. Маркова», Нюрбинский улус, с. Акана,	24	100%
Итого		320	100%

По результатам производственных испытаний ПКД «Пробисубтил» была применена на 320 головах молодняка крупного рогатого скота; сохранность поголовья составила 100 %.

Исследование динамики живой массы и микробиоты телят проведено в отделении «Таастаах» Намского улуса. Животных разделили на две группы по 15 голов молодняка в каждой. Опытная и контрольная группы состояли из клинически здоровых телят. Опытная группа получала ПКД в дозе 10 мл на голову ежедневно в течение 10 дней, контрольной группе кормовую добавку не применяли. Содержание было групповым.

В ходе опыта проводили ежедневный клинический осмотр животных, контроль живой массы (до начала опыта, а также на 30-е и 60-е сутки) и учёт сохранности поголовья.

Для микробиологических исследований осуществляли забор проб фекалий до начала опыта и на 10-е сутки после начала применения добавки.

Таблица 20 – Динамика живой массы телят опытной и контрольной групп в отделении «Таастаах» ($M \pm m$, кг)

Показатель	Опытная группа	Контрольная группа	Уровень значимости
Живая масса перед началом опыта, кг	29±0,3	29±0,3	-
Живая масса на 30 сутки	42±0,3	41±0,4	p<0,05
Абсолютный прирост на 30 сутки, кг	13±0,2	12±0,2	p<0,01
Живая масса на 60 сутки	54±0,4	52±0,5	p<0,01
Абсолютный прирост на 60 сутки, кг	25±0,3	23±0,2	p<0,0001

Исходя из данных таблицы 20, применение пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» способствовало увеличению интенсивности роста телят: при сопоставимой исходной массе (29±0,3 кг) в опытной группе отмечены более высокие абсолютные приросты — на 30-е сутки 13±0,2 кг против 12±0,2 кг в контроле, на 60-е — 25±0,3 кг против 23±0,2 кг. Относительный прирост живой массы к исходной составил в опытной группе 44,8 % на 30-е сутки и 86,2 % на 60-е, тогда как в контрольной группе — соответственно 41,4 % и 79,3 %. Различия по живой массе также были выражены: на 30-е сутки — 42±0,3 кг против 41±0,4 кг, на 60-е — 54±0,4 кг против 52±0,5 кг. Стабильно более высокие среднесуточные приросты (433 г против 400 г на 30-е сутки и 417 г против 383 г на 60-е) подтверждают устойчивый ростостимулирующий эффект добавки.

Таблица 21- Результаты микробиологических исследований фекалий телят при применении ПКД «Пробисубтил»

Наименование микроорганизмов	Опытная группа		Контрольная группа	
	До применения	После применения (на 10-й день)	До применения	После применения (на 10-й день)
Аэробные бациллы	2,2x 10 ⁴	2,5x10 ⁵	5x10 ⁴	3x10 ⁵
Лактобактерии	4x10 ³	5x10 ⁴	2x10 ⁵	4x10 ⁴
Бифидобактерии 10 ¹	+++	+++	+++	+++
10 ³	++	+++	++	++
10 ⁶	+	++	-	+
<i>E. faecium</i>	4x10 ³	5x10 ⁴	2x10 ³	4x10 ³
<i>E. faecalis</i>	4,5x10 ⁴	4x10 ³	4x10 ⁵	4x10 ³

Эшерихии Л+	5×10^4	$3,2 \times 10^4$	3×10^5	3×10^4
Эшерихии Л-	$2,8 \times 10^3$	-	2×10^4	-

Примечание: «+++» — обильный рост; «++» — умеренный рост; «+» — слабый рост; «-» — рост не обнаружен.

Применение ПКД «Пробисубтил» способствовало выраженной коррекции микробиоценоза у телят опытной группы: зафиксирован значительный рост полезной микрофлоры, а также существенное снижение условно-патогенных форм, тогда как в контрольной группе динамика носила менее выраженный или нейтральный характер, что подтверждает нормализующее действие добавки на кишечную микробиоту.

Таким образом, результаты производственных испытаний подтверждают эффективность ПКД «Пробисубтил»: сохранность поголовья составила 100 %, в опытной группе зафиксированы достоверные приросты живой массы и нормализация микробиоты.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ведение скотоводства в условиях Республики Саха (Якутия) сопряжено с рядом проблем, обусловленных суровыми природно-климатическими условиями и ограниченностью качественных кормовых ресурсов. Указанные факторы приводят к развитию стрессовых состояний у животных и снижению их иммунного статуса.

Наиболее уязвимой категорией является молодняк крупного рогатого скота, у которого часто диагностируются дисбактериозы желудочно-кишечного тракта. Эти нарушения негативно влияют на рост, развитие и общую сохранность поголовья, что создает серьезные экономические риски для животноводства региона.

Перспективным и безопасным решением данной проблемы выступают кормовые добавки пробиотического действия, содержащие живые микроорганизмы, - в качестве альтернативы кормовым антибиотикам. В последние годы в научной и практической сфере отмечается растущий интерес к пробиотическим добавкам на основе бактерий рода *Bacillus*. Это обусловлено их высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям, выраженной пробиотической активностью и безопасностью применения.

Разработка пробиотических добавок на основе штаммов бактерий *B. subtilis* для животноводства направлена на повышение сохранности молодняка и получение экологически чистой продукции, что соответствует принципам биоэкономики. Особое значение имеет поиск аборигенных штаммов, адаптированных к экстремальным условиям Якутии, поскольку они потенциально обладают повышенной устойчивостью и эффективностью в местных климатических условиях.

С учетом этого нами проведен отбор изолятов *B. subtilis* из коллекции лаборатории по разработке микробных препаратов. Изоляты были выделены из микробиоты диких копытных животных Якутии: 2 изолята – из микробиоты лося, 4 изолята – из микробиоты косули. Отбор проводился по антагонистической активности в отношении условно-патогенных

микроорганизмов (*Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*) методом отсроченного антагонизма.

В результате проведенных опытов установлено, что изоляты *B. subtilis*, выделенные из микробиоты диких животных Якутии, проявляют выраженную антагонистическую активность против *S. aureus* и менее выраженную - против *E. coli*.

Для дальнейшей работы отобраны изоляты *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K благодаря их сбалансированной антагонистической активности против *S. aureus*: 14-18мм и (*St. aureus* A spp.) и 13–15 мм (*St. aureus* 3.5 spp.); относительно стабильные значения против *E. coli* (6–7 мм).

Отобранные перспективные изоляты бактерий *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K дополнительно изучили на ингибирующую активность методом совместного культивирования в отношении грамотрицательных (*Sal. enteritidis* 13076, *Sal. abortus equi* «БН-12», *E. coli* 01-17) и грамположительных бактерий (*St. aureus*). Результаты показали следующее: при пассаживировании тест-культур представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Sal. enteritidis* 13076, *Sal. abortus equi* «БН-12», *E. coli* 01-17) изоляты *B. subtilis* обеспечивали полное ингибирование роста, а при *S. aureus* наблюдалось ограничение и замедление роста с формированием единичных колоний.

Полученные результаты сопоставимы с данными других исследований. Так, Павлова А.Г. и Неустроева М.П. (2024) [73] показали, что штаммы *B. subtilis* 2СП В-14405 и *B. subtilis* 5СП В-14406, выделенные из микробиоты диких животных Якутии, обладали выраженным антагонизмом в отношении *S. aureus*. Аналогичные результаты получили А.А. Леляк с соавторами (2014): они подтвердили высокую эффективность природных сибирских штаммов *Bacillus subtilis* в подавлении роста *S. aureus* [49].

Наши наблюдения также находят подтверждение в данных Орловой Т.Н с соавторами (2018) [68]. В их исследовании антагонистическая активность *B. subtilis* в отношении *E. coli* варьировалась от средней или слабой выраженности до полного отсутствия. Такая изменчивость связана со структурными

особенностями грамотрицательных бактерий - в частности, с наличием внешней мембраны, которая служит барьером для многих антимикробных метаболитов *B. subtilis*.

Дополнительно это подтверждается работой С.А. Лазарева и Н.А. Михайлова (2023). Авторы выявили различия в активности метаболитов двух штаммов *B. subtilis* против *E. coli* ATCC 25922: метаболиты *B. subtilis* 3Н не проявляли активности, в отличие от метаболитов *B. subtilis* 1719 зона ингибирования ($14 \pm 1,1$ мм) [42]. Таким образом, антагонизм в отношении *E. coli* действительно зависит от индивидуальных свойств штаммов *B. subtilis*.

Обобщая полученные данные, отметим, что отобранные изоляты *B. subtilis* демонстрируют высокую эффективность против *S. aureus* и оказывают ингибирующее действие в отношении представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Учитывая, что ослабление иммунитета животных из-за заболеваний бактериальной этиологии повышает их восприимчивость к другим заболеваниям, особую актуальность приобретает комплексная защита поголовья – в том числе от микотоксикозов, вызванных поражением кормов плесневыми и токсигенными грибами.

С целью оценки потенциала отобранных изолятов *B. subtilis* 11К и *B. subtilis* 27L в профилактике микотоксикозов была определена их антагонистическая активность методом агаровых блоков в отношении *Aspergillus spp.*, *Penicillium citrinum*, *Mucor spp.*

В ходе проведенных опытов установлено, что изоляты *B. subtilis* 11К и *B. subtilis* 27L проявляют выраженную антагонистическую активность: в отношении *Aspergillus spp* изоляты образуют зону лизиса с одновременным ростом *B. subtilis* и на 12-е сутки ингибируют рост гриба на 92%; в отношении *Penicillium citrinum* наблюдается постепенное нарастание противогрибкового эффекта - на 12-е сутки уровень ингибирования достигает 92-93%; в отношении *Mucor spp.* зафиксирован средний уровень ингибирования (70-78%), при этом

подавление роста гриба происходит без формирования видимой прозрачной зоны лизиса.

Наблюдаемое нами фунгистатическое действие изолятов *B. subtilis* 11К и *B. subtilis* 27L в отношении *Mucor* sp. соответствует данным, полученным Копыльцова С. В. и Логунова С. В. (2021). Авторы выделили штамм *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* krd-20, который проявляет антагонизм в форме фунгистаза против широкого спектра микроскопических грибов, включая *Mucor* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp., *Trichoderma* sp. [36].

Актуальность проблемы микотоксикозов и эффективность биопрофилактики с использованием *B. subtilis* освещены в работе Былгаевой А. А. и Неустроева М. П. Авторы описывают распространение токсигенных грибов родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Stachybotrys* в сене в условиях Якутии и предполагают меры по улучшению санитарного качества сена путем использования суспензии штаммов *B. subtilis* [12]. Наши данные по антагонистической активности *B. subtilis* 11К и *B. subtilis* 27L дополняют эти исследования и расширяют набор перспективных изолятов, пригодных для биоконтроля.

Проведено исследование биосовместимости изолятов *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11К при совместном культивировании с целью создания поликомпонентной пробиотической кормовой добавки.

Поликомпонентные составы предпочтительны в современной практике, поскольку синергия штаммов рода *Bacillus* расширяет спектр полезных свойств пробиотиков, включая антимикробное и ферментное действие. Это подтверждается наличием зарегистрированных кормовых добавок, таких как «Энзимсорин», «Ветоспорин-Ж», «Пробиотик Сахабактисубтил-АС» [23, 24, 25] и других.

Результаты проведенного опыта показали, что изоляты *B. subtilis* 11К и *B. subtilis* 27L обладают биосовместимостью, что обосновывает возможность разработки пробиотической кормовой добавки на их основе.

Изоляты *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L представляют собой новые штаммы, отсутствующие в научных публикациях и не внесенные в микробные депозитории. Соответственно, первоочередной задачей стало составление первичной документации (паспорта) по ним и подтверждение их принадлежности к виду *B. subtilis*.

Для этого были проведены исследования по изучению культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств изолятов. Изоляты *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L выделены из микробиоты диких копытных животных Якутии: изолят *B. subtilis* 27L - из микробиоты слепой кишки дикого лося (*Alces alces*), а изолят *B. subtilis* 11K - из микробиоты толстого отдела кишечника дикой косули (*Capreolus pygargus*). Биологические материалы получены от диких копытных, обитающих в Намском районе Республики Саха (Якутия). Изоляты хранятся в коллекции лаборатории по разработке микробных препаратов.

Оба изолята соответствуют типичным признакам *B. subtilis*: грамположительные палочки со спорами; на МПА они образуют плоские белые колонии с шероховатой поверхностью, на МПБ – поверхностную пленку и пристеночное кольцо, что подтверждает их спорообразующую аэробную природу и типичное поведение на питательных средах.

Оба изолята растут при 15°C; хотя 5°C и 10°C рост выражен слабо. Оптимум роста соответствует мезофильным температурам (37°C). Оба изолята хорошо растут при 2% NaCl и сохраняют рост при 5-7%, с прекращением роста при $\geq 8\%$, что указывает на умеренную солеустойчивость.

Оба изолята каталазоположительны – это типично для аэробных бактерий рода *Bacillus*. При этом выявлено различие по разложению казеина: *B. subtilis* 27L дает отрицательную реакцию, а *B. subtilis* 11K – положительную, что указывает на более выраженную протеолитическую активность у последнего. По углеводному профилю оба изолята ферментируют маннит, галактозу и ксилозу, однако в отношении ферментации глюкозы, сорбита, лактозы и арабинозы наблюдаются различия между изолятами.

Опыты *in vivo* на мышах свидетельствуют об отсутствии вирулентности, токсигенности и токсичности у изолятов *B. subtilis* 11K и *B. subtilis* 27L, что подтверждает соответствие критериям GRAS (Generally Recognized As Safe) как безопасных бактерий [182].

Для обеспечения безопасности применения изолятов *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K в качестве основы кормовой добавки была проведена оценка их чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом.

Результаты теста показывают, что оба изолята обладают высокой чувствительностью к широкому спектру препаратов (цефазолин, эритромицин, азитромицин, левофлоксацин, амоксициллин, хлорамфеникол, пенициллин G, канамицин) диаметры зон ингибирования составляют ≥ 23 мм. Умеренная чувствительность отмечена в отношении тетрациклина и стрептомицина (диаметры зон ингибирования 13–20 мм).

Согласно Li et al. (2021), умеренная устойчивость к тетрациклину у ряда штаммов *B. subtilis* может иметь природный характер - быть связана с эффлюкс-насосами или модификациями рибосом [173]. Кроме того, *B. subtilis* синтезирует комплекс антимикробных соединений, таких как: циклические липопептиды (сурфактины, итурины, фэнгицины), макролиды, нерибосомные пептиды, дигидроизокумарины и линейные липопептиды, а также фосфолипидный антибиотик бацилизонин. В связи с этим предполагаем, что умеренная чувствительность к тетрациклину и стрептомицину связана с индивидуальными особенностями штаммов.

Профиль антибиотикочувствительности *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K подтверждает их безопасность для потенциального применения в качестве кормовой добавки – риск передачи генов резистентности минимален.

Совместно с Шаньдунской биотехнологической компанией «Билан» (Shandong Bee-lan Biotechnology Co., Ltd., China) изучены ферментативные активности изолятов *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K. По результатам проведенных работ установлено, что изолят *B. subtilis* 27L обладает выраженной фруктазилтрансферазной активностью 6875 Ед/дм³, а штамм *B. subtilis* 11K -

протеазной активностью: нейтральная-30,24 Ед/дм³, щелочная-17,76 Ед/дм³ и кислая -0,4 Ед/дм³ [65].

Выраженная ферментативная активность изолятов *B. subtilis* напрямую связана с их пробиотическими свойствами, поскольку ферменты участвуют в ключевых механизмах воздействия на организм животных: улучшении пищеварения, подавлении патогенов, стимуляции полезной микрофлоры и укреплении иммунитета [104].

Исходя из этого, изоляты *B. subtilis* 27L и *B. subtilis* 11K представляют собой ценные пробиотические штаммы с подтвержденной ферментативной активностью.

Для обеспечения международного признания, гарантии аутентичности штаммов и патентной защиты *B. subtilis* 27L VKPM В-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM В-14816 молекулярно-генетически подтверждены и депонированы 06.09.2024 г. в БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт».

Коллекция БРЦ ВКПМ имеет статус международного депозитарного органа (МОД) и действует в соответствии с правилами Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры, а также с национальным законодательством и внутренними правилами БРЦ ВКПМ.

Видовая принадлежность изолятов подтверждена с использованием ПЦР с праймерами *secYsubF* и *secYsubR*, специфичных для *Bacillus subtilis*. Получение ампликона размером 1050 п.н. для обоих изолятов подтвердило их отнесение к виду *Bacillus subtilis*. Дополнительный анализ 16S рРНК секвенсов с использованием программы BLAST показал высокую степень сходства: 99.7% для *B. subtilis* 11K и 99.5% для *B. subtilis* 27L. Эти данные, в сочетании с положительными видоспецифическими ПЦР и согласующимися физиолого-морфологическими признаками, позволяют с высокой степенью достоверности отнести тестируемые изоляты к виду *Bacillus subtilis* (сходство более 99%).

На основе депонированных штаммов бактерий получены два патента Российской Федерации на изобретения:

- «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 11K, используемый для изготовления пробиотической кормовой добавки» (патент №2849485 С1, дата подачи заявки: 21.01.2025, опубликовано: 27.10.2025 Бюл. №30);

- «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM В-14800, используемый для изготовления пробиотической кормовой добавки» (Патент №2857879 С1, дата подачи заявки: 21.01.2025, опубликовано: 11.03.2026 Бюл. №8).

Для изготовления пробиотической кормовой добавки проведены экспериментальные исследования по подбору питательных сред на основе зерновых отваров для культивирования *B. subtilis*. В ходе тестирования различных вариантов разработана твердая питательная среда на основе овсяного отвара с дополнительными компонентами, обеспечивающая стабильный рост *B. subtilis*.

Твердая питательная среда состоит из 3%-ного овсяного отвара, 1% хлорида натрия, 0,5% дрожжевого автолизата, 1,1%-ного агар-агара пищевого. Она обеспечивает более высокую скорость роста штаммов *B. subtilis* и выраженные физиолого-биохимические свойства бактерий по сравнению с МПА.

Научная новизна разработки новой питательной среды для культивирования штаммов бактерий *B. subtilis* подтверждена получением патента РФ «Твердая питательная среда для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM В-14800 и *Bacillus subtilis* 11K VKPM В-14816».

В результате проведенных исследований опубликовано методическое пособие «Изготовление и использование питательных сред на основе овсяного отвара для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis*» (приложение Д).

Приготовление 1 л новой питательной среды обходится в 364,76 руб., в то время как аналогичный объем стандартной МПА стоит 5600 руб. Таким образом, прямая экономия на каждые 1 л новой среды составляет 5235,24 руб. Коэффициент экономической эффективности использования твердой овсяной среды - приблизительно 14,35 рубля экономии на каждый рубль инвестиций по сравнению с МПА.

Актуальность выбора зерновых субстратов для культивирования *B. subtilis* подтверждается и данными научной литературы. Например, в работе Ширшиковой Н. В. и соавторов (2016) [136] представлен состав питательной среды на основе отвара пшеницы с карбонатом кальция. Кроме того, известны варианты использования отваров овса – как непророщенного, так и пророщенного – в качестве питательной среды и биологически активной добавки, содержащей не менее $2,0 \times 10^9$ КОЕ/мл пробиотических микроорганизмов [85, 86].

Разработанная твердая питательная среда внедрена в технологию получения пробиотической кормовой добавки. Штаммы бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM B-14800 и *Bacillus subtilis* 11K VKPM B-14816 культивировали в матрасах на новой среде, после чего суспендировали равное сочетание культур в физиологическом растворе хлорида натрия (0,9%).

Опытный образец пробиотической кормовой добавки содержит равное сочетание штаммов *Bacillus subtilis* 27L VKPM B-14800 и *Bacillus subtilis* 11K VKPM B-14816, выделенных из микробиоты диких копытных животных, в концентрации 1×10^8 КОЕ/см³, суспензированных в изотоническом растворе хлорида натрия. Кормовая добавка предназначена для применения молодняку крупного рогатого скота.

Разработанному опытному образцу пробиотической кормовой добавки присвоили наименование «Пробисубтил» - оно образовано от сочетания «пробиотик» и *Bacillus subtilis*.

Опытные образцы прошли внутрилабораторную экспертизу, включающую оценку внешнего вида, цвета, запаха, определение количества жизнеспособных клеток, подлинности, pH, а также проверку микробиологической чистоты и безвредности. По результатам экспертизы сформирована характеристика пробиотической кормовой добавки.

Для оценки безопасности ПКД «Пробисубтил» применяли комплексный подход, сочетающий исследования острой и хронической токсичности *in vivo* (на мышах) с тестами *in vitro* (на простейших). В опытах *in vivo* оценивали острую

токсичность при однократном введении добавки в дозе 1 мл и хроническую токсичность при ежедневном введении по 0,5 мл в течение 30 дней. В ходе экспериментов клиническое состояние животных во всех группах оценивалось как положительное и не отличалось от контрольных показателей: потребление корма и воды оставалось в норме, координация движений была стабильной, волосяной покров сохранял целостность без патологических изменений, а функционирование желудочно-кишечного тракта и мочевыделительной системы соответствовало физиологической норме. Важно отметить, что токсических эффектов и летальных случаев не было зафиксировано ни в одной из групп.

По завершении экспериментов мышей подвергали эвтаназии с использованием эфира. При патологоанатомическом анализе внутренних органов (брюшной и грудной полостей) патоморфологических изменений не выявлено. Обнаруженный при вскрытии отёк лёгких был обусловлен методом умерщвления и связан с депрессией дыхательного центра под воздействием эфира. Данный эффект является ожидаемым при использовании данного способа эвтаназии и не свидетельствует о токсическом действии ПКД «Пробисубтил». Дополнительные гистологические исследования внутренних органов, включая желудок и отделы кишечника, были проведены в ГБУ РС(Я) «Якутской республиканской ветеринарно-испытательной лаборатории» (Протокол испытаний №4072-4074/В от 19.12.2024г.). Результаты подтвердили отсутствие каких-либо патологических изменений в тканях, что дополнительно подтверждает безопасность добавки.

В Испытательном лабораторном центре «ВетФармТест» Федерального научного центра Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН проведены исследования *in vitro* с использованием простейших *Tetrahymena pyriformis*. Установлено, что кормовая добавка не проявляет токсического действия, что указывает на отсутствие общей цитотоксичности продукта.

В научной литературе представлено множество примеров исследований острой и хронической токсичности пробиотических добавок на мышах и

простейших (А.Г. Кощев, Н.А.Гранкина, В.В. Борисенко и др.,2015; Л.О. Пономарева, Ю.А. Лысенко, 2016; Е.С. Салмина, Н. В. Шаронина, А. З. Мухитов и др.,2022) [37, 83, 106]. Такие опыты являются стандартной процедурой для доказательства безопасности пробиотических добавок и широко применяются в доклинической оценке их токсичности.

На основании комплексных токсикологических исследований подтверждено, что опытная пробиотическая кормовая добавка (ПКД) «Пробисубтил» является биобезопасной.

Пробиотическая добавка стабильно сохраняет свои органолептические и микробиологические характеристики на протяжении 12 месяцев хранения при температуре от +2 до +8°C. В течение указанного срока внешний вид, цвет, запах, подлинность, микробиологическая чистота и безвредность, а также количество жизнеспособных клеток поддерживаются на уровне не менее 1×10^8 КОЕ/см³, а рН находится в диапазоне 5,0-7,0.

Научно-хозяйственные опыты по испытанию (ПКД) «Пробисубтил» проведены в ООО Экоферма «Немюгю» и в животноводческом хозяйстве ООО «Багарах» Республики Саха (Якутия) на молодняке крупного рогатого скота.

В ООО «Экоферма «Немюгю» опыт проводили в период стойловой зимовки на ремонтных телках симментальской породы в возрасте от 6 месяцев. Для проведения опыта были сформированы три группы животных: контрольная группа (n=5), животные которой не получали кормовую добавку; опытная группа 1 (n=5), получавшая ПКД в дозе 10 мл/голову ежедневно в течение 10 дней и опытная группа 2 (n=5), получавшая ПКД в дозе 10 мл/голову ежедневно в течение 30 дней.

Микробиологические исследования фекалий показали, что применение ПКД «Пробисубтил» способствовало увеличению численности нормальной микробиоты в обеих опытных группах - лакто- и бифидобактерий, аэробных бацилл, энтерококков - и отсутствию представителей энтеропатогенов (Эшерихии Л-).

Биохимический профиль крови ремонтных телок (общий белок, альбумин и фракции глобулинов) при применении ПКД «Пробисубтил» оставался стабильным и соответствовал физиологической норме. Незначительные колебания показателей между группами были статистически значимы ($P < 0,001$), но клинически незначимы, что подтверждает безопасность кормовой добавки для белкового обмена животных.

Применение ПКД «Пробисубтил» способствовало повышению среднесуточного прироста живой массы ремонтных тёлочек симментальской породы на 4,7 % (733 г против 700 г в контроле) при 100 % сохранности поголовья. Абсолютный прирост за 30 дней в опытных группах (22 кг) превысил контрольный показатель (21 кг) на 4,8 %.

Следует отметить, что данные получены методом промеров с ориентировочной погрешностью $\pm 5-10$ %, а размер групп составил 5 голов. Это ограничило возможность статистической обработки и снизило точность оценки эффекта. Тем не менее выявленная положительная тенденция позволяет рассматривать ПКД «Пробисубтил» как перспективный компонент рациона.

В животноводческом хозяйстве ООО «Багарах» села Хатассы (Республика Саха (Якутия)) исследование проводили в период перехода от цельного молока к заменителю (ЗЦМ), что является критическим и стрессовым периодом для телят. Исследование выполнялось на телятах холмогорской породы в возрасте от 10 до 47 дней.

Были сформированы две опытные и одна контрольная группы: опытная группа 1 включала клинически здоровых телят с лёгким нарушением стула (неустойчивая консистенция фекалий без признаков дегидратации), получавших ПКД ($n=16$); опытная группа 2 состояла из телят с диарейным синдромом (водянистый стул, признаки обезвоживания), также получавших ПКД ($n=14$); контрольная группа ($n=7$) состояла из животных, не получавших кормовую добавку. Обе опытные группы получали ПКД в дозе 10 мл/голову ежедневно в течение 10 дней.

При микробиологическом исследовании фекалий у опытных групп выявили наличие *Yersinia enterocolitica* и сниженный уровень нормافлоры, что характерно при дисбактериозов. При применении ПКД «Пробисубтил» в опытной группе 1 (телята с лёгким нарушением стула), к 5-му дню *Y. enterocolitica* была полностью элиминирована из микробиома, а в опытной группе 2 (телята с диарейным синдромом), исходно имевшей признаки дисбактериоза (сниженный уровень нормофлоры и присутствие *Y. enterocolitica*), ПКД «Пробисубтил» продемонстрировал выраженный нормализующий эффект. К 10-му дню эксперимента зафиксировано достоверное увеличение численности лактобактерий ($1,7 \times 10^9$ КОЕ/см³) и бифидобактерий (обильный рост до 10^6 КОЕ/см³), а также полная элиминация патогенного микроорганизма *Y. enterocolitica*. В контрольной группе, где микробный состав оставался стабильным на протяжении всего периода наблюдения, отмечался умеренный рост представителей нормافлоры.

Однако в конце опыта по количеству лактобактерий и лактозоположительных эшерихий она уступала опытным группам. Это позволяет заключить, что применение пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» эффективно профилактирует диарейные дисбактериозы у телят при переходе от цельного молока к заменителю (ЗЦМ).

Несмотря на ограничения метода промеров ($\pm 5-10$ % погрешности), применение ПКД «Пробисубтил» показало эффективность у здоровых телят — прирост живой массы на 6 % выше по сравнению с контролем, а также способность поддерживать рост и развитие, нормализацию микробиоты кишечника у телят с диареей; при этом удалось избежать потерь поголовья — сохранность составила 100 %.

Таким образом, результаты научно-хозяйственного опыта подтверждают эффективность применения пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» для профилактики и лечения диарейных заболеваний у молодняка крупного рогатого скота - у 6-месячных ремонтных телок во время стойловой зимовки и у телят при переходе на заменитель цельного молока.

Производственные испытания, проведённые в ГКП РС(Я) «Якутский скот» (320 голов, 7 отделений), продемонстрировали воспроизводимость эффекта «Пробисубтила» в реальных производственных условиях: сохранность поголовья составила 100 %, а приросты живой массы в опытной группе статистически значимо превышали показатели контрольной группы. В отделении «Таастаах» разница в относительном приросте живой массы составила 44,8 % против 41,4 % на 30-е сутки и 86,2 % против 79,3 % на 60-е сутки. Эти данные согласуются с результатами микробиологических исследований, выявивших нормализацию микробиоценоза в опытной группе, что подтверждает комплексный механизм действия добавки.

Эти данные коррелируют с многочисленными исследованиями, демонстрирующими положительное влияние пробиотических добавок на молодняк КРС, что связывается с улучшением нормальной микрофлоры желудочно - кишечного тракта (О.Б. Павленко, С.М. Сулейманов, П.А. Паршин и др., 2017, Т. А. Краснощекова, О.Н. Тюкавкина, 2021, Г. Ю. Кондалеева, А.Г. Менякиной, 2023, Ю.В. Матросова, А.А. Овчинников, Д.А. Савенко и др., 2024) [35, 41, 52, 71].

По итогам исследований опубликовано методическое пособие «Технология приготовления и применения кормовой добавки «Пробисубтил» для молодняка крупного рогатого скота» (2026 г.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана технология получения и применения пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» на основе равного сочетания штаммов *B. subtilis* 27L VKPM B-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM B-14816 с содержанием не менее 1×10^8 КОЕ/см³, способствующей нормализации микробиоты желудочно-кишечного тракта, повышению среднесуточных привесов и сохранности поголовья молодняка крупного рогатого скота.

2. Штаммы бактерий *B. subtilis* 27L VKPM B-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM B-14816, выделенные из микробиоты диких копытных животных Якутии, обладают выраженной антагонистической активностью в отношении *St. aureus* (зона ингибирования 13-18мм), оказывают ингибирующее действие против представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*S. enteritidis* 13076, *S. abortus equi* «БН-12», *E. coli* 01-17), а также против токсигенных и плесневых грибов: *Aspergillus spp.* (81-92%), *Penicillium citrinum* (68-93%), *Mucor spp.* (70-74%).

3. Штаммы *B. subtilis* 27L VKPM B-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM B-14816 биосовместимы и не обладают вирулентностью, токсичностью и токсигенностью.

4. Биобезопасность применения штаммов *B. subtilis* 27L VKPM B-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM B-14816 в животноводстве также подтверждена их чувствительностью к широкому спектру антибиотиков (≥ 23 мм) и умеренной чувствительностью к тетрациклину/стрептомицину (13–20 мм), что минимизирует риск перекрёстной антибиотикорезистентности.

5. Разработана твердая питательная среда на основе 3% овсяного отвара с добавлением 1% хлорида натрия, 0,5% дрожжевого автолизата и 1,1% пищевого агар-агара, используемая для оптимизации технологии получения кормовой добавки «Пробисубтил». Экономический эффект новой среды составляет 14,35 рубля на 1 рубль затрат.

6. Разработанная кормовая добавка «Пробисубтил» не обладает острой, хронической и общей токсичности на лабораторных мышах и простейших *Tetrahymena pyriformis*.

7. Кормовая добавка «Пробисубтил» при хранении при температуре от +2 до +8°C в течение 12 месяцев стабильно сохраняет следующие показатели: внешний вид, цвет, запах, количество жизнеспособных клеток (не менее 1×10^8 КОЕ/см³), подлинность, микробиологическую чистоту, уровень pH (5-8) и безвредность в тестах на белых мышах.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Депонированные и запатентованные штаммы бактерий *B. subtilis* 27L VKPM B-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM B-14816, которые могут быть использованы для разработки пробиотических препаратов и кормовых добавок.
2. Разработана пробиотическая кормовая добавка «Пробисубтил» на основе *B. subtilis* 27L VKPM B-14800 и *B. subtilis* 11K VKPM B-14816, предназначенная для профилактики и лечения дисбактериозов у молодняка крупного рогатого скота.
3. Материалы диссертационной работы вошли в методические пособия «Изготовление и использование питательных сред на основе овсяного отвара для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis*» (2025 г.) и «Технология приготовления и применения кормовой добавки «Пробисубтил» для молодняка крупного рогатого скота» (2026 г.), утвержденные Ученым советом Якутского НИИСХ имени М.Г. Сафронова ФГБУН ФИЦ ЯНЦ СО РАН.
4. Материалы данной диссертационной работы могут быть использованы в промышленном производстве пробиотических препаратов и кормовых добавок, а также научной среде в рамках научно-исследовательской деятельности и в лекционной форме на занятиях ветеринарных и сельскохозяйственных учебных заведений.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

B. subtilis – *Bacillus subtilis*

Bac. – *Bacillus*

E. coli- *Escherichia coli*

St. aureus- *Staphylococcus aureus*

S. enteritidis- *Salmonella enteritidis*

БРЦ - Биоресурсный центр

ВГНКИ- Всероссийский государственный научно-контрольный институт

ВКПМ- Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

Г/мл- грамм на миллилитр

Г-грамм

ГОСТ – государственный стандарт

ГОСТ- государственный стандарт

Д.в.н. – доктор ветеринарных наук

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Др.- другие

ЖКТ- желудочно-кишечный тракт

ИЛЦ- Испытательном лабораторном центре

КД-кормовая добавка

КЖ-культуральная жидкость

КОЕ- количество колониеобразующих единиц

КРС- крупный рогатый скот

МАФАНМ- мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Мл- миллилитр

Млн – миллион

МПА- мясо-пептонный агар

МПБ- мясо-пептонный бульон

МСХ – Министерство сельского хозяйства

МУК- Методическое указание

НИЦ- Научно-исследовательский центр

ООО- общество с ограниченной ответственностью

ОФС- общая фармакопейная статья

П.н.-пар нуклеотидов

ПКД- пробиотическая кормовая добавка

ПЦР-полимеразная цепная реакция

рРНК- рибосомальная рибонуклеиновая кислота

РС(Я) – Республика Саха (Якутия)

РФ-Российская Федерация

ТУ- технические условия

УДК – индекс Универсальной десятичной классификации

ФГБУ ВГНКИ- Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации

лекарственных средств для животных и кормов»

ЯРВИЛ-Якутская республиканская ветеринарно-испытательная лаборатория

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абилов Б. Т., Зарытовский А. И., Пашкова Л. А., Болдарева А. В. Мясную продуктивность скота повышает пробиотик «Бацелл-М» // Эффективное животноводство. — 2017. — № 9(139). — С. 22–24. — EDN: YOEFGA.
2. Абрамова Н. В. Эффективность применения пробиотического препарата «Олин» для телят при различных способах содержания // Вестник аграрной науки. — 2021. — № 1(88). — С. 75–81.
3. Алексеев И. А., Царевский И. В., Егоров Р. А. Рост и развитие телят при использовании пробиотической кормовой добавки «Басулифор» // Ветеринарный врач. — 2019. — № 1. — С. 59–67.
4. Алешин Д. Е. Продукты биотехнологической промышленности в кормлении животных: пробиотики, пребиотики, симбиотики, синбиотики и постбиотики // Фундаментальная и прикладная наука: состояние и тенденции развития. — Петрозаводск: Международный центр научного партнерства «Новая Наука» (ИП Ивановская И. И.), 2024. — С. 296–343. — EDN: ZMHCPM.
5. Аникин С. В. Биохимические показатели крови и динамика живой массы телят при применении пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus megaterium* // Главный зоотехник. — 2025. — № 4(261). — С. 18–27. — DOI: 10.33920/sel-03-2504-02.
6. Анискина М. В., Волобуева Е. С., Петенко А. И., Волкова С. А. Изучение особенностей культивирования и подбор оптимальной питательной среды для *Lactobacillus* sp // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. — 2015. — № 114. — С. 1145–1155. — EDN: VHFLYL.
7. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Ленинград: Медгиз, 1962. — 180 с.
8. Баранова Н. С., Хоштария Г. Е. Эффективность применения добавки «Мегабуст Румен» при производстве молока // Вестник АПК Верхневолжья. — 2023. — Т.1. — С. 61.

9. Батраков А. Я., Племяшов К. В., Сердюк Г. Н. Современное состояние молочного животноводства России и пути повышения его эффективности // Ветеринария. — 2023. — № 6. — С. 10–14. — DOI: 10.30896/0042-4846.2023.26.6.10-14.

10. Бескровная А. С., Молькова А. А. Влияние кормовой добавки «Эмпробио» на рост и развитие телят при заболеваниях желудочно-кишечного тракта // Научные исследования студентов в решении актуальных проблем АПК: материалы Всероссийской студенческой научно-практической конференции, Иркутск, 16–17 февраля 2023 года. Том III. — п. Молодежный: Иркутский государственный аграрный университет им. А. А. Ежевского, 2023. — С. 7–12. — EDN: ZBBVAQ.

11. Бовкун Г. Ф., Малявко И. В. Выращивание телят-гипотрофиков на основе коррекции микробиоценоза кишечника по компоненту бифидобактерий // Зоотехния. — 2021. — № 4. — С. 5–8. — DOI: 10.25708/ZT.2021.87.34.002.

12. Былгаева А. А., Неустроев М. П. Проблема микотоксикозов в условиях Якутии // Кормопроизводство. — 2021. — № 6. — С. 37–43.

13. Былгаева А. А., Скрыбина М. П., Парникова С. И., Тарабукина Н. П., Неустроев М. П. Использование пробиотика при формировании и коррекции микробиоты телят и поросят // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2018. — № 12. — С. 31–37.

14. Викторова Д. П., Андреева А. Е. Использование пробиотика «Субтиспорин» при откорме животных // Материалы IX Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум». — 2017. — URL: <https://scienceforum.ru/2017/article/2017037098> (дата обращения: 07.01.2026).

15. Владимиров Л. Н., Неустроев М. П., Тарабукина Н. П. Арктические штаммы *Bacillus subtilis* в современной микробиотехнологии // Ветеринария и кормление. — 2020. — № 2. — С. 17–20. — DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2020-2-4. EDN: NXZGYU.

16. Гаглюев А. Ч., Энговатов В. Ф., Фролов А. И. Био-Мос и Эсид Пак 4-Уэй повышают эффективность выращивания телят // Инновационные технологии в АПК: материалы Международной научно-практической конференции, Мичуринск, 21–23 ноября 2018 года / общ. ред. В. А. Бабушкин. — Мичуринск: Мичуринский государственный аграрный университет, 2018. — С. 31–37. — EDN: YYGMZF.

17. ГОСТ 26573.0–2017. Премиксы. Технические условия: национальный стандарт. — Введ. 2021–10–12. — Москва: Стандартинформ, 2020. — 8 с.

18. ГОСТ 31674–2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырьё. Методы определения общей токсичности: межгосударственный стандарт. — Введ. 2013–07–01. — Москва: Стандартинформ, 2014. — 56 с.

19. ГОСТ 31928–2013. Средства лекарственные для ветеринарного применения пробиотические. Методы определения пробиотических микроорганизмов: межгосударственный стандарт. — Введ. 2014–07–01. — Москва: Стандартинформ, 2014. — 15 с.

20. ГОСТ 32644–2014. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность — метод определения класса острой токсичности: межгосударственный стандарт. — Введ. 2015–06–01. — Москва: Стандартинформ, 2019. — 11 с.

21. ГОСТ 32647–2014. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Комбинированные исследования хронической токсичности и канцерогенности: межгосударственный стандарт. — Введ. 2015–06–01. — Москва: Стандартинформ, 2019. — 17 с.

22. ГОСТ Р 55291–2023. Средства лекарственные пробиотические для ветеринарного применения. Методы микробиологического анализа: национальный стандарт Российской Федерации. — Введ. 2023–04–01. — Москва: Российский институт стандартизации, 2023. — 17 с.

23. Государственный реестр кормовых добавок (Гален). Запись о кормовой добавке «Энзимспорин»: регистрационный номер ПВР-2-8.16/03297 /

Россельхознадзор.

—

URL:

<https://galen.vetrif.ru/react/registry/feed/registry/4f561f3b-6b15-4fbe-b7f4-37847eaf9e6f> (дата обращения: 08.04.2026). — Текст: электронный.

24. Государственный реестр кормовых добавок (Гален). Запись о кормовой добавке «Ветоспорин-Ж»: регистрационный номер ПВР-2-30.13/02962 / Россельхознадзор. — URL:

<https://galen.vetrif.ru/react/registry/feed/registry/f2da2804-dfa2-47f4-80ae-4cd97debe7f7> (дата обращения: 08.04.2026). — Текст: электронный.

25. Государственный реестр кормовых добавок (Гален). Запись о кормовой добавке «Пробиотик Сахабактисубтил-АС»: регистрационный номер РФ-КД-01131 / Россельхознадзор. — URL:

<https://galen.vetrif.ru/react/registry/feed/registry/f603a247-1fc5-4a2f-9c71-f3229e7b8279> (дата обращения: 08.04.2026). — Текст: электронный.

26. Долгошева Е. В. Влияние дрожжевого пробиотика «Румин-про» на молочную продуктивность и качество молока коров // Материалы Международного научного симпозиума, посвящённого 150-летию со дня рождения выдающегося учёного в области зоотехнии академика Е. Ф. Лискуна «Достижения зоотехнической науки в решении актуальных задач животноводства и аквакультуры»: сборник статей, Москва, 14–17 ноября 2023 года. — Москва: Российский государственный аграрный университет — Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева, 2023. — С. 362–366. — EDN: EDSHMR.

27. Дьяконов Л. П., Конюхов А. Ф., Василевич Е. Н. Методические рекомендации по изготовлению и использованию питательных сред и растворов для микробиологических целей, культивирования клеток и вирусов, МЛ // ВАСХНИЛ. Отделение ветеринарии. РИЭВ. — 1986.

28. Есауленко Н. Н., Юрин Д. А. Оптимальная продолжительность скармливания пробиотика телятам // Сборник научных трудов Северо-Кавказского научно-исследовательского института животноводства. — 2017. — Т. 6, № 3. — С. 93–98. — EDN: YJMCYV.

29. Жаймышева С. С. Мясные качества бычков-кастратов симментальской породы при скармливании кормовой добавки «Ветоспорин-актив» // Аграрный вестник Приморья. — 2022. — № 2(26). — С. 38–43. — EDN: LXSJIR.

30. Забокрицкий Н. А. Биологически активные вещества, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами родов *Bacillus* и *Lactobacillus* // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. — 2015. — Т. 17, № 3. — С. 80–90. — EDN: UJZWEJ.

31. Иванов А. И., Игнатьев В. О. Влияние пробиотика «Ветоспорин-Ж» на биохимические показатели крови при андрологических болезнях быков // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. — 2022. — № 2(62). — С. 63–68. — DOI: 10.31563/1684-7628-2022-62-2-63-68.

32. Иванова А. Ю., Полосенко О. В., Шепелин А. П. Разработка и оценка качества отечественной питательной среды для идентификации *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* // Бактериология. — 2022. — Т. 7, № 1. — С. 18–24. — DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-18-24.

33. Кван О. В., Шейда Е. В., Дускаев Г. К., Рахматуллин Ш. Г. Влияние пробиотического штамма *Bifidobacterium longum* на содержание химических элементов в биологических тканях цыплят-бройлеров при минералдефицитной диете // Аграрный вестник Урала. — 2020. — № S14. — С. 28–34.

34. Кожевников К. Ф., Кожевникова А. Р., Калюжный И. И. Диагностика и лечение диарейного синдрома у молодняка крупного рогатого скота // Проблемы и пути развития ветеринарной и зоотехнической наук: материалы Международной научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, молодых учёных и студентов, посвящённой 100-летию со дня рождения Заслуженного деятеля науки СССР, доктора ветеринарных наук, профессора кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» ФГБОУ ВО Вавиловский университет Тарасова Ивана Ивановича, Саратов, 24–25 апреля 2025 года. —

Саратов: Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н. И. Вавилова, 2025. — С. 108–111. — EDN: VITTEU.

35. Кондалеев Г. Ю., Менякина А. Г. Эффективность включения в рацион телят пробиотической добавки, содержащей *Bacillus subtilis* // Проблемы интенсивного развития животноводства и их решение: материалы Всероссийской научно-практической конференции, Брянск, 03–04 апреля 2023 года. — Брянск: Брянский государственный аграрный университет, 2023. — С. 174–177. — EDN: VFQUBG.

36. Копыльцов С. В., Логунов С. В. Штамм *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, krd-20 — продуцент фунгистатических липопептидов // Год науки и технологий 2021: сборник тезисов по материалам Всероссийской научно-практической конференции, Краснодар, 09–12 февраля 2021 года / отв. за вып. А. Г. Кощев. — Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, 2021. — С. 298. — EDN: OQLZMF.

37. Кощев А. Г., Гранкина Н. А., Борисенко В. В., Николаенко, В. И. Изучение токсикологического действия пробиотической кормовой добавки // Молодой ученый. — 2015. — №. 5-1. — С. 12-14.

38. Кравайнис Ю. Я., Коновалов А. В., Кравайне Р. С. Эффективность полимикробиологической кормовой добавки «Яросил» в инновационном развитии скотоводства // Ветеринария и кормление. — 2020. — № 3. — С. 21–24. — DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2020-3-6.

39. Кравайнис Ю. Я., Кравайне Р. С., Шкрабак Р. В., Брагинец Ю. Н., Морозов В. Ю., Шкрабак В. С. Продуктивные качества бычков при скормливании полимикробиологической кормовой добавки «Яросил» // Аграрный научный журнал. — 2022. — № 11. — С. 74–79. — DOI: 10.28983/asj.y2022i11pp74-79.

40. Краснопольский В. В., Менькова А. А. Влияние комплексного активатора микрофлоры рубца «Мегабуст Румен» на состояние рубцового содержимого у коров голштинской породы // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: материалы Международной научно-практической конференции, посвящённой памяти доктора

биологических наук, профессора, Заслуженного работника Высшей школы РФ, Почётного работника высшего профессионального образования РФ, Почётного профессора Брянской ГСХА, Почётного гражданина Брянской области Егора Павловича Ващекина, Брянск, 22 января 2024 года. — Брянск: Брянский государственный аграрный университет, 2024. — С. 70–74. — EDN: DFEYCH.

41. Краснощекова Т. А., Тюкавкина О. Н. Влияние ферментных пробиотиков на рост, развитие и обмен веществ у молодняка крупного рогатого скота // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. — 2021. — № 4. — С. 24–35.

42. Лазарев С. А., Михайлова Н. А. Противомикробные и ферментативные свойства метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* 3Н и *Bacillus subtilis* 1719 // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2023. — № 4. — С. 29–33. — DOI: 10.14427/jirai.2023.4.29.

43. Лазебник К. С., Косян Д. Б., Ларюшина И. Э. Антибактериальная активность и механизмы Quorum quenching микроорганизмов рода *Bacillus* // Животноводство и кормопроизводство. — 2023. — Т. 106, № 2. — С. 185–197. — DOI: 10.33284/2658-3135-106-2-185.

44. Ларина Н. А., Немзоров А. М., Прокопьев В. Г., Голубев В. С. Использование пребиотика «Кормомикс-МОС» в рационах телят молочного периода выращивания // Международный научно-исследовательский журнал. — 2017. — № 1-2(55). — С. 117–119. — DOI: 10.23670/IRJ.2017.55.153.

45. Ласенко М. В. Применение добавки «Био-Мос» при выращивании сельскохозяйственных животных // Матрица научного познания. — 2021. — № 2-2. — С. 66–70. — EDN: KRTIZA.

46. Лебедько Е. Я. Определение живой массы сельскохозяйственных животных по промерам: практическое руководство. — Москва: ООО «Аквариум-Принт», 2006. — 48 с. — ISBN 5-98435-574-4.

47. Левина Е. Ю., Забашта Н. Н., Головкин Е. Н., Лисовицкая Е. П., Забашта А. В. Эффективность применения комплексной кормовой добавки

«Бонака-АПК» при выращивании тёлочек голштинской породы // Кормопроизводство. — 2022. — № 10. — С. 44–48. — EDN: UPRFJB.

48. Левина Е. Ю., Забашта Н. Н., Головкин Е. Н., Синельщикова И. А., Аракчеева Е. Н. «Бонака-АПК» при откорме тёлочек на мясо // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. — 2022. — Т. 11, № 2. — С. 13–19. — DOI: 10.48612/sbornik-2022-2-3.

49. Лебяков А. А., Штерншис М. В. Антагонистический потенциал сибирских штаммов *Bacillus spp.* в отношении возбудителей болезней животных и растений // Вестник Томского государственного университета. Биология. — 2014. — № 1(26). — С. 42–55.

50. Ли В., Некрасов Р., Анисова Н. Влияние И-Сак 1026 на конверсию питательных веществ корма в мясную продукцию // Молочное и мясное скотоводство. — 2013. — № 1. — С. 17–20. — EDN: PUNXZN.

51. Мавлетшина Д. Г., Валеева Р. Т. Питательные среды для пробиотических препаратов на основе рода *Bacillus* // Химия. Экология. Урбанистика. — 2023. — Т. 1. — С. 349–353. — EDN: YBNLNB.

52. Матросова Ю. В., Овчинников А. А., Савенко Д. А., Якушенко О. С. Влияние пробиотиков в рационах молодняка крупного рогатого скота на биологические и хозяйственные особенности // Известия Кабардино-Балкарского государственного аграрного университета им. В.М. Кокова. — 2024. — №. 4 (46). — С. 55-63.

53. Медуницын Н. В., Мовсисянц А. А., Чупринина Р. П., Осипова И. Г., Евлашкина В. Ф., Ладыгина А. В., Терешкина Н. В., Абрамцева М. В. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков: методические рекомендации / разработаны ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора. — Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 60 с. — EDN: HDLAJF.

54. Методическое руководство «Морфологические исследования в ветеринарных лабораториях»: утверждено Департаментом ветеринарии МСХ РФ, 17.07.2002.

55. Михайлова О. А. Совершенствование продуктивности коров с помощью кормовой пробиотической добавки «Муцинол» // Эффективное животноводство. — 2019. — № 9(157). — С. 72–75. — DOI: 10.24411/9999-007A-2019-1072. — EDN: TFQQSC.

56. Морозова М. А., Попова С. Н., Абросимова Н. А. Эффективность применения пробиотических штаммов *Bacillus* в аквакультуре южного региона // Современные рыбные ресурсы и аквакультура в Азово-Черноморском бассейне: сборник совместных публикаций сотрудников ЮНЦ РАН и ДГТУ / под общ. ред. Г. Г. Матишова, Б. Ч. Месхи, И. В. Карманова (отв. ред.). — Ростов-на-Дону: Донской государственный технический университет, 2020. — С. 268–271. — EDN: OJJFRV.

57. Мошкина С. В., Химичева С. Н. Влияние кормовой добавки «Актив Ист» на продуктивные качества ремонтного молодняка молочного скота // Животноводство и кормопроизводство. — 2020. — Т. 103, № 3. — С. 153–164. — DOI: 10.33284/2658-3135-103-3-153.

58. Мошкина С. В., Химичева С. Н. Эффективность использования дрожжевых пробиотиков в кормлении молодняка молочного скота // Актуальные вопросы и пути их решения в ветеринарной медицине и животноводстве: сборник материалов Международной научно-практической конференции, посвящённой 90-летию со дня рождения профессора Ю. Ф. Юдичева, Тюмень, 26–28 мая 2021 года. Т. 1. — Тюмень: Государственный аграрный университет Северного Зауралья, 2021. — С. 370–376. — EDN: TNXNAE.

59. Мурленков Н. В., Шендаков А. И. Влияние пробиотиков на основе сорбентов на интенсивность роста чёрно-пёстрых телят // Биология в сельском хозяйстве. — 2023. — № 1(38). — С. 13–16. — EDN: XIOVBK.

60. Мухаммадиев Р. С., Каримуллина И. Г., Шангараев Р. И., Мухаммадиева А. С., Акбашев И. Р., Сорокина Д. А., Хусаинова Г. И.

Сравнительная характеристика штаммов *Bacillus subtilis* как перспективных кандидатов в пробиотики для животноводства // Ветеринария Кубани. — 2024. — № 5. — С. 23–27. — DOI: 10.33861/2071-8020-2024-5-23-27.

61. Мысик А. Т., Тимошенко Ю. И., Мухтарова О. М., Лепёхина Т. В., Тимошенко С. В. Состояние и развитие животноводства на современном этапе // Зоотехния. — 2023. — № 10. — С. 2–7. — DOI: 10.25708/ZT.2023.55.76.001.

62. Неустроев М. П., Тарабукина Н. П. Ветеринарное обеспечение биологической безопасности Республики Саха (Якутия) // Аграрная наука — сельскохозяйственному производству Сибири, Монголии, стран СНГ и BRICS: сборник научных докладов XXV юбилейного международного научно-практического форума, Краснообск, 29 ноября 2022 года. — Краснообск: Агронаука, 2023. — С. 293–295. — EDN: NLSLYF.

63. Неустроев М. П., Тарабукина Н. П. Проблемы и перспективы разработки биологических препаратов в Якутии // Научно-образовательная среда как основа развития агропромышленного комплекса арктических территорий: научно-практическая конференция с международным участием «Научно-образовательная среда как основа развития агропромышленного комплекса арктических территорий», посвящённая 70-летию доктора ветеринарных наук, профессора, Заслуженного деятеля науки Республики Саха (Якутия) Павловой Александры Иннокентьевны, Якутск, 10 ноября 2020 года. — Якутск: Дани-Алмас, 2021. — С. 142–148. — EDN: KBRARD.

64. Неустроев М. П., Тарабукина Н. П., Скрыбина М. П., Степанова А. М. Биопрепараты из штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из мерзлотных почв Якутии: методическое пособие / Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства имени М. Г. Сафронова; Научно-производственный центр «Хоту-Бакт». — Новосибирск: ООО «Сибирская академическая книга», 2022. — 24 с. — ISBN 978-5-6047255-6-6.

65. Неустроев М. П., Тарабукина Н. П., Павлов А. Г., Решетникова А. И. Ферментативная активность пробиотических штаммов бактерий *Bacillus subtilis* и перспективы использования в агrobiотехнологии // Российский журнал

Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2026. – № 1(57). – С. 78-84. – DOI 10.36871/vet.san.hyg.ecol.202601011. – EDN CELBLN.

66. О стратегии научно-технологического развития Российской Федерации: Указ Президента Российской Федерации от 28 февраля 2024 г. № 145. — Текст: электронный // ГАРАНТ.РУ: информационно-правовой портал. — URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/408518353> (дата обращения: 25.10.2025). — Режим доступа: для авторизованных пользователей.

67. Облогина Е. Ю., Забашта Н. Н., Головкин Е. Н., Синельщикова И. А., Лисовицкая Е. П. Результаты применения кормовой добавки пробиотического действия для повышения продуктивности дойных коров // Аграрный вестник Урала. — 2024. — Т. 24, № 01. — С. 98–107. — DOI: 10.32417/1997-4868-2024-24-01-98-107.

68. Орлова Т. Н., Иркитова А. Н., Гребенщикова А. В. Антагонистическая активность *Bacillus subtilis* // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. — 2018. — № 5(163). — С. 141–145. — EDN: XUGFET.

69. ОФС 1.7.2.0008.15. Общая фармакопейная статья. Определение концентрации микробных клеток // Государственная фармакопея Российской Федерации. — XIV изд., доп. — Введ. 01.12.2018 (Приказ Минздрава России от 31.10.2018 № 749).

70. ОФС.1.2.1.0004. Общая фармакопейная статья. Ионметрия // Государственная фармакопея Российской Федерации. — XV изд. — Введ. 01.09.2023 (Приказ Минздрава России от 20.07.2023 № 377).

71. Павленко О. Б., Сулейманов С. М., Паршин П. А., Миронова Л. П. Влияние пробиотика на микрофлору желудочно-кишечного тракта новорожденных телят // Ветеринарный врач. — 2017. — №. 4. — С. 20-25.

72. Павлов А. Г. Изучение антифунгальной активности *Bacillus subtilis* и перспективы их использования для профилактики плесневения растительных кормов в условиях Республики Саха (Якутия) // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы

XV Международной научно-практической конференции, Ульяновск, 26 июня 2025 года. — Ульяновск: Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина, 2025. — С. 821–826. — EDN: MHSFLS.

73. Павлов А. Г., Неустроев М. П. Антагонистическая активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis* 2СП В-14405 и *Bacillus subtilis* 5СП В-14406 // Ветеринария и кормление. — 2024. — № 5. — С. 72–75. — DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2024-5-17.

74. Павлов А. Г., Тарабукина Н. П., Маркова А. М., Неустроев М. П., Скрябина М. П. Оценка безопасности штаммов *Bacillus subtilis*, выделенных из природной среды Якутии // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. — 2023. — Т. 255, № 3. — С. 259–263. — DOI: 10.31588/2413_4201_1883_2_255_259.

75. Парникова С. И. Влияние пробиотика «Сахабактисубтил» на кишечный микробиоценоз при диарейных заболеваниях новорождённых телят // Региональные проблемы сельскохозяйственного производства Республики Саха (Якутия): тезисы докладов республиканской научной конференции, Якутск, 01 января 2001 года / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, Департамент кадровой политики и образования, Якутская государственная сельскохозяйственная академия. — Якутск: Якутская государственная сельскохозяйственная академия, 2001. — С. 52–53. — EDN: PGKCGV.

76. Парникова С. И., Тарабукина Н. П., Неустроев М. П. Пробиотический препарат «Сахабактисубтил» для профилактики и лечения дисбактериоза новорождённых телят: монография / под ред. М. П. Неустроева. — Новосибирск: ООО «Сибирская академическая книга», 2019. — 90 с. — ISBN 978-5-4379-0634-7. — EDN: SHIVIU.

77. Патент № 2849485 С1 Российская Федерация, МПК А61К 35/742. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 11К, используемый для изготовления пробиотической кормовой добавки; заявл. 21.01.2025; опубл. 27.10.2025 / М. П. Неустроев, Н. П. Тарабукина, М. П. Скрябина и др.; заявители: ФГБУН ФИЦ «Якутский научный центр СО РАН», ООО НПБКЦ «Хоту-Бакт».

78. Патент № 2857879 С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А61К 35/742. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM В-14800, используемый для изготовления пробиотической кормовой добавки: заявл. 21.01.2025: опубл. 11.03.2026 / М. П. Неустроев, Н. П. Тарабукина, М. П. Скрыбина и др.; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр "Якутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук", Общество с ограниченной ответственностью "Научно-производственный центр "Хоту Бакт".

79. Патент № 2858896 С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/10. Твердая питательная среда для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM В-14800 и *Bacillus subtilis* 11K VKPM В-14816: заявл. 30.06.2025: опубл. 24.03.2026 / М. П. Неустроев, Н. П. Тарабукина, А.И. Решетникова и др., заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр "Якутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук".

80. Петров Е. Б. Повышение качества санитарного состояния зон кормления и снижение стрессовых ситуаций при откорме крупного рогатого скота // Техника и оборудование для села. — 2022. — № 11(305). — С. 34–36. — DOI: 10.33267/2072-9642-2022-11-34-36.

81. Плешков В. А. Пробиотическая кормовая добавка «Бацелл-М» в рационе телят // Достижения науки и техники АПК. — 2018. — Т. 32, № 12. — С. 53–54. — DOI: 10.24411/0235-2451-2018-11215.

82. Позднякова В. Ф., Латышева О. В., Комарова О. Е. «Симбитокс» — надёжная защита от микотоксинов // Эффективное животноводство. — 2020. — № 3(160). — С. 57–58. — DOI: 10.24411/9999-007A-2020-10016.

83. Пономарева Л. О., Лысенко Ю. А. Изучение токсико-фармакологических свойств комплексной пробиотико-ферментной кормовой добавки для птицеводства // Научно-методический электронный журнал "Концепт". — 2016. — Т. 11. — С. 956–960.

84. Попов В. С. Перспективы применения метабитиков *Bacillus subtilis* для формирования микробиоценоза у поросят-отъемшей // Научные разработки и инновации в решении приоритетных задач современной зоотехнии: материалы Всероссийской (национальной) научно-практической конференции, Курск, 11 марта 2021 года. — Курск: Курская государственная сельскохозяйственная академия имени И. И. Иванова, 2021. — С. 82–87. — EDN: NPVRXU.

85. Попов В. С., Свазлян Г. А., Наумов Н. М. Биологически активные добавки с метабитами для животных: брошюра. — Курск: Курский федеральный аграрный научный центр, 2024. — 64 с. — ISBN 978-5-605-29126-8.

86. Попов В. С., Свазлян Г. А., Наумов Н. М. Биологические аспекты культивирования и применения активных метаболитов пробиотика *B. subtilis* // Аграрная наука. — 2022. — № 5. — С. 137–142.

87. Попов П. А., Бабунова В. С. Антибиотики в мясе как фактор, способствующий развитию антибиотикорезистентности // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии имени Я. Р. Коваленко. — 2022. — Т. 82, № 2. — С. 51–54. — DOI: 10.31016/viev-2022-82-2-10.

88. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. № 4 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 „Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней“ (с изменениями и дополнениями)». — Текст: электронный // ГАРАНТ.РУ: информационно-правовой портал. — URL: <https://base.garant.ru/400342149/> (дата обращения: 23.10.2025).

89. Похиленко В. Д., Калмантаев Т. А., Дунайцев И. А., Детушев К. В., Кисличкина А. А., Мухин Т. Н., Чукина И. А. Выделение и характеристика бактериоцина штамма *Bacillus subtilis*, изолированного из пассифлоры // Бактериология. — 2022. — Т. 7, № 1. — С. 9–17. — DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-9-17.

90. Похиленко В. Д., Перелыгин В. В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. — 2007. — № 2–3(32–33). — С. 20–41. — EDN: SJLXNB.

91. Пузевич Е. Пробиотики и антибиотики — не вместе, а вместо // Эффективное животноводство. — 2021. — № 2(168). — С. 28–41.

92. Пухаева И. В., Персаева Н. С. Пробиотики в животноводстве // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства: материалы международной научно-практической конференции, Йошкар-Ола, 23–24 марта 2023 года. Т. XXV. — Йошкар-Ола: Марийский государственный университет, 2023. — С. 715–720. — EDN: LEXHKO.

93. Решетникова А. И. Антагонистическая активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из микробиоты диких копытных животных Якутии // Вестник КрасГАУ. — 2025. — № 4(217). — С. 201–211. — DOI: 10.36718/1819-4036-2025-4-201-211.

94. Решетникова А. И. Перспективы разработки безотходной технологии получения микробных кормовых добавок для сельскохозяйственных животных // Достижения и проблемы ветеринарной медицины на Крайнем Севере Российской Федерации: сборник материалов международной научно-практической конференции, посвящённой 115-летию организации Якутской бактериологической лаборатории и проведения научных исследований по ветеринарной медицине в Якутии, Якутск, 07–08 декабря 2023 года. — Якутск: ООО «Компания „Дани-Алмас“», 2024. — С. 906–910. — EDN: MJNART.

95. Решетникова А. И. Перспективы создания пробиотических кормовых добавок // Ларионовские чтения-2023: сборник научно-исследовательских работ по итогам научно-практической конференции: в 2 ч., Якутск, 17 февраля 2023 года. — Якутск: Издательский дом СВФУ, 2023. — С. 313–316. — EDN: HANHOL.

96. Решетникова А. И., Тарабукина Н. П. Актуальность разработки безотходной технологии в производстве пробиотической кормовой добавки // Аспирантские чтения-2023: сборник материалов республиканской научной конференции, Якутск, 23 ноября 2023 года. — Якутск: Издательский дом СВФУ, 2024. — С. 98–100. — EDN: IEVJEL.

97. Решетникова А. И., Тарабукина Н. П. Новые питательные среды для культивирования штаммов бактерий *B. subtilis* // Арктика — территория стратегических научных исследований: сборник трудов II Арктического конгресса, Якутск, 20–22 сентября 2024 года. — Якутск: Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова, 2024. — С. 335–340.

98. Решетникова А. И., Тарабукина Н. П. Разработка безотходной технологии получения пробиотических кормовых добавок // Приоритетные направления повышения эффективности, конкурентоспособности и устойчивости аграрной отрасли: материалы международной научной конференции, посвящённой 105-летию ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, 10–11 июля 2025 года. — Санкт-Петербург: ООО Издательский дом «Сциентиа», 2025. — С. 452–456. — DOI: 10.32415/scientia_978-5-907902-43-5(452-456). — EDN: PRUCSP.

99. Решетникова А. И., Тарабукина Н. П., Неустроев М. П. Разработка жидкой питательной среды для культивирования пробиотического штамма бактерии *Bacillus subtilis* ТНП-3 // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. — 2024. — Т. 259, № 3. — С. 197–202. — DOI: 10.31588/2413_4201_1883_3_259_197.

100. Решетникова А.И., Тарабукина Н.П. Изучение биобезопасности новой пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил» на основе штаммов бактерий *B. subtilis* // Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета имени П.А. Костычева. — 2026. — Т.18, №1. — С. 60-67. — DOI: 10.36508/RSATU.2026.10.84.008.

101. Решетникова А.И., Тарабукина Н.П., Неустроев М.П., Маркова А.М., Павлов А.Г. Изготовление и использование питательных сред на основе овсяного

отвара для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis*: методическое пособие. — Якутск: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр, 2025. — 18 с. — ISBN 978-5-91441-506-5.

102. Руин В. А., Прытков Ю. Н., Кистина А. А. Применение кормовой добавки «БиоПримум сухой» в кормлении коров // Аграрный научный журнал. — 2022. — № 5. — С. 59–61. — DOI: 10.28983/asj.y2022i5pp59-61.

103. Савельева Л. Н. Сравнительная оценка диагностических методов желудочно-кишечных расстройств у телят // Вестник КрасГАУ. — 2021. — № 11(176). — С. 154–159. — DOI: 10.36718/1819-4036-2021-11-154-159.

104. Савустьяненко А. В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* // Актуальная инфектология. — 2016. — №. 2 (11). — С. 35-44.

105. Саидов Ш. Х. Способ получения пробиотика Субтилбен в форме таблеток и его профилактическая эффективность при сальмонеллёзе телят: специальность 06.02.02 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук. — Душанбе, 2012. — 22 с. — EDN: QIINTF.

106. Салмина Е. С., Шаронина Н. В., Мухитов А. З., Мерчина С. В., Феоктистова Н. А. Определение хронической токсичности пробиотика *Bacillus coagulans* // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. НЭ Баумана. — 2022. — Т. 252. — №. 4. — С. 210-215.

107. Сапунова Л. И. Кормовые добавки на основе дрожжевых грибов: получение и эффективность использования // Биотехнология: достижения и перспективы развития: сборник материалов IV международной научно-практической конференции, Пинск, 20–22 ноября 2019 года / Министерство образования Республики Беларусь, Полесский государственный университет; ред. кол.: Шебеко К. К. (гл. ред.), Волкова Е. М., Кручинский Н. Г., Никандров В. Н., Чещевик В. Т. — Пинск: Полесский государственный университет, 2019. — С. 32–35. — EDN: TIMREA.

108. Саттори И., Сафаралиев А. Р., Рахимов А. А. Разработка эффективной питательной среды для культивирования бактерии-антагониста // Доклады Таджикской академии сельскохозяйственных наук. — 2024. — № 4(82). — С. 154–160. — EDN: ICYJKD.

109. Саторов Н. Р. Разработка технологии производства пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* и их эффективность при инфекционных энтеритах телят: специальность 06.02.02 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора биологических наук. — Казань, 2013. — 38 с. — EDN: SVGZOP.

110. Сверчкова Н. В. Пробиотические препараты на основе бактерий рода *Bacillus* для животноводства, птицеводства и промышленного рыбоводства // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сборник научных трудов. Т. 12. — Минск: РУП «Издательский дом „Белорусская наука“», 2020. — С. 252–264. — EDN: EFAAKS.

111. Семина Н. А., Сидоренко С. В., Резван С. П., Грудинина С. А. [и др.] Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания / Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии (Н. А. Семина, С. В. Сидоренко); Государственный научный центр по антибиотикам (С. П. Резван, С. А. Грудинина); НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии (Л. С. Страчунский, О. У. Стецюк, Р. С. Козлов, М. В. Эйдельштейн); кафедра микробиологии и химиотерапии Российской медицинской академии последипломного образования (Е. А. Ведьмина, Л. Г. Столярова, И. В. Власова); Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (З. С. Середа). — Москва: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. — 91 с.

112. Сидоров М. А., Скородумов Д. И., Федотов В. Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. — Москва: Колос, 1995. — С. 90–95.

113. Скрыбина М. П., Степанова А. М., Тарабукина Н. П., Неустроев М. П. Ферментативная активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из мерзлотных почв // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». — 2020. — № 1(33). — С. 73–79. — DOI: 10.36871/vet.san.hyг.ecol.202001011. — EDN: PPSAJJ.

114. Смирнов А. М., Тюрин В. Г., Семёнов В. Г. Проблемы производства экологически безопасной продукции животноводства и пути их решения // Ветеринария и кормление. — 2024. — № 3. — С. 12–18. — DOI: 10.30917/АТТ-VK-1814-9588-2024-3-1. — EDN: UBRDSQ.

115. Степанов А. И., Неустроев М. П., Петрова С. Г., Эльбядова Е. И., Попов А. А., Тарабукина Н. П., Юров К. П. Результаты разработки микробных препаратов в коневодстве // Ветеринария и кормление. — 2018. — № 2. — С. 78–81. — DOI: 10.30917/АТТ-VK-1814-9588-2018-2-20.

116. Ступина Е. С., Ткаченко М. Н. Эффективность использования пробиотика «Оптисаф» при выращивании телят // Достижения и перспективы научно-инновационного развития АПК: сборник статей по материалам II Всероссийской (национальной) научно-практической конференции с международным участием, Курган, 18 февраля 2021 года. — Курган: Курганская государственная сельскохозяйственная академия им. Т. С. Мальцева, 2021. — С. 917–921. — EDN: JOSKFU.

117. Султангазин Г. М., Султангазина Г. С. Формирование гуморального иммунитета у телят при применении пробиотика «Энзимспорин» // Рациональное использование сырья и создание новых продуктов биотехнологического назначения: материалы Международной научно-практической конференции по актуальным проблемам в области биотехнологии, Орёл, 06 июня 2018 года. — Орёл: ООО ПФ «Картуш», 2018. — С. 230–234. — EDN: XWHVZJ.

118. Суханова С. М., Захарова Н. Е., Конду Э. И., Голубенко И. А. Методы контроля бактериологических питательных сред: методические указания / Федеральное государственное учреждение науки «Государственный

научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л. А. Тарасовича» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. — Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. — 67 с.

119. Сухинин А. А., Краснопеев А. Ю., Горшкова А. С., Белых О.И., Липко И., Потапов С.А., Тихонова И.В., Батомункуев А.С., Логинова С.Н. Генетическое разнообразие бактерий кишечника крупного рогатого скота, выявленное с помощью высокопроизводительного секвенирования // Международный вестник ветеринарии. — 2022. — № 3. — С. 27–36. — DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.3.27.

120. Сычева И. Н., Казакова Е. В., Латынина Е. С., Свистунов Д.В., Артюхова Н.С. Использование пробиотиков для повышения продуктивных качеств сельскохозяйственных животных // Вестник АПК Верхневолжья. — 2024. — № 2(66). — С. 46–53. — DOI: 10.35694/YARCX.2024.66.2.006.

121. Тагиров Х. Х., Вагапов Ф. Ф., Гизатова Н. В. Технологические свойства молока, полученного от коров, в рацион которых входил «Ветоспорин-актив», при выработке творога // Перспективы развития науки и образования: сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции, Тамбов, 30 декабря 2017 года. Ч. 3. — Тамбов: ООО «Консалтинговая компания Юком», 2017. — С. 146–148.

122. Тарабукина Н. П., Былгаева А. А., Степанова А. М., Парникова С.И., Неустроев М.П. Новые перспективные штаммы *Bacillus subtilis*, выделенные из мерзлотных почв Якутии // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. — 2023. — Т. 53, № 2. — С. 85–93. — DOI: 10.26898/0370-8799-2023-2-11.

123. Тарабукина Н. П., Маркова А. М., Неустроев М. П., Парникова С.И., Скрябина М.П. Изучение кишечного микробиома сибирской косули // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. — 2023. — № 3. — С. 128–136. — DOI: 10.26897/0021-342X-2023-3-128-136.

124. Топурия Г. М. Применение пробиотической кормовой добавки при выращивании телят // Известия Оренбургского государственного аграрного

университета. — 2025. — № 1(111). — С. 248–253. — DOI: 10.37670/2073-0853-2025-111-1-248-253.

125. Тюкавкина О. Н., Краснощёкова Т. А. Влияние пробиотика «Целлобактерин» на рост молодняка крупного рогатого скота и активность симбиотирующей микрофлоры ЖКТ // Агропромышленный комплекс: проблемы и перспективы развития: материалы всероссийской научно-практической конференции: в 2 ч., Благовещенск, 11 апреля 2018 года. Ч. 1. — Благовещенск: Дальневосточный государственный аграрный университет, 2018. — С. 262–263. — EDN: XVEQYX.

126. Тюлюмджиева О. С., Халгаева К. Э., Мередов С., Авжаева О. А., Сангаджиева Е. В. Применение новых технологических приёмов при выращивании мясного скота в условиях АО ПЗ «Улан-Хееч» Яшкульского района Республики Калмыкия // Сельское хозяйство и экосистемы в современном мире: региональные и межстрановые исследования. — 2024. — Т. 3, № 2. — С. 14–22. — DOI: 10.53315/2949-1231-2024-3-2-14-22.

127. Фасхутдинова Е. Р., Милентьева И. С., Проскурякова Л. А. Изучение биосовместимости пробиотических штаммов микроорганизмов с целью создания биологически активной добавки к пище // Новейшие достижения в области медицины, здравоохранения и здоровьесберегающих технологий : Сборник материалов I Международного конгресса, Кемерово, 28–30 ноября 2022 года / Под общей редакцией А. Ю. Просекова. — Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2022. — С. 445–447. — DOI: 10.21603/-I-IC-136.

128. Фёдорова А. О., Кухаренко Н. С. Клинический статус сельскохозяйственных животных при транспортных стрессах и коррекции их воздействия // Агропромышленный комплекс: проблемы и перспективы развития: материалы всероссийской научно-практической конференции, Благовещенск, 20–21 апреля 2023 года. Ч. 3. — Благовещенск: Дальневосточный государственный аграрный университет, 2023. — С. 145–152. — DOI: 10.22450/9785964205425_3_145.

129. Фёдорова О. В., Назмиева А. И., Нуретдинова Э. И., Валеева Р. Т. Пробиотические препараты на основе микроорганизмов рода *Bacillus* // Вестник Технологического университета. — 2016. — Т. 19, № 15. — С. 170–174. — EDN: WLPCEZ.

130. Филатов А. В., Шемуранова Н. А., Сапожников А. Ф. Эффективность применения кормовой добавки «Профорт» коровам в период раздоя // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. — 2019. — Т. 20, № 5. — С. 478–487. — DOI: 10.30766/2072-9081.2019.20.5.478-487.

131. Филатов А. В., Шемуранова Н. А., Сапожников А. Ф., Аникин С. В. Пробиотик «Профорт» повышает рентабельность молочного производства // Эффективное животноводство. — 2020. — № 6(163). — С. 56–58.

132. Филатов Н. В., Аристов А. В., Кудинова Н. А. Эффективность использования пробиотических кормовых добавок «Пролам» и «Бацелл-М» для профилактики желудочно-кишечных заболеваний у телят // Теория и практика инновационных технологий в АПК: материалы национальной научно-практической конференции, Воронеж, 21–25 марта 2022 года. Ч. VIII. — Воронеж: Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I, 2022. — С. 345–348. — EDN: CWBBNW.

133. Харитонов Е. Л., Остренко К. С., Лемешевский В. О. Профилактика нарушений рубцового пищеварения у растущих бычков молочных пород // Ветеринария. — 2020. — № 9. — С. 50–55. — DOI: 10.30896/0042-4846.2020.23.9.50-55.

134. Чабаяев М. Г., Цис Е. Ю., Некрасов Р. В., Кареткин Б. А., Терешкова Е. А., Мягких Ф. Ф. Влияние бифидосодержащей кормовой пробиотической добавки «Бэмби» на продуктивность, сохранность и показатели здоровья молодняка крупного рогатого скота // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: наука и высшее профессиональное образование. — 2021. — № 1(61). — С. 231–241.

135. Черданцев В. П. Использование инновационных разработок для повышения эффективности отрасли молочного животноводства // IASJ. — 2022.

— № 6. — Текст: электронный. — URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/ispolzovanie-innovatsionnyh-razrabotok-dlya-povysheniya-effektivnosti-otrasli-molochnogo-zhivotnovodstva> (дата обращения: 07.01.2026).

136. Ширшиков Н. В., Редикульцев Ю. В., Музафаров Е. Н., Гаврилова А. Б., Шевелев Д. А. Культивирование *Bacillus subtilis* в структуре безотходной технологии получения пробиотического препарата ветеринарного назначения // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. — 2016. — № 1. — С. 99–107. — EDN: WEIKPZ.

137. Щелокова В. А., Иванова И. Е. Роль пробиотиков в животноводстве // Актуальные вопросы науки и хозяйства: новые вызовы и решения: сборник материалов LIV студенческой научно-практической конференции, Тюмень, 10 ноября 2020 года. Ч. 2. — Тюмень: Государственный аграрный университет Северного Зауралья, 2020. — С. 452–458. — EDN: FHUNFF.

138. Явников Н. В. Кормовая добавка «Кормовой биопроtein» как альтернативный источник белка при откорме КРС // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В. Р. Филиппова. — 2022. — № 2(67). — С. 131–137. — DOI: 10.34655/bgsha.2022.67.2.017.

139. Abdelfattah E. M., Aly S. S., Lehenbauer T. W., Karle B. M. Effects of simplified group housing on behavior, welfare, growth performance, and health of preweaned dairy calves on a California dairy // Journal of Dairy Science. — 2024. — Vol. 107, No. 6. — P. 3927–3940.

140. Alexyuk P. G., Bogoyavlenskiy A. P., Moldakhanov Y. S., Akanova K. S., Manakbayeva A. N., Kerimov T., Berezin V. E., Alexyuk M. S. Genomic and Drug Resistance Profile of Bovine Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated in Kazakhstan // Pathogens. — 2025. — Vol. 14, No. 1. — P. 90. — DOI: 10.3390/pathogens14010090.

141. Antanaitis R., Džermeikaitė K., Krištolaitytė J., Armonavičiūtė E., Arlauskaitė S., Girdauskaitė A., Baumgartner W. Effects of *Bacillus subtilis* on Growth

Performance, Metabolic Profile, and Health Status in Dairy Calves // *Animals*. — 2024. — Vol. 14 (17): 2489. — DOI: 10.3390/ani14172489.

142. Becker J., Perreten V., Steiner A., Stucki D., Schüpbach-Regula G., Collaud A., Rossano A., Wüthrich D., Muff-Hausherr A., Meylan M. Antimicrobial susceptibility in *E. coli* and Pasteurellaceae at the beginning and at the end of the fattening process in veal calves: comparing ‘outdoor veal calf’ and conventional operations // *Veterinary Microbiology*. — 2022. — Vol. 269:109419. — DOI: 10.1016/j.vetmic.2022.109419.

143. Becker J., Schüpbach-Regula G., Steiner A., Perreten V., Wüthrich D., Hausherr A., Meylan M. Effects of the novel concept ‘outdoor veal calf’ on antimicrobial use, mortality and weight gain in Switzerland // *Preventive Veterinary Medicine*. — 2020. — Vol. 176: 104907.

144. Bernier Gosselin V., Fernandez J. E., Ollagnier C., Morel I., Siegenthaler R., Collaud A., Meylan M., Perreten V. Whole-genome sequencing-based antimicrobial resistance and shedding dynamics of *Escherichia coli* isolated from calves before and after antimicrobial group treatments // *Microbiology Spectrum*. — 2024. — Vol. 12 (4): e03214-23. — DOI: 10.1128/spectrum.03214-23.

145. Bortolami L., Barberio A., Schiavon E., Martignago F., Littamè E., Sturaro A., Gagliazzo L., De Lucia A., Ostanello F. Surveillance of Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolates from Intestinal Contents of Dairy and Veal Calves in the Veneto Region, Northeast Italy // *Animals*. — 2024. — Vol. 14 (10): 1429. — DOI: 10.3390/ani14101429

146. Branco-Lopes R., Winder C., Canozzi M. E., Lopez Y. S. A., Schmitz B., Silva-Del-Río N. Effects of probiotic supplementation on growth performance and feed intake of dairy calves: A meta-analysis // *Journal of Dairy Science*. — 2025. — Vol. 108 (9): 9501–9515. — DOI: 10.3168/jds.2025-26540.

147. Carroll A., Bell M. J., Bleach E. C., Turner D., Williams L. K. Impact of dairy calf management practices on the intestinal tract microbiome pre-weaning // *Journal of Medical Microbiology*. — 2025. — Vol. 74 (1). — DOI: 10.1099/jmm.0.001957.

148. Cella E., Okello E., Rossitto P. V., Cenci-Goga B. T., Grispoldi L., Williams D. R., Sheedy D. B., Pereira R., Karle B. M., Lehenbauer T. W., Aly S. S. Estimating the rates of acquisition and loss of resistance of Enterobacteriaceae to antimicrobial drugs in pre-weaned dairy calves // *Microorganisms*. — 2021. — Vol. 9 (10): 2103. — DOI: 10.3390/microorganisms9102103.

149. Chen H., Liu Y., Huang K., Yang B., Zhang Y., Yu Z., Wang J. Fecal microbiota dynamics and its relationship to diarrhea and health in dairy calves // *Journal of Animal Science and Biotechnology*. — 2022. — Vol. 13 (1): 132. — DOI:10.1186/s40104-022-00758-4.

150. El Jeni R., Villot C., Koyun O. Y., Osorio-Doblado A., Baloyi J. J., Lourenco J. M., Steele M., Callaway T. R. Invited review: “Probiotic” approaches to improving dairy production: reassessing “magic foo-foo dust” // *Journal of Dairy Science*. — 2024. — Vol. 107 (4): 1832–1856. — DOI: 10.3168/jds.2023-23831.

151. Fan Y., Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease // *Nature Reviews Microbiology*. — 2021. — Vol. 19, No. 1. — P. 55–71.

152. Formenti N., Martinelli C., Vitale N., Giovannini S., Salogni C., Tonni M., Scali F., Birbes L., D’Incau M., Guarneri F., Pasquali P., Alborali G. L. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in dairy calves: a 15-year retrospective analysis and comparison of treated and untreated animals // *Animals*. — 2021. — Vol. 11 (8): 2328. — DOI: 10.3390/ani11082328.

153. Gomes V., Hoffmann C., Castro-Tardón D. I., Ramos Dos Santos F. C., Suárez-Retamozo S., Hurley D. J. Vertical transfer of gut microbiota from dam to neonate calf in the early of life // *Scientific Reports*. — 2024. — Vol. 14 (1): 21746. — DOI: 10.1038/s41598-024-72296-0.

154. Gomez D. E., Li L., Goetz H., MacNicol J., Gamsjaeger L., Renaud D. L. Calf diarrhea is associated with a shift from obligated to facultative anaerobes and expansion of lactate-producing bacteria // *Frontiers in Veterinary Science*. — 2022. — Vol. 9:846383. — DOI: 10.3389/fvets.2022.846383

155. Guzman C. E., Wood J. L., Egidi E., White-Monsant A. C., Semenec L., Grommen S. V. H., Hill-Yardin E. L., De Groef B., Franks A. E. A pioneer calf foetus

microbiome // Scientific Reports. — 2020. — Vol. 10 (1): 17712. — DOI: 10.1038/s41598-020-74677-7.

156. Hammon H. M., Liermann W., Frieten D., Koch C. Importance of colostrum supply and milk feeding intensity on gastrointestinal and systemic development in calves // Animal. — 2020. — Vol. 14: s133–s143. — DOI: 10.1017/S1751731119003148.

157. Hartinger T., Pacífico C., Poier G., Terler G., Klevenhusen F., Zebeli Q. Shift of dietary carbohydrate source from milk to various solid feeds reshapes the rumen and fecal microbiome in calves // Scientific Reports. — 2022. — Vol. 12 (1): 12383.

158. He L., Wang C., Simujide H., Aricha H., Zhang J., Liu B., Aorigele C. Effects of pathogenic *Escherichia coli* infection on the flora composition, function, and content of short-chain fatty acids in calf feces // Animals. — 2022. — Vol. 12 (8): 959. — DOI:10.3390/ani12080959

159. Holman D. B., Gzyl K. E., Scott H., Service C., Prieto N., López-Campos O. Associations between the rumen microbiota and carcass merit and meat quality in beef cattle // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2024. — Vol. 108 (1): 287. — DOI: 10.1007/s00253-024-13126-1.

160. Hong H. A., Duc L. H., Cutting S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics // FEMS Microbiology Reviews. — 2005. — Vol. 29 (4). — P. 813–835. — DOI: 10.1016/j.femsre.2004.12.001.

161. Izquierdo V. S., Cappellozza B. I., Silva J. V. L., Santos G. C. M., Miranda A., Bittar J. H. J., Pickett A., Mackey S., Cooke R. F., Vendramini J. M. B., Moriel P. Maternal pre- and postpartum supplementation of a *Bacillus*-based DFM enhanced cow and calf performance // Journal of Animal Science. — 2024. — Vol. 102: skae110. — DOI: 10.1093/jas/skae110.

162. Jarrige N., Cazeau G., Bosquet G., Bastien J., Benoit F., Gay E. Effects of antimicrobial exposure on the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in the digestive flora of dairy calves // Preventive Veterinary Medicine. — 2020. — Vol. 185:105177. — DOI: 10.1016/j.prevetmed.2020.105177.

163. Jia Y., Zhang K., Cao J., Mao W. Correlation analysis of whole genome sequencing of a pathogenic *Escherichia coli* strain of Inner Mongolian origin // *Scientific Reports*. — 2024. — Vol. 14(1):15494. DOI: 10.1038/s41598-024-64256-5.
164. Kaewtapee C., Burbach K., Tomforde G., Hartinger T., Camarinha-Silva A., Heinritz S., Rosenfelder-Kuon P. Effect of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* supplementation in diets with low- and high-protein content on ileal crude protein and amino acid digestibility and intestinal microbiota composition of growing pigs // *Journal of Animal Science and Biotechnology*. — 2017. — Vol. 8, No. 1. — P. 37.
165. Keum G. B., Pandey S., Kim E. S., Doo H., Kwak J., Ryu S., Choi Y., Kang J., Kim S., Kim H. B. Understanding the diversity and roles of the ruminal microbiome // *Journal of Microbiology*. — 2024. — Vol. 62, No. 3. — P. 217–230.
166. Kholif A. E., Anele A., Anele U. Y. Microbial feed additives in ruminant feeding // *AIMS Microbiology*. — 2024. — Vol. 10, No. 3. — P. 542.
167. Kim E. T., Lee S. J., Kim T. Y., Lee H. G., Atikur R. M., Gu B. H., Kim D. H., Park B. Y., Son J. K., Kim M. H. Dynamic changes in fecal microbial communities of neonatal dairy calves by aging and diarrhea // *Animals*. — 2021. — Vol. 11 (4): 1113.
168. Kim M., Park T., Jeong J. Y., Baek Y., Lee H. J. Association between rumen microbiota and marbling score in Korean native beef cattle // *Animals*. — 2020. — Vol. 10, No. 4. — P. 712.
169. Kim S. H., Choi Y., Miguel M. A., Lee S. J., Lee S. S., Lee S. Analysis of fecal microbial changes in young calves following bovine rotavirus infection // *Veterinary Sciences*. — 2023. — Vol. 10, No. 8. — P. 496.
170. Koike S., Ueno M., Ashida N., Imabayashi T., Kobayashi Y. Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 supplementation in milk replacer on growth and rumen microbiota in preweaned calves // *Animal Science Journal*. — 2021. — Vol. 92(1): e13580.
171. Krause T. R., Lourenco J. M., Welch C. B., Rothrock M. J., Callaway T. R., Pringle T. D. The relationship between the rumen microbiome and

carcass merit in Angus steers // *Journal of Animal Science*. — 2020. — Vol. 98 (9): skaa287.

172. Lee J., Park I., Choi Y., Cho J. *Bacillus* strains as feed additives: in vitro evaluation of its potential probiotic properties // *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. — 2012. — Vol. 25 (4). — P. 577–585.

173. Li H.Y., Zhou D. D., Gan R. Y., Huang S. Y., Zhao C. N., Shang A. O., Li, H. B. Effects and mechanisms of probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics on metabolic diseases targeting gut microbiota: a narrative review // *Nutrients*. — 2021. — Vol. 13. (9). — P. 3211.

174. Li Y., Li X., Nie C., Wu Y., Luo R., Chen C., Niu J., Zhang W. Effects of two strains of *Lactobacillus* isolated from the feces of calves after fecal microbiota transplantation on growth performance, immune capacity, and intestinal barrier function of weaned calves // *Frontiers in Microbiology*. — 2023. — Vol. 14: 1249628.

175. Limede A. C., Marques R. S., Cidrini F. A., Cruz V. A., Queiroz A. C., Cidrini I. A., Cappellozza B. I. Effects of a *Bacillus*-based direct-fed microbial on digestibility, ruminal in situ nutrient disappearance, microbiome, and fermentation parameters in forage-fed beef cattle // *Journal of Animal Science*. — 2025. — Vol. 103: skaf093.

176. Liu S., Yang L., Zhang Y., Chen H., Li X., Xu Z., Liu D. Review of yeast culture concerning the interactions between gut microbiota and young ruminant animals // *Frontiers in Veterinary Science*. — 2024. — Vol. 11: 1335765.

177. Loch M., Dorbek-Sundström E., Husso A., Pessa-Morikawa T., Niine T., Kaart T., Mõtus K., Niku M., Orro T. Associations of neonatal dairy calf faecal microbiota with inflammatory markers and future performance // *Animals*. — 2024. — Vol. 14 (17): 2533.

178. López-Novo C., Díaz P., Díaz-Cao J. M., Couso-Pérez S., García-Dios D., López-Lorenzo G., Remesar S., Ares-Mazás E., Morrondo P., Gómez-Couso H., Prieto A. Importance and characterisation of concurrent pathogens in diarrhoeic calves from North-Western Spain // *Animals*. — 2025. — Vol. 15 (18) :2735.

179. Lucey P. M., Lean I. J., Aly S. S., Golder H. M., Block E., Thompson J. S., Rossow H. A. Effects of mannan-oligosaccharide and *Bacillus subtilis* supplementation to preweaning Holstein dairy heifers on body weight gain, diarrhea, and shedding of fecal pathogens // *Journal of Dairy Science*. — 2021. — Vol. 104, No. 4. — P. 4290–4302.
180. Ma L., Wang L., Zhang Z., Xiao D. Research progress of biological feed in beef cattle // *Animals*. — 2023. — Vol. 13, No. 16. — P. 2662.
181. Maamouri O., Ben Salem M. The effect of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* as probiotic supply on growth performance, feed intake, ruminal pH and fermentation in fattening calves // *Veterinary Medicine and Science*. — 2022. — Vol. 8, No. 1. — P. 398–404.
182. Mackey S. J., Cooke R. F., Pickett A. T., Cappelozza B. I., Harvey K. M., Karisch B. B. Supplementing a *Bacillus*-based probiotic to high-risk stocker cattle // *Journal of Animal Science*. — 2024. — Vol. 102. — P. skae209.
183. Markowiak P., Śliżewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition // *Gut Pathogens*. — 2018. — Vol. 10, No. 1. — P. 1–20.
184. Merle R., Weise S., Gorisek L., Baer J., Robé C., Friese A., Jensen K. C. The therapy frequency of antibiotics and phenotypical resistance of *Escherichia coli* in calf rearing sites in Germany // *Frontiers in Veterinary Science*. — 2023. — Vol. 10: 1152246.
185. Mingmongkolchai S., Panbangred W. *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production // *Journal of Applied Microbiology*. — 2018. — Vol. 124, No. 6. — P. 1334–1346.
186. Nalla K., Manda N. K., Dhillon H. S., Kanade S. R., Rokana N., Hess M., Puniya A. K. Impact of probiotics on dairy production efficiency // *Frontiers in Microbiology*. — 2022. — Vol. 13. — DOI: 10.3389/fmicb.2022.805963
187. Nüesch-Inderbinen M., Biggel M., Haussmann A., Treier A., Heyvaert L., Cernela N., Stephan R. Oxazolidinone resistance genes in florfenicol-resistant

enterococci from beef cattle and veal calves at slaughter // *Frontiers in Microbiology*. — 2023. — Vol. 14: 1150070.

188. Pan Y., Sun G., Li G., Chen S., Liu H., Li H., Mei C., Yang W., Zan L. Sex-specific microbiota associations with backfat thickness, eye muscle area, and rumen fermentation in Qinchuan cattle // *BMC Microbiology*. — 2025. — Vol. 25, No. 1. — P. 277.

189. Plessas S., Stavropoulou E., Bezirtzoglou E. Probiotic yeasts: recent developments and applications in the food industry // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. — 2021. — Vol. 61, No. 10. — P. 1658–1674.

190. Ryan W. R., DeSocio E. S., Youngers M. E., Lockard C. G., Richards C. J., Trojan S. J., Hergenreder J. E., Wilson B. K. Effects of feeding CLOSTAT (*Bacillus subtilis* PB6) on the clinical health, performance, and carcass characteristics of feedlot steers // *Translational Animal Science*. — 2023. — Vol. 7 (1): txad047.

191. Scully S., Earley B., Smith P. E., McAloon C., Waters S. M. Health-associated changes of the fecal microbiota in dairy heifer calves during the pre-weaning period // *Frontiers in Microbiology*. — 2024. — Vol. 15: 1359611.

192. Springer H. R., Denagamage T. N., Fenton G. D., Haley B. J., Van Kessel J. A. S., Hovingh E. P. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from dairy calves: a systematic review // *Foodborne Pathogens and Disease*. — 2019. — Vol. 16, No. 1. — P. 23–34.

193. Terré M., Prat N., Sabrià D., Queiroz O., Joergensen J. N., Copani G., Cappelozza B. I. Supplementing a *Bacillus*-based direct-fed microbial improves feed efficiency in lactating dairy cows // *Translational Animal Science*. — 2024. — Vol. 8: txae110.

194. Terré M., Queiroz O. C., Joergensen J. N., Cappelozza B. I. *Bacillus* spp. supplementation promotes feed efficiency and alters metabolic responses of preweaning Angus × Holstein calves // *Journal of Dairy Science*. — 2025. — 108(10):10888-10899. — DOI: 10.3168/jds.2025-26866.

195. Urrutia-Angulo L., Ocejó M., Yergaliyev T., Oporto B., Aduriz G., Camarinha-Silva A., Hurtado A. Exploring colostrum microbiota and its influence on early calf gut microbiota development using full-length 16S rRNA gene metabarcoding // *Scientific Reports*. — 2025. — Vol. 15 (1): 36350.

196. Wang H., Yu Z., Gao Z., Li Q., Qiu X., Wu F., Su H. Effects of compound probiotics on growth performance, rumen fermentation, blood parameters, and health status of neonatal Holstein calves // *Journal of Dairy Science*. — 2022. — Vol. 105, No. 3. — P. 2190–2200.

197. Wang L., Sun H., Gao H., Xia Y., Zan L., Zhao C. A meta-analysis on the effects of probiotics on the performance of preweaning dairy calves // *Journal of Animal Science and Biotechnology*. — 2023. — Vol. 14, No. 1. — P. 3.

198. Woodruff K. L., Hummel G. L., Austin K. J., Lake S. L., Cunningham-Hollinger H. C. Calf rumen microbiome from birth to weaning and shared microbial properties to the maternal rumen microbiome // *Journal of Animal Science*. — 2022. — Vol. 100 (10): skac264.

199. Wu Y., Wang L., Luo R., Chen H., Nie C., Niu J., Chen C., Xu Y., Li X., Zhang W. Effect of a multispecies probiotic mixture on the growth and incidence of diarrhea, immune function, and fecal microbiota of preweaning dairy calves // *Frontiers in Microbiology*. — 2021. — Vol. 12: 681014.

200. Yao D., Su L., Li N., Wu J. Enhanced extracellular expression of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase in *Bacillus subtilis* through signal peptide optimization, chaperone overexpression and α -amylase mutant selection // *Microbial Cell Factories*. — 2019. — Vol. 18, No. 1. — P. 69. — DOI: 10.1186/s12934-019-1119-8.

201. Zhang X., Yi X., Zhuang H., Deng Z., Ma C. Invited review: Antimicrobial use and antimicrobial resistance in pathogens associated with diarrhea and pneumonia in dairy calves // *Animals*. — 2022. — Vol. 12, No. 6. — P. 771.

202. Zhang Y., Li C., Tang L., Li F., Fu X., Hao Y., Li J., Feng X., Hu W. Age-stratified gut microbial changes in diarrheal calves: insights // *Frontiers in Microbiology*. — 2025. — Vol. 16: 1633162.

203. Zhang Y., Nie Y., Zhou X., Bi J., Xu Y. Enhancement of pullulanase production from recombinant *Bacillus subtilis* by optimization of feeding strategy and fermentation conditions // *AMB Express*. — 2020. — Vol. 10, No. 1. — P. 11. — DOI: 10.1186/s13568-020-0948-5.

204. Zhuang Y., Liu S., Gao D., Xu Y., Jiang W., Hou G., Li S., Zhao X., Chen T., Li S., Zhang S., Huang Y., Wang J., Xiao J., Li M., Wang W., Li S., Cao Z. Maternal gastrointestinal microbiome shapes gut microbial function and resistome of newborns in a cow-to-calf model // *Microbiome*. — 2024. — Vol. 12, No. 1. — P. 216.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Идентификация штамма *Bacillus subtilis* 11К



Биоресурсный центр Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



1117545, 1-й Дорожный проезд д.1,г. Москва mail:vkpm@genetika.ru тел. (495) 315 12 10

Идентификация штамма 11К до вида с помощью анализа 16S РНК

Заказчик: ЯНЦ СО РАН

Вид: *Bacillus subtilis*

Дата: 11.06.2024

Этапы работ

I. Рассев культуры заказчика до отдельной колонии и получение биомассы для анализа 16S РНК

I. Выделение ДНК.

II. Выбор праймеров и режимы ПЦР.

Консервативные праймеры для наработки 16S rDNA –

8f – aga gtt tga tcc tgg ctc ag

926r - ccg tca att cct ttr agt tt

с режимами реакции:

1. 95°C -3мин.

2. 35 циклов

95°C -30 сек.

57°C -30 сек.

72°C- 1 мин. 30 сек.

3. 72°C - 5мин

III. Секвенирование 16S rDNA, сравнение секвенсов

Секвенирование проводится на автоматическом секвенаторе AE3000.

Для анализа секвенсов используются специализированные филогенетические компьютерные программы.

Стабильность воспроизведения результатов. Проводится не менее трех повторов ПЦР-реакций.

Условия электрофореза ПЦР исследуемых образцов.

1,0% агарозный гель, электрофорез при напряженности электрического поля 5 В/см

а) Секвенирование переменных участков 16S rDNA.

При секвенировании переменных участков 16S rDNA получена следующая собранная нуклеотидная последовательность для исследуемого штамма:

TCTCATCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCTCCCCGGTTGAGC
CGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCAA
TAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG
TTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGG
TACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTC
ACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCT
GCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCT
CTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCRTTACCTCACCAACTAGC
TAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTT
GAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTA
TCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAAC
ATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCC
GCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGG

б) Анализ результатов секвенирования

Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемый штамм принадлежит к следующим систематическим группам: Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; *Bacillus*. Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий, доступными из базы данных GenBank.

Результаты обработки секвенсов при помощи специализированной компьютерной программы, BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), предназначенной для определения родства микроорганизмов и построения филогенетических деревьев, представляются ниже:

Description	Per. Ident	Accession
Bacillus subtilis strain IAM 12118 16S ribosomal RNA, complete sequence	99.70%	NR_112116.2
Bacillus subtilis strain DSM 10 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.70%	NR_027552.1
Bacillus subtilis strain JCM 1465 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.69%	NR_113265.1
Bacillus subtilis strain NBRC 13719 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.69%	NR_112629.1
Bacillus subtilis strain BCRC 10255 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.69%	NR_116017.1
Bacillus subtilis strain NRRL NRS-744 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.63%	NR_116192.1
Bacillus subtilis strain NRRL B-4219 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.63%	NR_116183.1
Bacillus subtilis strain NCDO 1769 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.55%	NR_118972.1
Bacillus rugosus strain SPB7 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.55%	NR_181236.1
Bacillus cabrialesii strain TE3 16S ribosomal RNA, complete sequence	99.55%	NR_180419.1
Bacillus inaquosorum strain BGSC 3A28 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.55%	NR_104873.1
Bacillus tequilensis strain 10b 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.54%	NR_104919.1
Bacillus spizizenii strain NBRC 101239 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.54%	NR_112686.1
Bacillus spizizenii strain NRRL B-23049 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.54%	NR_024931.1
Bacillus stercoris strain D7XPN1 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.53%	NR_181952.1
Bacillus rugosus strain SPB7 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.51%	NR_180415.1
Bacillus inaquosorum strain NRRL B-23052 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.44%	NR_116188.1
Bacillus spizizenii strain NRRL B-23049 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.44%	NR_116187.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 168 16S ribosomal RNA, complete sequence	99.39%	NR_102783.2
Bacillus stercoris strain JCM 30051 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.39%	NR_180796.1
Bacillus mojavenensis strain IFO 15718 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.39%	NR_024693.1
Bacillus halotolerans strain DSM 8802 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.39%	NR_115063.1

В таблице приведены типовые штаммы бактерий, принимающие участие в анализе и имеющие максимальную степень гомологии с изучаемым штаммом.

Критерием отнесения микроорганизма к тому или иному виду считается гомология не менее 97%.

Для уточняющей идентификации исследуемых штаммов был использован метод идентификации с помощью видоспецифических праймеров.

Идентификация с помощью видоспецифических праймеров

При проведении реакции ПЦР были использованы следующие праймеры.

Таблица 1

Название микроорганизма	Праймер для идентификации	Т отжига прайме ров	Размер амплифи ката, н.п.
<i>Bacillus subtilis</i>	secYsubF TTATATCACGGCTTCGAT secYsubR CGGTAGTTTCGTTTCACCA	57 C	1050
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bamy-f AAATCTGCCCCGTATCGTCGGT Bamy-r GTGAGCATTGGCGTCACGGCG	60 C	747
<i>Bacillus licheniformis</i>	secYlichF TTACATCACAGCTTCTAT secYlichR CGATAGTTTCGTTTACCA	57 C	1050
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Batr-f CACCCTCACGGAGATTCCGCA Batr-r AATTCTTTCTTTCCCTGATGG	54 C	541
<i>Bacillus mojavensis</i>	Bmoj-f CGTTATCGTATCCCGGGCA Bmoj-r AAAATTCTTTCTTTCCCTGAC	60 C	685
<i>Bacillus vallismortis</i>	Bval-f CGGATGTTCGTGACGGTTTAC Bval-r CCGCAGTCGGGAAGTCAGGA	60 C	538
<i>Bacillus sonorensis</i>	Bson-f CTTGTTCAAGGCCATGGG Bson-r CCAAATGATGTTTGAAGT	57 C	684

Режим амплификации:

- 1) Денатурация: $t=94^{\circ}\text{C}$, $\tau=5$ минут
- 2) а) Денатурация: $t=94^{\circ}\text{C}$, $\tau=40$ секунд
б) Отжиг:
Условия отжига:
Температура отжига для пары праймеров см. таблицу 1
Время отжига 30 секунд
в) Достаивание цепи: $t=72^{\circ}\text{C}$, $\tau=20$ секунд
- 3) Достаивание цепи: $t=72^{\circ}\text{C}$, $\tau=5$ минут

30 циклов

Электрофоретическое разделение фрагментов.

Чтобы увидеть амплификат провели электрофорез при напряжении 5V/см

3 в течение 30 минут. Для этого готовят 1% агарозу. В качестве электрофоретического

буфера использовали 1 кратный раствор ТАЕ (на 1 л 50x ТАЕ : трис основной 242г, ледяная уксусная кислота 57мл, ЭДТА 14, 6г рН-8.0). 1 г агарозы на 100 мл ТАЕ буфера нагревали

до полного растворения. Затем немного остывшую агарозу разливали в планшеты с гребенкой до

застывания. Сверху застывшего геля заливали 1x разбавленный раствор ТАЕ. В

лунки агарозы вносили 5 мкл исследуемого образца, который окрашивали

загрузочным буфером «loading buffer».

Результаты работы представлены на рисунке 1

Рисунок 1 ПЦР-анализ исследуемого штамма с использованием видоспецифических праймеров



1 2

1. Маркер O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (250, 500, 750, 100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 п.н, сверху вниз)
2. ПЦР-анализ с использованием праймеров secYsubF и secYsubR

Наработка фрагмента размером 1050 п.н. при использовании праймеров secYsubF и secYsubR, специфических для *Bacillus subtilis*, позволяет утверждать, что исследуемый штамм можно отнести к виду *Bacillus subtilis*.

Таким образом, результаты проведенного анализа секвенсов переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК, а также ПЦР анализа с использованием видоспецифических праймеров с учетом физиологических свойств позволяют отнести тестируемый штамм к виду *Bacillus subtilis* (99%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного анализа тестируемый штамм наиболее близок к виду *Bacillus subtilis* (99%).

Литература

Для исследования использовалась следующая литература:

1. Выделение ДНК для ПЦР

PCR Protocols. A Guide to methods and applications .

Innis M, Gelfand D., Sninsky J.p.14-15.

2. Условия ПЦР

Каталог MBI Fermentas 1998\1999, 146-157.

Pavlicek A et al "Fre-Tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap\jackknife analysis of tree robustness. " Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia* Folia Biol (Praha) 1999 45(3) 97-9.

3. BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)

4. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2001 51:1671-1679

5. Борщевская, Л.Н. Разработка ПЦР - теста для идентификации близкородственных видов группы *Bacillus subtilis* на основании последовательности гена *GYRA* / Л.Н. Борщевская, А.Н. Калинина, С.П. Синекоий // Биотехнология. – 2012. - №3. – С. 32-43.

Руководитель БРЦ ВКПМ
д.б.н., проф.



С.П. Синекоий

Приложение Б

Идентификация штамма *Bacillus subtilis* 27L

Биоресурсный центр Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



1117545, 1-й Дорожный проезд д.1,г. Москва mail:vkpm@genetika.ru тел. (495) 315 12 10

Идентификация штамма 27L до вида с помощью анализа 16S РНК

Заказчик: ЯНЦ СО РАН

Вид: *Bacillus subtilis*

Дата: 04.06.2024

Этапы работ

I. Рассев культуры заказчика до отдельной колонии и получение биомассы для анализа 16S РНК

I. Выделение ДНК.

II. Выбор праймеров и режимы ПЦР.

Консервативные праймеры для наработки 16S rDNA –

8f – aga gtt tga tcc tgg ctc ag

926r - ccg tca att cct ttr agt tt

с режимами реакции:

1. 95°C -3мин.

2. 35 циклов

95°C -30 сек.

57°C -30 сек.

72°C- 1 мин. 30 сек.

3. 72°C - 5мин

III. Секвенирование 16S rDNA, сравнение секвентов

Секвенирование проводится на автоматическом секвенаторе AE3000.

Для анализа секвентов используются специализированные филогенетические компьютерные программы.

Стабильность воспроизведения результатов. Проводится не менее трех повторов ПЦР-реакций.

Условия электрофореза ПЦР исследуемых образцов.

1,0% агарозный гель, электрофорез при напряженности электрического поля 5 В/см

а) Секвенирование переменных участков 16S rDNA.

При секвенировании переменных участков 16S rDNA получена следующая собранная нуклеотидная последовательность для исследуемого штамма:

```
CCAATGACCMWCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAAC
CGCCTGCGAGCCCTTTACGCCAATAATTCGGACAACGCTTGCCACCTACGT
ATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGT
CAAGGTACCGCCCTATTTCGAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGCTTT
ACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTC
CATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTC
AGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGG
TGAGCCTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGG
TAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGT
ATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGT
GTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCT
CGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGG
```

б) Анализ результатов секвенирования

Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемый штамм принадлежит к следующим систематическим группам: Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; *Bacillus*.

Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий, доступными из базы данных GenBank.

Результаты обработки секвенсов при помощи специализированной компьютерной программы, BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), предназначенной для определения родства микроорганизмов и построения филогенетических деревьев, представляются ниже:

Description	Per. Ident	Accession
Bacillus subtilis strain IAM 12118 16S ribosomal RNA, complete sequence	99.52%	NR_112116.2
Bacillus subtilis strain DSM 10 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.52%	NR_027552.1
Bacillus subtilis strain JCM 1465 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.52%	NR_113265.1
Bacillus subtilis strain NBRC 13719 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.52%	NR_112629.1
Bacillus subtilis strain BCRC 10255 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.51%	NR_116017.1
Bacillus subtilis strain NRRL NRS-744 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.40%	NR_116192.1
Bacillus subtilis strain NRRL B-4219 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.40%	NR_116183.1
Bacillus subtilis strain NCDO 1769 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.36%	NR_118972.1
Bacillus rugosus strain SPB7 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.36%	NR_181236.1
Bacillus cabrialesii strain TE3 16S ribosomal RNA, complete sequence	99.36%	NR_180419.1
Bacillus inaquosorum strain BGSC 3A28 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.36%	NR_104873.1
Bacillus tequilensis strain 10b 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.36%	NR_104919.1
Bacillus spizizenii strain NBRC 101239 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.35%	NR_112686.1
Bacillus spizizenii strain NRRL B-23049 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.35%	NR_024931.1
Bacillus stercoris strain D7XPN1 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.34%	NR_181952.1
Bacillus rugosus strain SPB7 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.31%	NR_180415.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 168 16S ribosomal RNA, complete sequence	99.21%	NR_102783.2
Bacillus stercoris strain JCM 30051 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.21%	NR_180796.1
Bacillus halotolerans strain DSM 8802 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.21%	NR_115063.1
Bacillus mojavensis strain IFO 15718 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.21%	NR_024693.1
Bacillus mojavensis strain NBRC 15718 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.19%	NR_112725.1
Calidifontibacillus erzurumensis strain P2 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.16%	NR_178988.1
Bacillus mojavensis strain IFO 15718 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.15%	NR_118290.1

В таблице приведены типовые штаммы бактерий, принимающие участие в анализе и имеющие максимальную степень гомологии с изучаемым штаммом.

Критерием отнесения микроорганизма к тому или иному виду считается гомология не менее 97%.

Для уточняющей идентификации исследуемых штаммов был использован метод идентификации с помощью видоспецифических праймеров.

Идентификация с помощью видоспецифических праймеров

При проведении реакции ПЦР были использованы следующие праймеры.

Таблица 1

Название микроорганизма	Праймер для идентификации	Т отжига прайме ров	Размер амплифи ката, н.п.
<i>Bacillus subtilis</i>	secYsubF TTATATCACGGCTTCGAT secYsubR CGGTAGTTTCGTTTCACCA	57 C	1050
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bamy-f AAATCTGCCCCGTATCGTCGGT Bamy-r GTGAGCATTGGCGTCACGGCG	60 C	747
<i>Bacillus licheniformis</i>	secYlichF TTACATCACAGCTTCTAT secYlichR CGATAGTTTCGTTTACCA	57 C	1050
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Batr-f CACCCTCACGGAGATTCCGCA Batr-r AATTCTTTCTTTCCCTGATGG	54 C	541
<i>Bacillus mojavensis</i>	Bmoj-f CGTTATCGTATCCCGGGCA Bmoj-r AAAATTCTTTCTTTCCCTGAC	60 C	685
<i>Bacillus vallismortis</i>	Bval-f CGGATGTTTCGTGACGGTTTAC Bval-r CCGCAGTCGGGAAGTCAGGA	60 C	538
<i>Bacillus sonorensis</i>	Bson-f CTTGTTCAAGGCCATGGG Bson-r CCAAATGATGTTTGAAGT	57 C	684

Режим амплификации:

- 1) Денатурация: $t=94^{\circ}\text{C}$, $\tau=5$ минут
- 2) а) Денатурация: $t=94^{\circ}\text{C}$, $\tau=40$ секунд
- б) Отжиг:

Условия отжига:

Температура отжига для пары праймеров см. таблицу 1

Время отжига 30 секунд

- в) Достаивание цепи: $t=72^{\circ}\text{C}$, $\tau=20$ секунд

- 3) Достаивание цепи: $t=72^{\circ}\text{C}$, $\tau=5$ минут

Электрофоретическое разделение фрагментов.

Чтобы увидеть амплификат провели электрофорез при напряжении 5V/см

3 в течение 30 минут. Для этого готовят 1% агарозу. В качестве электрофоретического

буфера использовали 1 кратный раствор TAE (на 1 л 50x TAE : трис основной 242г, ледяная уксусная кислота 57мл, ЭДТА 14, 6г pH-8.0). 1 г агарозы на 100 мл TAE буфера нагревали

до полного растворения. Затем немного остывшую агарозу разливали в планшеты с гребенкой до застывания. Сверху застывшего геля заливали 1x разбавленный раствор TAE. В

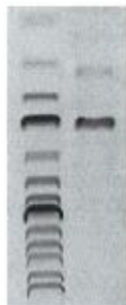
лунки агарозы вносили 5 мкл исследуемого образца, который окрашивали

загрузочным буфером «loading buffer».

30 циклов

Результаты работы представлены на рисунке 1

Рисунок 1 ПЦР-анализ исследуемого штамма с использованием видоспецифических праймеров



1 2

1. Маркер O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (250, 500, 750, 100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 п.н, сверху вниз)
2. ПЦР-анализ с использованием праймеров secYsubF и secYsubR

Наработка фрагмента размером 1050 п.н. при использовании праймеров secYsubF и secYsubR, специфических для *Bacillus subtilis*, позволяет утверждать, что исследуемый штамм можно отнести к виду *Bacillus subtilis*.

Таким образом, результаты проведенного анализа секвенсов переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК, а также ПЦР анализа с использованием видоспецифических праймеров с учетом физиологических свойств позволяют отнести тестируемый штамм к виду *Bacillus subtilis* (99%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного анализа тестируемый штамм наиболее близок к виду *Bacillus subtilis* (99%).

Литература

Для исследования использовалась следующая литература:

1. Выделение ДНК для ПЦР

PCR Protocols. A Guide to methods and applications .

Innis M, Gelfand D., Sninsky J.p.14-15.

2. Условия ПЦР

Каталог MBI Fermentas 1998\1999, 146-157.

Pavlicek A et al "Fre-Tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap\jackknife analysis of tree robustness. " Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia* Folia Biol (Praha) 1999 45(3) 97-9.

3. BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)

4.International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2001 51:1671-1679

5. Борщевская, Л.Н. Разработка ПЦР - теста для идентификации близкородственных видов группы *Bacillus subtilis* на основании последовательности гена *GYRA* / Л.Н. Борщевская, А.Н. Калинина, С.П. Синекоий // Биотехнология. – 2012. - №3. – С. 32-43.

Руководитель БРЦ ВКПМ
д.б.н., проф.



С.П. Синекоий

Приложение В

Справка о депонировании *B. subtilis* 11К в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры

Budapest treaty on the international
recognition of the deposit of microorganisms
for the purposes of patent procedure

INTERNATIONAL FORM

To
Federal State Budgetary Institution of Science
Federal Research Center "Yakut Scientific Center
of the Siberian Branch of the Russian Academy of
Sciences"
677008, RS(I), Yakutsk, Petrovsky str., 2
name and address of depositor

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the
DEPOSITOR

Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY
AUTHORITY:

Bacillus subtilis 11 K

VKPM B-14816

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description

☐ a proposed taxonomic designation

feed additive and probiotic

(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, I
which was received by it on 06.09.2024 (date of original deposit dd.mm.yyyy)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority (date of
original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was
received by it on (date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: All-Russian National Collection of Industrial
Microorganisms (VKPM)
NRC «Kurchatov Institute»
Address: Russia 117545 Moscow 1st Dorozhny
proezd 1

Signature (s) of person(s) having the power
to represent the International Depositary
Authority or authorized official(s):
Date: September 2024
Sinevsky S.P.
Director VKPM



Budapest treaty on the international
recognition of the deposit of microorganisms
for the purposes of patent procedure

INTERNATIONAL FORM

To
Federal State Budgetary Institution of
Science Federal Research Center "Yakut
Scientific Center of the Siberian Branch of
the Russian Academy of Sciences"
677008, RS(I), Yakutsk, Petrovsky str., 2
name and address of the party
to whom the viability statement
is issued

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY
AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR
Name: Federal State Budgetary Institution
of Science Federal Research Center
"Yakut Scientific Center of the Siberian
Branch of the Russian Academy of
Sciences"

II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
VKPM B-14816
Date of deposit 06.09.2024

Address: 677008, RS(I), Yakutsk,
Petrovsky str., 2

III. VIABILITY STATEMENT

The viability of the microorganism identified under above was tested
On September 2024 On that date the said microorganism was viable

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: All-Russian National Collection
of Industrial Microorganisms (VKPM)
NRC «Kurchatov Institute»
Address: Russia 117545 Moscow
1st Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the
power to represent the International Depositary
Authority or authorized official(s):
Date: September 2024
Sinevsky S.P.
Director VKPM



Приложение Г

Справка о депонировании *B. subtilis* 27L в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры

Budapest treaty on the international
recognition of the deposit of microorganisms
for the purposes of patent procedure

INTERNATIONAL FORM

To
Federal State Budgetary Institution of Science
Federal Research Center "Yakut Scientific Center
of the Siberian Branch of the Russian Academy of
Sciences"
677008, RS(I), Yakutsk, Petrovsky str., 2
name and address of depositor

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:
<i>Bacillus subtilis</i> 27 L	VKPM B-14800

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description	☐ a feed additive and probiotic
☐ a proposed taxonomic designation	(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, 1
which was received by it on 06.09.2024 (date of original deposit dd.mm.yyyy)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority (date of
original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was
received by it on (date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: All-Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) NRC «Kurchatov Institutes» Address: Russia 117545 Moscow 1 st Dorozhny proezd 1	Signature (s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or authorized official(s): Date: September 2024 Sinecky S.P. Director VKPM
--	--



Budapest treaty on the international
recognition of the deposit of microorganisms
for the purposes of patent procedure

INTERNATIONAL FORM

To
Federal State Budgetary Institution of
Science Federal Research Center "Yakut
Scientific Center of the Siberian Branch of
the Russian Academy of Sciences"
677008, RS(I), Yakutsk, Petrovsky str., 2
name and address of the party
to whom the viability statement
is issued

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY
AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR

Name: Federal State Budgetary Institution
of Science Federal Research Center
"Yakut Scientific Center of the Siberian
Branch of the Russian Academy of
Sciences"

Address: 677008, RS(I), Yakutsk,
Petrovsky str., 2

II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
VKPM B-14800
Date of deposit 06.09.2024

III. VIABILITY STATEMENT

The viability of the microorganism identified under above was tested
On September 2024 On that date the said microorganism was viable

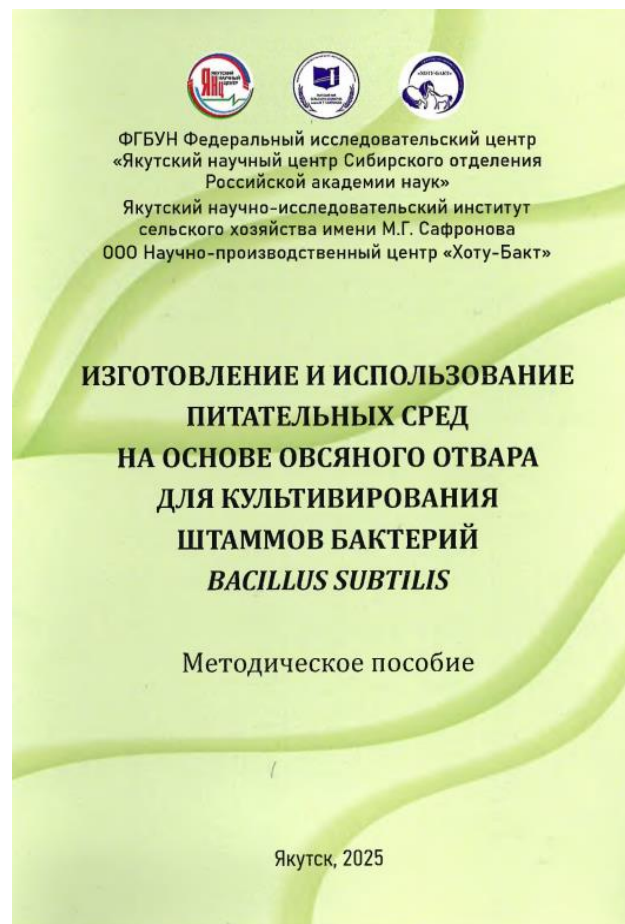
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: All-Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) NRC «Kurchatov Institutes» Address: Russia 117545 Moscow 1st Dorozhny proezd 1	Signature (s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or authorized official(s): Date: September 2024 Sinecky S.P. Director VKPM
--	--



Приложение Д

Методическое пособие



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ЯКУТСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»
ЯКУТСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОГО
ХОЗЯЙСТВА ИМЕНИ М.Г. САФРОНОВА
ООО НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР «ХОТУ-БАКТ»

ИЗГОТОВЛЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА
ОСНОВЕ ОВСЯНОГО ОТВАРА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ШТАММОВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

ЯКУТСК
2025

УДК 579.62:64
ББК 48.4

Утверждено Ученым советом ЯНИИСХ им. М.Г. Сафронова
(протокол № 5 от 18.09.2025 г.)

Рецензенты:

Петрова С.Г., к.в.м., Максимов А.Н., к.в.н.

Составители:

Решетникова А.И., Тарабукина Н.П., Неустров М.П., Маркова А.М., Павлов А.Г.

Ответственный редактор:

Неустров М.П., д-р вет. наук, профессор

Изготовление и использование питательных сред на основе овсяного отвара для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis*: методическое пособие / Решетникова А.И., Тарабукина Н.П., Неустров М.П., Маркова А.М., Павлов А.Г.; Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Якутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. М.Г. Сафронова. – Якутск, 2025. – 18 с.

Представлены новые питательные среды на основе овсяных отваров для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis*.

Методическое пособие предназначено для научных сотрудников, специалистов научно-производственных подразделений, микробиологов, студентов и аспирантов.

УДК 579.62:64
ББК 48.4

Приложение Е
Патент на изобретение № 2849485

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) **RU** (11) **2 849 485**⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК
A61K 35/742 (2015.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 35/742 (2025.08)

(21)(22) Заявка: 2025101028, 21.01.2025

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.01.2025

Дата регистрации:
27.10.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.01.2025

(45) Опубликовано: 27.10.2025 Бюл. № 30

Адрес для переписки:
677980, г. Якутск, ул. Петровского, 2, ФГБОУ
ВО "Якутский научный центр Сибирского
отделения Российской академии наук", Лебедев
Михаил Петрович

(72) Автор(ы):

Неустров Михаил Петрович (RU),
Тарабукина Надежда Петровна (RU),
Скрябина Марфа Павловна (RU),
Решетникова Альбина Ивановна (RU),
Маркова Анна Михайловна (RU),
Парникова Светлана Ивановна (RU),
Чжан Вэньцзюань (CN),
Ху Чжуран (CN)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Федеральный
исследовательский центр "Якутский научный
центр Сибирского отделения Российской
академии наук" (RU),
Общество с ограниченной ответственностью
научно-производственный центр Хоту Бакт
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2398872 C1, 10.09.2010.
САВУСТЬЯНЕНКО А.В., МЕХАНИЗМЫ
ДЕЙСТВИЯ ПРОБИОТИКОВ НА
ОСНОВЕ *BACILLUS SUBTILIS*, Актуальна
инфектология, 2(11), 2016, с. 35-44. JADAMUS
A., VANJEN W., et al., Growth behaviour of a
spore forming probiotic strain in the
gastrointestinal tract of broiler chicken and
piglets, Arch. Tierernahr., 2001, v. 54, N 1, p. 1-17.

(54) Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 11К, используемый для изготовления пробиотической кормовой добавки

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии. Предложен штамм бактерий
Bacillus subtilis 11К VKPM В-14816 для
изготовления пробиотической кормовой добавки.
Штамм обладает антагонистической активностью
по отношению к *Staphylococcus aureus* spp. и
Escherichia coli spp., антифунгальной активностью

в отношении *Aspergillus* spp., чувствителен к
широкому спектру антибиотиков и является
продуцентом протеазы. Штамм депонирован в
Биоресурсном центре - Всероссийской коллекции
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НИИЦ «Курчатовский институт» под
регистрационным номером VKPM В-14816. 5 табл.

Приложение Ж

Патент на изобретение № 2857879

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11)

2 857 879⁽¹³⁾ C1

(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/742 (2015.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/20 (2026.01); A61K 35/742 (2026.01)

(21)(22) Заявка: 2025101029, 21.01.2025
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.01.2025
Дата регистрации:
11.03.2026

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 21.01.2025

(45) Опубликовано: 11.03.2026 Бюл. № 8

Адрес для переписки:
677980, г. Якутск, ул. Петровского, 2, ФГБУ
Федеральный исследовательский центр
"Якутский научный центр Сибирского
отделения Российской академии наук",
Лебедев Михаил Петрович

(72) Автор(ы):
Неустров Михаил Петрович (RU),
Тарабукина Надежда Петровна (RU),
Скрябина Марфа Павловна (RU),
Решетникова Альбина Ивановна (RU),
Маркова Анна Михайловна (RU),
Парникова Светлана Ивановна (RU),
Чжан Вэньцзюань (CN),
Ху Чжуран (CN)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Федеральный
исследовательский центр "Якутский научный
центр Сибирского отделения Российской
академии наук" (RU),
Общество с ограниченной ответственностью
"Научно-производственный центр "Хоту
Бакт" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: СВЕРЧКОВА Н.В., и др., Критерии
отбора и характеристика штаммов
спорообразующих бактерий рода bacillus -
основы пробиотических препаратов и
кормовых добавок для животноводства, Вест
Нацыянальная акадэм навук Беларус .Серыя
б ялаг чных навук. 2022, т. 67, N1, с. 105-113.
АЧМИЗ А.Д. и др., ПРОБИОТИЧЕСКИЕ
КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ
ПРИМЕНЯЕМЫЕ В (см. прод.)

(54) Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM В-14800, используемый для изготовления пробиотической кормовой добавки

(57) Реферат:
Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой штамм бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM В-14800 для изготовления пробиотической кормовой добавки. Штамм обладает антагонистической активностью по отношению к *Staphylococcus aureus* spp. и *Escherichia coli* spp.,

антифунгальной активностью в отношении *Aspergillus* spp., чувствителен к широкому спектру антибиотиков и является продуцентом фруктозилтрансферазы. Штамм депонирован в Биоресурсном центре – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» под

Приложение И
Патент на изобретение № 2858896

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) **RU** (11)
(51) МПК
C12N 1/10 (2006.01)

2 858 896 ⁽¹³⁾ **C1**

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/10 (2026.01)

(21)(22) Заявка: 2025117948, 30.06.2025
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.06.2025
Дата регистрации:
24.03.2026
Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 30.06.2025
(45) Опубликовано: 24.03.2026 Бюл. № 9
Адрес для переписки:
677980, г.Якутск, ул.Петровского, 2, ФГБУН
ФИЦ "ЯНЦ СО РАН", Лебедев Михаил
Петрович

(72) Автор(ы):
Неустров Михаил Петрович (RU),
Тарабукина Надежда Петровна (RU),
Решетникова Альбина Ивановна (RU),
Маркова Анна Михайловна (RU),
Скрябина Марфа Павловна (RU),
Парникова Светлана Ивановна (RU)
(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Федеральный
исследовательский центр "Якутский научный
центр Сибирского отделения Российской
академии наук" (RU)
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2822434 C1, 05.07.2024. RU
2722071 C1, 26.05.2020. ARTI
SINGH,VISHAKHA VISHWAKARMA, et al.,
Metabiotics: The Functional Metabolic Signatures
of Probiotics: Current State-of-Art and Future
Research Priorities - Metabiotics: Probiotics
Effector Molecules. Advances in Bioscience and
Biotechnology, 2018, 9:147-189.

(54) Твердая питательная среда для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM B-14800 и *Bacillus subtilis* 11K VKPM B-14816
(57) Реферат:
Изобретение относится к области биотехнологии и представляет собой твердую питательную среду для культивирования штаммов бактерий *Bacillus subtilis* 27L VKPM B-14800 и *Bacillus subtilis* 11K VKPM B-14816.
Данная среда содержит 3%-ный отвар семян овса с добавлением 1% NaCl, 0,5% дрожжевого автолизата и 1,1% пищевого агар-агара. Изобретение способствует улучшению ростовых свойств питательной среды. 4 табл., 4 пр.

RU 2 858 896 C 1

RU 2 858 896 C 1

Приложение К

Протокол испытаний №28/25 от 13.02.2025

ПН № 28/25 от 13.02.2025.

Ф-07/СМК-II-ДП-10/04

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

Юридический (фактический) адрес: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1
Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии - филиал
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр -
Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина
и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ВНИИВСТЭ – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

Испытательный лабораторный центр «ВетФармТест»

Уникальный номер записи в реестре аккредитованных лиц RA.RU.21OE66

Адреса мест осуществления деятельности:

Москва, 123022, Звенигородское ш., д.5, стр. 1 (ком. 101, 111, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 408, 410, 411,
412-а, 412-б, 414, 415)

143985, Московская область, г. Балашиха, Полтевское шоссе, владение 4 (ком. 223, 224, 225, 226, 227, 229,
307, 309, 311, 312, 313, 314, 315, 318, 319)

тел.: (499) 256-04-88; e-mail:il-vniivshe@mail.ru



«УТВЕРЖДАЮ»
Руководитель
ИЛЦ «ВетФармТест»

П.А. Попов

13.02.2025

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 28/25 от 13.02.2025.

Информация, полученная от Заказчика	
Наименование продукции	Опытный образец пробиотической кормовой добавки «Пробисубтил»
Кол-во (масса, вес) образцов	3 упаковки по 100 мл
Заказчик	ФГБУН ФИЦ «Якутский научный центр Сибирского отделения РАН» (ИНН 1435035057), Юридический и фактический адрес: 677001, Республика Саха (Якутия) г. Якутск, ул. Петровского д.2.
Производитель	ФГБУН ФИЦ «Якутский научный центр Сибирского отделения РАН» (ИНН 1435035057), Юридический и фактический адрес: 677001, Республика Саха (Якутия) г. Якутск, ул. Петровского д.2.
Сопроводительная документация	Заявка № 28/25 от 10.02.2025.
На соответствие требованиям	токсичность
Сведения об отборе образца	Образцы отобраны по ГОСТ 34668-2020 старшим научным сотрудником Парниковой С.И, в присутствии Зав. лаб. по разработке микробных препаратов Скрябиной М.П., г.н.с. Тарабукиной Н.П. и аспиранта Решетниковой А.И. Место отбора проб: Республика Саха (Якутия) г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского, дом 23, корпус 1.
Информация ИЛЦ	
Дата получения образца	10.02.2025.
Состояние образца	Удовлетворительное. Упаковки не нарушены. Маркировка имеется.
Дата начала испытаний	10.02.2025.
Дата окончания испытаний	12.02.2025.

ПН № 28/25 от 13.02.2025.

Ф-07/СМК-П-ДП-10/04

Результаты испытаний			
Определяемые показатели, ед. измерений	Фактический результат	Нормы по НД	НД на метод испытаний
1. Токсичность	не токсично	не допускается	ГОСТ 31674-2012, п.4.3

Результаты касаются образцов, подвергнутых испытаниям.

Переписка и ксерокопирование протокола испытаний без разрешения ИЛЦ запрещены.

Примечания:

Заявления о соответствии спецификации или стандарту на испытания в настоящем Протоколе испытаний не устанавливается и не предполагается.

Испытания проведены на местах осуществления деятельности: Москва, 123022, Звенигородское ш., д.5, стр. 1 (ком. 101, 111, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 408, 410, 411, 412-а, 412-б, 414, 415).

Протокол оформлен в 2-х экземплярах.

Ответственный за оформление протокола:  /Д.А. Банникова/

конец протокола

Приложение Л

Протокол испытаний №4072-4074/В от 19.12.2024

Государственное бюджетное учреждение Республики Саха (Якутия)
"Якутская республиканская ветеринарно-испытательная лаборатория"
(ГБУ РС (Я) "ЯРВИЛ")

677027, Республика Саха (Якутия), г. Якутск, ул. Каландаришвили, д.3
Тел/факс: 8(4112)36-16-70, e-mail: priemnaya-yarvil2017@rambler.ru

Протокол испытаний № 4072-4074/В от 19.12.2024

Наименование образца испытаний: Патологический материал \ Трупы, трупы мышей - 3 пробы
принадлежащего: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР "ЯКУТСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК", ИНН: 1435035057, Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, Петровского ул., д. 2
заказчик: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР "ЯКУТСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК", ИНН: 1435035057, Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, Петровского ул., д. 2
основание для проведения лабораторных исследований: государственное задание
дата документа основания: 12.12.2024
место отбора проб: Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского, д. 23/1
дата отбора проб: 21.11.2024
отбор проб произвел: ЯНИИСХ
сопроводительный документ: Заявка на исследование б/н от 12.12.2024 г. (вх. № б/н от 12.12.2024 г.)
вид упаковки доставленного образца: полиэтиленовые пакеты
состояние образца: замороженные
количество проб: 3 пробы
дата поступления: 12.12.2024 11:20
даты проведения испытаний: 12.12.2024 - 19.12.2024
фактический адрес места осуществления деятельности: ГБУ РС(Я) "Якутская республиканская ветеринарно-испытательная лаборатория", г. Якутск, Покровский тракт 5 км., 10/4а
на соответствие требованиям: Методическое руководство. Морфологические исследования в ветеринарных лабораториях МСХ РФ ДВ г. Москва, 2002г.; ГОСТ 25386 - 91 Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза.
примечание: Исследования проводятся первично. Не вакцинированы. Клиническая картина: клинически здоровы.
Результаты испытаний:

Образец: 1 - 4072/В - труп мыши - контроль (без применения кормовой добавки)

№ п/п	Наименование показателя	Ед. изм.	Результат испытаний	Полнота/неопределенность	Норматив	ИД на метод испытаний
Патоморфология						
1	Гистология		При микроскопическом исследовании гистологических срезов внутренних органов (при окраске Левадит) изменения, характерные при лептоспирозе, не выявлены.			Методическое руководство. Морфологические исследования в ветеринарных лабораториях МСХ РФ ДВ г. Москва, 2002г.; ГОСТ 25386 - 91 Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза.

Образец: 2 - 4073/В - труп мыши - опыт 1 (с применением кормовой добавки)

№ п/п	Наименование показателя	Ед. изм.	Результат испытаний	Полнота/неопределенность	Норматив	ИД на метод испытаний
Патоморфология						

1	Гистология		При микроскопическом исследовании гистологических срезов внутренних органов (при окраске Левадити) изменения, характерные при лептоспирозе, не выявлены.		Методическое руководство. Морфологические исследования в ветеринарных лабораториях МСХ РФ ДВ г. Москва, 2002г.; ГОСТ 25386 - 91 Животные сельскохозяйственного. Методы лабораторной диагностики лептоспироза.
---	------------	--	--	--	---

Образец: 3 - 4074/В - труп мыши - опыт 2 (с применением кормовой добавки)

№ п/п	Наименование показателя	Ед. изм.	Результат испытаний	Погрешность/неопределенность	Норматив	ИД на метод испытаний
Патоморфология						
1	Гистология		При микроскопическом исследовании гистологических срезов внутренних органов (при окраске Левадити) изменения, характерные при лептоспирозе, не выявлены.			Методическое руководство. Морфологические исследования в ветеринарных лабораториях МСХ РФ ДВ г. Москва, 2002г.; ГОСТ 25386 - 91 Животные сельскохозяйственного. Методы лабораторной диагностики лептоспироза.

Применяемое оборудование:

№ п/п	Наименование оборудования	Дата поверки/калибровки/аттестации	Дата окончания поверки/калибровки/аттестации
1	Микротом ротационный Rotary 3004 M		
2	Термостат электрический сузжвоздушный охлаждающий ТСО-1/80 СПУ	23.08.2024	22.08.2025
3	микроскоп медицинский МИКМЕД-5		
4	термостат для парафиновой заливки ТВ3-25	23.08.2024	22.08.2025
5	шкаф вытяжной "ЛАБ-1200"		

* - сведения предоставлены заказчиком, за их достоверность лаборатория ответственности не несёт.

Примечание: 1. Протокол касается только проб (образцов), подвергнутых исследованию (испытанию).

2. ИЛ ГБУ РС (Я) "ЯРВИЛ" не несет ответственности за отбор образцов, произведенный заказчиком и предоставленную им информацию.

3. Протокол исследования (испытания) не может быть частично перепечатан без письменного разрешения ИЛ ГБУ РС (Я) "ЯРВИЛ".

Директор

П.В. Павлов

19.12.2024



Ответственный за оформление протокола: Канклакова Л.Р.

Приложение М
Методическое пособие



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ЯКУТСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ЯКУТСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА ИМЕНИ М.Г. САФРОНОВА
ООО НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР «ХОТУ-БАКТ»

ТЕХНОЛОГИЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ КОРМОВОЙ
ДОБАВКИ «ПРОБИСУБИЛ» ДЛЯ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

ЯКУТСК
2026