



(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

(21) 03000795

(22) 18.07.2003

(46) Бюл. 35 (3), 2004

(71) Сатторов И.Т. (TJ)

(72) Сатторов И.Т. (TJ); Джуманкулов Х.Д. (TJ); Сангинов Б.С. (TJ); Султонова М.Х. (TJ); Каландаров З. (TJ); Саидов Ш. (TJ)

(73) Сатторов И.Т. (TJ); Джуманкулов Х.Д. (TJ)

(56) 1. RU 2181596 C1, 27.04.2002

2. RU 2190390 C2, 10.10.1992

3. SU 1717156 A1, 07.03.1992

4. US 5374425 A, 20.12.1994

(54) **ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЙ БИОПРЕПАРАТ СУБТИЛБЕН**

(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности к биопрепаратам, используемым для защиты животных от болезней (колибактериоза, сальмонеллеза, пастереллеза, протейоза), протекающих как в отдельности, так и в сочетании.

Биопрепарат для защиты животных от болезней, содержащий биомассу *Bacillus subtilis*, отличающийся тем, что в его состав включают бентонито-пектиновую смесь (9:1) в следующем соотношении компонентов, об. %:

биомасса *Bacillus subtilis* (штамм 26Д ТаджНИВИ 09) в концентрации 60-70х10⁹ м.к./г – 70-80,
бентонито-пектиновая смесь (9:1) – 20 – 30.

Препарат вводят перорально в дозах 0,3; 0,5 г/кг массы тела для лечения и профилактики инфекционных энтеритов телят. Лечебно-профилактическая эффективность составляет 87,5 – 97,5%.

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к биопрепаратам, используемым для защиты животных от болезней.

Известны биопрепараты ацидофилин, протовит (1) для профилактики диареи у молодняка сельскохозяйственных животных. Недостатком этих препаратов является отсутствие ингибирующей активности по отношению к патогенным возбудителям болезней животных.

Известны препараты, изготовленные на основе «*Bacillus species*» - бактисубтил (2.), «*Bacillus subtilis*» и «*Bacillus licheniformis*» - биоспорин (3), содержащие живые бактерии и наполнитель, высушенные лиофильным способом, расфасованные во флаконы или ампулы.

Недостатками этих препаратов являются:

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

Известен биопрепарат бактерии-sl (4), содержащий живые микробные клетки (м.к.) и споры (биомассу) *Bacillus* и наполнитель - белково-сахарозо-желатиновую смесь. Бактерии-sl высушен лиофильным способом и расфасован во флаконы или ампулы. Препарат применяют как средство для лечения и профилактики желудочно-кишечных болезней животных. Однако препарат, принятый за прототип, имеет ряд недостатков:

микробная культура, входящая в состав бактерии-sl, характеризуется невысокой ингибирующей активностью по отношению к возбудителям желудочно-кишечных болезней животных как в отдельности, так и в

ассоциации; не содержит минеральных и растительных адсорбентов в качестве наполнителя, повышающих бактерицидную активность *Bacillus subtilis* и способствующих локальной адсорбции бактериальных токсинов.

Цель изобретения - улучшение лечебных и профилактических свойств биопрепарата.

Поставленная цель достигается тем, что в состав биопрепарата для защиты животных от болезней, содержащего живые микробные клетки и споры бактерий (биомассу) *Bacillus subtilis* и белково-сахароза-желатиновую смесь, для улучшения его лечебно-профилактических свойств вместо белково-сахароза-желатиновой смеси включают бентонито-пектиновую (9:1) в следующем соотношении компонентов, об. %:

биомасса *Bacillus subtilis* (штамм 26Д ТаджНИВИ 09) в концентрации $60 - 70 \times 10^9$ м.к./г - 70-80,
бентонито-пектиновая смесь (9:1) - 20 - 30.

Были изготовлены 9 вариантов препарата с различным количественным содержанием биомассы и бентонито-пектиновой смеси.

Вариант 1.

Состав препарата, об. %:

биомасса *Bacillus subtilis* (60×10^9 м.к./г) - 70,
бентонита-пектиновая смесь (9:1) - 30.

Вариант 2

Состав препарата, об. %:

биомасса *Bacillus subtilis* (65×10^9 м.к./г) - 70,
бентонито-пектиновая смесь (9:1) - 30.

Вариант 3.

Состав препарата, об. %:

биомасса *Bacillus subtilis* (70×10^9 м.к./г) - 70,
бентонито-пектиновая смесь (9:1) - 30.

Вариант 4.

Состав препарата, об. %:

биомасса *Bacillus subtilis* (60×10^9 м.к./г) - 75,
бентонито-пектиновая смесь (9:1) - 25.

Вариант 5.

Состав препарата, об. %:

биомасса *Bacillus subtilis* (65×10^9 м.к./г) - 75,
бентонито-пектиновая смесь (9:1) - 25.

Вариант 6.

Состав препарата, об. %:

биомасса *Bacillus subtilis* (70×10^9 м.к./г) - 75,
бентонито-пектиновая смесь (9:1) - 25.

Вариант 7.

Состав препарата, об. %:

биомасса *Bacillus subtilis* (60×10^9 м.к./г) - 80,
бентонито-пектиновая смесь (9:1) - 20,

Вариант 8

Состав препарата, об. %:

биомасса *Bacillus subtilis* (65×10^9 м.к./г) - 80,
бентонито-пектиновая смесь (9:1) - 20.

Вариант 9.

Состав препарата, об. %:

биомасса *Bacillus subtilis* (70×10^9 м.к./г) - 80,
бентонито-пектиновая смесь (9:1) - 20

Полученные варианты препарата проверяли на безвредность для животных, бактерицидную активность в отношении тест-культур возбудителей болезней животных (*Escherichia coli*, *Salmonella dublin*, *Pasteurella multocida*, *Proteus vulgaris*).

Для определения безвредности содержимое каждого варианта препарата в количестве 0,3 г на кг массы тела с водой перорально вводили белым мышам массой 16 - 18 г (по 10 голов для каждого варианта) и новорожденным (2- 3-дневного возраста) телятам массой 30 - 35 кг (по 4 головы для каждого варианта) 2 раза в день в течение 10 дней.

Препарат считали безвредным, если все мыши и телята оставались живыми в течение 14 суток наблюдения. Результаты испытаний представлены в таблице 1.

Результаты опытов показали, что все варианты субтилбена безвредны. Все животные остались живыми в течение всего периода наблюдения, ни у одного из них не выявлены признаки заболеваний и другие нарушения функций организма

Данные исследований, приведенные в примерах 1 - 4, свидетельствуют, что препарат субтилбен обладает высокой лечебно-профилактической эффективностью при желудочно-кишечных болезнях телят, вызванных ассоциациями эшерихии коли, сальмонеллы, пастерелы и протей.

Пример 1. Антибактериальную активность препарата субтилбен изучали по отношению к тест-культурам, антимикробную - в жидкой питательной среде методом серийных разведений (5).

По минимальному количеству препарата, соответствовавшему наименьшей его концентрации, дающей полную задержку роста тест-культуры, определяли чувствительность тест-микробов к препарату. Результаты опытов оценивали микроскопически путем исследования мазков культуральной жидкости, окрашенных по Гаму.

Опыты проводили в трех повторах. Результаты представлены в таблице 2.

Установлено, что препарат обладает высокой бактерицидной активностью по отношению к тест-микробам. Минимальное количество препарата, дающее полную задержку роста и развития тест-микробов, составило 15,1 - 31,2 млн м.к. в мл, тогда как известный препарат бактерин-sl задерживал рост и развитие тест-микробов возбудителей болезней животных в концентрации 125 - 250 млн м.к. в мл.

Пример 2. Эффективность 9 вариантов субтилбена в различных дозах при профилактике желудочно-кишечных болезней телят испытывали на 180 телятах (1 - 4- дневного возраста) неблагополучного по инфекционным энтеритам хозяйства. Схема проведения опытов и результаты применения субтилбена представлены в таблице 3.

Результаты исследований свидетельствуют, что препарат субтилбен в дозах 0,3; 0,5 г на кг массы тела при содержании биомассы (60 - 70x10⁹ м.к./г) в количестве 70 - 80% и наполнителя - бентонито-пектиновой смеси - в количестве 20 - 30% имеет высокий эффект в профилактике желудочно-кишечных болезней телят.

Пример 3. Исходя из полученных результатов, препарат субтилбен испытан в сравнительном аспекте с препаратом бактериу-sl на 80 новорожденных телятах.

Животных по принципу аналогов, разделили на 2 группы по 40 голов в каждой. Телятам первой группы до кормления молоком выпаивали субтилбен (вариант 6), содержащий биомассу *B. subtilis* (70x10⁹ м.к./г) в количестве 75% и бентонито-пектиновую смесь - 25%, в дозе 0,3 г на кг массы тела один раз в день в течение 10 дней.

Телятам второй группы вводили бактерии-sl в соответствии с наставлением по применению препарата.

Результаты опытов представлены в таблице 4.

Из данных таблицы видно, что профилактическая и экономическая эффективность препарата субтилбен по сравнению с щюпаратом бактерин-sl выше.

Пример 4. Лечебную эффективность препарата субтилбен (вариант 6) 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 сальмонелл).

Телятам первой группы (16 гол.) препарат субтилбен из расчета 0,2 г на кг массы тела растворяли в 300 мл воды и выпаивали дважды в сутки. Телятам второй группы (16 гол.) препарат субтилбен из расчета 0,3 г на кг массы тела растворяли в 300 мл воды и выпаивали дважды в сутки. Телятам третьей группы (16 гол.) препарат субтилбен из расчета 0,5 г на кг массы тела растворяли в 300 мл воды и выпаивали дважды в сутки.

Контрольную группу больных телят (16 гол.) лечили бактерином-sl согласно наставлению по его применению.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что субтилбен обладает высоким терапевтическим эффектом. Пероральное введение его подавляло в желудочно-кишечном тракте развитие патогенных возбудителей и обеспечивало более быстрое выздоровление телят на 1,0 - 2,2 суток, чем при использовании бактерин-sl.

Испытание разных доз субтилбена при лечении диареи показало, что разовая дача препарата в количестве 0,3 и 0,5 г 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 бактерин-sl.

Результаты опытов представлены в таблице 5.

Для изучения срока годности препарата субтилбен его серии, изготовленные в 2000 г., были заложены на хранение при комнатной температуре и подвергались переконтролю на содержание живых колониеобразующих клеток (КОК) через каждые 2 месяца. Количество живых КОК определяли высевом препарата на плотные питательные среды (Гаузе-2 или картофельный агар) и подсчетом выросших колоний.

В таблице 6 представлены данные контроля 9 вариантов препарата субтилбен.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Лечебно-профилактический биопрепарат, включающий живую микробную массу *Bacillus subtilis* и наполнитель, **отличающийся тем, что** он содержит биомассу штамма *Bacillus subtilis* 26Д ТаджНИВИ 09 в концентрации 60-70x10⁹ микробных клеток/г в количестве 70-80 мас% и наполнитель – бентонито-пектиновую смесь (9:1) в количестве 20-30 мас%.

Таблица 1.

Безвредность препарата субтилбен для животных

Вариант Препарата	Вид животного	Кол-во животных в опыте, гол.	Заболело, гол.	Кол-во выживших животных, гол.
1	Белые мыши	10	0	10
2	-«»-	10	0	10
3	-«»-	10	0	10
4	-«»-	10	0	10
5	-«»-	10	0	10
6	-«»-	10	0	10
7	-«»-	10	0	10
8	-«»-	10	0	10
9	-«»-	10	0	10
1	телята	4	0	4
2	-«»-	4	0	4
3	-«»-	4	0	4
4	-«»-	4	0	4
5	-«»-	4	0	4
6	-«»-	4	0	4
7	-«»-	4	0	4
8	-«»-	4	0	4
9	-«»-	4	0	4

Таблица 2.

Бактерицидная активность субтилбена к тест-микробам

Препарат	Бактерии	Количество микробных клеток в препарате, млн/мл									
		500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	Конт роль
Субтилбен	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Salmonella dublin</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Pasterella multosida</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Бактерин-sl	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Salmonella dublin</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Pasterella multosida</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: - отсутствие роста тест – микробов

+ наличие роста бактерий

Таблица 3.
Эффективность субтилбена при профилактике инфекционных энтеритов телят

Вариант препарата	Кол-во телят, гол.	Доза препарата, г/кг	Результаты	
			Заболело гол.	! не заболело гол.
1	10	0,2	1	9
1	10	0,3	1	9
1	10	0,5	1	9
2	10	0,2	1	9
2	10	0,3	0	10
2	10	0,5	0	10
3	10	0,2	0	10
3	10	0,3	0	10
3	10	0,5	0	10
4	10	0,2	0	10
4	10	0,3	0	10
4	10	0,5	0	10
5	10	0,2	0	10
5	10	0,3	0	10
5	10	0,5	0	10
6	10	0,2	0	10
6	10	0,3	0	10
6	10	0,5	0	10
7	10	0,2	0	10
7	10	0,3	0	10
7	10	0,5	0	10
8	10	0,2	0	10
8	10	0,3	0	10
8	10	0,5	0	10
9	10	0,2	0	10
9	10	0,3	0	10
9	10	0,5	0	10

Примечание. Одну дозу препарата растворяли в 150 - 200 мл молока или воды, прокипяченных и охлажденных до 25 – 30°C, и выпаивали перед кормлением один раз в день в течение 10 дней.

Таблица 4.
Профилактическая эффективность субтилбена

Показатели	Группа	
	I	II
Количество телят, гол.	40	40
Заболело диареей телят, гол.	1 (97,5)	4 (90)
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 5.
Эффективность применения субтилбена
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	9
Пало, гол.	-	-	-	1
Продолжительность болезни, сутки	5	4,0	4,0	6,2
Количество телят с повторными заболеваниями, гол.	2	1	1	3
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
Средесуточный прирост, г	130	146	150	120

Таблица 6.
Количество КОК в вариантах препарата субтилбен в зависимости от срока хранения

Вариант препарата	Срок хранения, мес					
	6	12	18	24	30	36
	Количество КОК, млрд м.к./мл					
1	3,0	3,0	2,5	2,5	2,0	1,5
2	4,0	3,8	4,0	4,0	3,5	3,0
3	4,5	4,0	4,0	4,0	3,5	3,2
4	3,0	3,0	2,5	2,5	2,2	1,8
5	4,0	3,8	4,5	4,0	3,6	3,0
6	4,5	4,5	4,5	4,5	3,5	3,5
7	3,0	3,2	2,0	2,0	1,8	1,5
8	4,0	4,0	4,5	4,0	3,5	3,5
9	4,5	4,0	4,0	4,0	3,8	3,8

Из данных таблицы видно, что в препарате субтилбен жизнеспособность *Basillus subtilis* сохраняется в течение 36 мес (срок наблюдения)