



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **531**

(51) **МПК(2012.01) A 01 N**
163/00;C 12 N 1/2

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения**

К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

(21) 1200719

(22) 18.04.2012

(46) Бюл. , 2012

(71) Каримов М.М.(TJ).

(72) Саттори И. (TJ); Сатторов Н.Р. (TJ); Турдиев Ш.А. (TJ); Хасанов Н.Р. (TJ); Каримов М.М. (TJ); Сафаралиев А.Р. (TJ); Баротов С.Т. (TJ); Юсупов М.М. (TJ).

(73) Саттори И. (TJ).

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПА-
РАТА ЛАКСУБТИЛ**

(56) 1.Панин А. Н. Пробиотики в ветеринарии как средство экологической реабилитации животных. – М., 1998.

2. Малик Н. И. Ветеринарные пробиотические препараты. Ветеринария. – 2001. – №1. – С. 46–51.

3.Патент Республики Таджикистан TJ № 391, Бюл. № 35.

4.Патент Республики Таджикистан TJ № 390, Бюл. №38.

(57) Изобретение относится к ветеринарной медицине, а именно к биотехнологии и может быть использовано в качестве продукта лечебно-профилактического назначения.

Способ включает засевание живых микробных клеток и спор бактерий (биомассу *Bacillus subtilis*) с полужидкого агара культуры производственного штамма *B. Subtilis* в пробирку с бульоном СБД (растительно-минерального состава) и выращивание в течение 18-24 часов при температуре 37°C. Также предусмотрена проверка на чистоту, засевание в питательную среду и хранение в течение 18-24 часов при температуре 37°C. В качестве питательной среды используют 1 л пастеризованного и охлажденного до температуры 37°C коровьего молока, которое перемешивают в течение 5-10 мин, растворяют и получают однородную бактериальную массу с концентрацией 100–200 х 10⁸ м.к./мл.

Изобретение относится к ветеринарной медицине, а именно к биотехнологии и может быть использовано в качестве продукта лечебно-профилактического назначения.

Аналогами являются известные препараты, изготовленные на основе «*Bacillus species*» - бактисубтил (1), «*Bacillus licheniformis*» - биоспорин (2) содержащие живые бактерии и наполнитель, высушенные лиофильным способом и расфасованные во флаконы или ампулы. Недостатком этих способов является отсутствие в их составе минеральных и растительных адсорбентов, способствующих сохранению жизнедеятельности бактерий в неблагоприятных условиях внешней среды и усиливающих их антимикробную активность, слабая бактерицидная активность препарата при смешанных инфекциях желудочно-кишечного тракта.

Наиболее близким к заявляемому является способ приготовления препарата, изготовленный на основе «*Bacillus subtilis*» - субтилбен в форме порошка (3,4). Для приготовления препарата осуществляют следующие действия: живые микробные клетки и споры бактерий (биомассу *Bacillus subtilis*) с полужидкого агара культуры производственных штаммов *B. subtilis* засевают в пробирку с питательным бульоном СБД и выращивают в течение 18–24 ч при 37°C. После этого культуры проверяют на чистоту и вновь засевают в матрасы, наполненные питательной средой. Через 18–24 ч при температуре 37°C инкубирования культуры *B. subtilis* проверяют на чистоту и используют для изготовления производственной серии биомассы.

Недостатком этого способа является то, что препарат "Субтилбен" в форме порошка требует разведения жидкостью перед применением, что не удобно при употреблении, снижается концентрация жизнеспособных микробов до 50% в процессе высушивания. Биомасса «*Bacillus subtilis*» находится в споровой форме и следовательно лечебное действие начинается после преобразования в вегетативную форму.

Цель изобретения – изготовление пробиотика в форме суспензии и улучшение лечебно-профилактических свойств биопрепарата.

Поставленная цель достигается тем, что живые микробные клетки и споры бактерий (биомассу *Bacillus subtilis*) с полужидкого агара культуры производственных штаммов *B. Subtilis* BS TJ Д 26 и BS TJ 09 засевают в пробирку с питательным бульоном СБД (растительно-минерального состава) и выращивают в течение 18-24 часов при температуре 37°C. Проверяют на чистоту и вновь засевают на 1 л пастеризованного и охлажденного до температуры 37°C коровьего молока и перемешивают в течение 5-10 мин, растворяют и ставят в термостат в течение 18-24 часов при температуре 37°C. В результате получают однородную бактериальную массу с концентрацией 100–200 х 10⁸ м.к./мл.

Было приготовлено препарата с различными штаммами *Bacillus subtilis*: из штамма BS TJ Д 26 и BS TJ 09

Полученный препарат проверяли на безвредность для животных, бактерицидную активность в отношении тест-культур возбудителей болезней животных (*Escherichia coli*, *Salmonella Dublin*, *Pasteurella multocida*, *Proteus vulgaris*) и лечебно-профилактическую эффективность при пневмоэнтеритах телят.

Пример 1. Безвредность Лаксубтила проверяли двумя способами. Первый, который используют для проверки продуктов микробиологического синтеза [ГОСТ Р 52337-2005 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности.], а второй – для установления острой токсичности лекарственных средств на лабораторных животных. [Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве. – М., 1988.].

В процессе проведения исследований первым методом определение степени токсичности экспериментального пробиотика, проводили с использованием сухой культуры инфузорий колподы согласно требованиям ГОСТа Р 52337-2005. Примененный метод базируется на экстрагировании с исследуемых продуктов различных фракций токсических веществ дистиллированной водой и впоследствии воздействием полученных экстрактов на культуру инфузории *Colpoda steinii*. Оценку результатов данного биотеста проводят по результатам гибели стилохоний.

Выживаемость стилохоний кожного ряда (N,%) вычисляли по следующей формуле

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

где:

N_1 – среднеарифметическое (из пяти) значение количества активных стилохоний в начале опыта, шт;

N_2 – среднеарифметическое (из пяти) значение количества активных стилохоний в конце опыта, шт. (Табл. № 1)

Изучение острой токсичности нового пробиотика на лабораторных животных проводили в соответствии с «Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве». Опыты провели на 40 белых мышах двухмесячного возраста, массой 18-21 г. Перед началом исследований их содержали в обычных условиях и наблюдали в течение 14 дней. Последний раз корм давали накануне опыта вечером, прием воды не ограничивали.

Из белых мышей по принципу парных аналогов сформировали 5 групп (n=8). Из них 4 опытных и одна – контрольная.

Исходя из результатов предыдущего опыта о нетоксичности препарата Лаксубтил на культуру

колпод, в этой серии наблюдений сразу применили высшие дозы исследуемого препарата. Для этого, мышам 4-х опытных групп, пробиотик в виде суспензии вводили однократно перорально в дозе – 0,1 мл (1-я группа), 0,2 мл (2-я группа), 0,3 мл (3-я группа) и 0,5 мл (4-я группа), что в пересчете на 1 кг массы тела составляло соответственно: 5 мл; 10мл; 15 мл и 25 мл.

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

Руководствуясь требованием ГОСТ-а Р 52337-2005 до не токсичных препаратов микробиологического синтеза относят средства, под действием которых за установленное время остаются активными свыше 80% стилохоний. Исходя из этого, пробиотик Лаксубтил, является нетоксичным препаратом.

Результаты опытов показали, что все варианты Лаксубтила безвредны. Все животные остались живыми в течение всего периода наблюдения, ни у одного из них не выявлены признаки заболеваний и других нарушений функций организма. Опыты на белых мышах свидетельствуют о том, что биомасса пробиотика Лаксубтил при энтеральном введении в максимальных дозах до 25000 мг/кг не вызвала гибели экспериментальных животных (Табл. 2).

Следовательно, экспериментальный пробиотик Лаксубтил в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 можно отнести к VI классу токсичности, т.е. к веществу относительно безопасному.

Пример 2. Антибактериальную активность препарата Лаксубтил изучали по отношению к тест культурам, в жидкой питательной среде методом серийных разведений.

По минимальному количеству препарата, ответствовавшему наименьшей его концентрации, дающему полную задержку роста тест-культуры, определяли чувствительность тест-микробов к препарату, результаты опытов оценивали микроскопически, путем исследования мазков культуральной жидкости, окрашенных по Граму.

Опыты проводили в трех повторах. Результаты представлены в таблице 3.

Установлено, что препарат обладает высокой бактерицидной активностью по отношению к тест-микробам. Результаты бактериологического исследования показали, что минимальная подавляющая концентрация (МПК) культур *B. subtilis* (BS TJ 09) составляет 0,06 – 0,12 мл/мл и *B. subtilis* (BS TJ Д 26) составляли 0,03 – 0,06 мл/мл, которые проявили высокую бактерицидную активность (0,06 – 0,12 мл/мл).

Пример 3. Эффективность штаммов Лаксубтила в различных дозах при профилактике желудочно-кишечных болезней телят испытывали на 180 телятах (1-4 дневного возраста) неблагополучных по инфекционным пневмоэнтеритам хозяйствам. Схема проведения опытов и результаты применения Лаксубтила представлены в таблице 4.

Результаты исследований свидетельствуют, что препарат Лаксубтил в дозах 5, 10 мл на кг массы тела при содержании биомассы ($100 - 200 \times 10^6$ м.к./мл), имеет высокий эффект в профилактике желудочно-кишечных болезней телят.

Пример 4. Исходя из полученных результатов профилактической эффективности, препарат Лаксубтил испытан в сравнительном аспекте с препаратом субтилбен на 40 новорожденных телятах.

Животных по принципу аналогов, разделили на 2 группы по 20 голов в каждой. Телятам первой группы до кормления молоком выпаивали Лаксубтил, содержащий биомассу *B. subtilis* ($100-200 \times 10^6$ м.к./мл) в дозе 5 мл на кг массы тела один раз в день, в течение 10 дней.

Телятам второй группы вводили субтилбен в соответствии с наставлением по применению препарата.

Результаты опытов представлены в таблице 5.

Из данных таблицы видно, что профилактическая экономическая эффективность препарата Лаксубтил по сравнению с препаратом субтилбен выше.

Пример 5. Лечебную эффективность препарата Лаксубтил изучали на 4 группах больных диареей телят 4-7-дневного возраста. При бактериологическом исследовании у больных телят были выявлены ассоциации бактериальных агентов (эшерихии коли, протей и сальмонеллы).

Телятам первой группы (16 гол.) препарат Лаксубтил в дозе 3 мл на кг массы тела выпаивали дважды в сутки. Телятам второй группы (16 гол.) препарат Лаксубтил в дозе 5 мл на кг массы тела выпаивали дважды в сутки. Телятам третьей группы (16 гол.) препарат Лаксубтил в дозе 10 мл на кг массы тела выпаивали дважды в сутки.

Контрольную группу больных телят (16 гол.) лечили субтилбеном согласно наставлению по его применению.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что Лаксубтил обладает высоким терапевтическим эффектом, Пероральное введение его подавляло в желудочно-кишечном тракте развитие патогенных возбудителей и лечебная эффективность не уступала известному препарату субтилбен. Испытание разных доз Лаксубтила при лечении диареи показало, что разовая дача препарата в количестве 5 и 10 мл на кг массы тела дважды в день до выздоровления обеспечивает хороший терапевтический эффект, затраты на лечение больных телят в 2 раза сокращаются по сравнению с субтилбеном.

Результаты опытов представлены в таблице 6.

Пробиотик Лаксубтил обладает антагонистическим действием, способен повысить иммунный статус организма животных и птиц, восстановить их нормальную микрофлору, а также используется для лечения и профилактики бактериозов и микоплазмозов.

Препарат вводят перорально в дозах 5; 10 мл/кг массы тела для лечения и профилактики инфекционных энтеритов телят. Лечебно-

профилактическая эффективность составляет 87,5-97,5%.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения биопрепарата Лаксубтил, включающий засевание живых микробных клеток и спор бактерий (биомассу *Bacillus subtilis*) с полужидкого агара культуры производственного штамма *B. Subtilis* в пробирку с бульоном СБД (растительно-минерального состава) и выращивание в течение 18-24 часов при температуре 37°C, проверку на чистоту, засевание в питательную

среду и хранение в течение 18-24 часов при температуре 37°C, **отличающийся тем, что** в качестве питательной среды используют 1 л пастеризованного и охлажденного до температуры 37°C коровьего молока, которое перемешивают в течение 5-10 мин, растворяют и получают однородную бактериальную массу с концентрацией 100–200 х 10⁸ м.к./мл.

Компьютерный набор: Фатхуллоева М.С.

Заказ

Тираж

Подписное

Национальный патентно-информационный центр РТ
734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а.

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА ЛАКСУБТИЛ

Таблица 1

Результаты реагирования стилохоний на пробиотик Лаксубтил

Ряд лунок	Кол-во активных стилохоний											
	в начале опыта						через 3 ч					
	№ лунки											
	1	2	3	4	5	N ₁	1	2	3	4	5	N ₂
Опытный	9	11	8	9	8	45	8	9	8	8	7	40
Контроль	10	8	12	9	11	50	9	7	10	9	10	45

Примечание: N₁ и N₂ – общее количество активных стилохоний

Таблица 2

Результат изучения острой токсичности пробиотика Лаксубтила на белых мышах.

		№ группы				
		1	2	3	4	5
		доза препарата, мл/кг				
		5,0	10,0	15,0	25,0	0
Кол-во лабораторных животных, гол.	всего	8	8	8	8	8
	выжило	8	8	8	8	8
	пало	0	0	0	0	0

Таблица 3.

Бактерицидная активность Лаксубтила к тест-микробам

Тест - культуры	Лаксубтил (мл/мл)			
	BS TJ 09		BS TJ Д 26	
	МПК	МБцК	МПК	МБцК
E. coli	0,06	0,12	0,03	0,06
S. Dublin	0,06	0,12	0,03	0,06
P. multocida	0,12	0,24	0,06	0,12
Pr. Vulgaris	0,12	0,24	0,06	0,12

Примечание: МПК – минимальная подавляющая концентрация,
МБцК – минимальная бактериоцидная концентрация

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА ЛАКСУБТИЛ

Таблица 4.

Эффективность лаксубтила при профилактике инфекционных энтеритов телят

Штаммы B. subtilis	Кол-во телят, гол.	Доза препарата, мл/кг	Результаты	
			Заболело гол.	не заболело гол.
BS TJ 09	10	3	1	9
	10	5	1	9
	10	10	1	9
BS TJ Д 26	10	3	0	10
	10	5	0	10
	10	10	0	10

Примечание. Препараты выпаивали телятам один раз в день в течение 10 дней.

Таблица 5.

Профилактическая эффективность Лаксубтила

Показатели	Группа	
	I	II
Количество телят, гол.	40	40
Заболело диареей телят, гол.	1 (97,5)	2(94)
Пало, гол.	0	1
Стоимость одной дозы препарата, сомони	0,32	0,42
Затраты на профилактику диареи телят в группе, сомони	128	180

Примечание. В скобках дано процентное выражение

Таблица 6.

Эффективность применения Лаксубтила для лечения желудочно-кишечных болезней телят

Показатели	Группа			
	1	2	3	4 (контроль)
Количество больных телят, гол.	16	16	16	16
Выздоровело, гол.	12	14	14	12
Пало, гол.	-	-	-	-
Продолжительность болезни, сутки	5	4,0	4,0	6,2
Живая масса телят при рождении, кг	31,2	33,1	35,4	32,2
В день заболевания, кг	31,0	33,0	35,2	32,0
В 20-дневном возрасте, кг	32,1	34,5	36,0	33,2
Среднесуточный прирост, г	130	146	150	135