

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАНА
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

УДК: 575.23:.85:. 662

АСАМОВА МУНИСАХОН БОТИР ҚИЗИ

**ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕСТНЫХ ШТАММОВ
БАКТЕРИЙ V.SUBTILIS НА РОСТ РАЗВИТИЕ БРОЙЛЛЕРОВ**

Специальность 5А320501-биотехнология (производство пищевых
продуктов и биопрепараты для сельского хозяйства)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание академической степени магистра

Научный руководитель
к.б.н., доц. Артикова Р.М.

Научный консультант
к.б.н. Хамидова Х.М.

Ташкент-2015

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Понятие о пробиотиках	16
1.2. Пробиотические препараты кормового назначения	
1.3. Использование пробиотических препаратов в промышленном птицеводстве	24
1.4 Механизм действия пробиотиков	27
1.5. Биологические эффекты, вызываемые использованием пробиотиков	30
1.6. Пробиотические препараты на основе спорообразующих бактерий	36
1.7. Технология производства пробиотиков на основе бактерий рода <i>Bacillus subtilis</i>	40
II МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	44
2.1 Объекты исследований	
2.2. Характеристика спорообразующих бактерий рода <i>Bacillus</i>	44
2.3. Определение количества <i>Bacillus subtilis</i>	46
2.4. Окраска клеток по Граму	
III РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	51
3.1. Оптимизация питательной среды для <i>Bacillus subtilis</i>	51
3.2. Влияние бактерий <i>Bacillus subtilis</i> на рост, развитие и сохранность цыплят-бройлеров	56
ВЫВОДЫ	66
Список использованной литературы	68
Приложение	

Введение

Одним из основных направлений в современном животноводстве является получение экологически чистой продукции. Это, в свою очередь, требует от производителей отказа от применения кормовых антибиотиков, которые способны аккумулироваться в организме животных. В условиях промышленного получения сельскохозяйственной продукции, исключение антибиотиков может привести к массовым заболеваниям животных. Это соображение вызывает необходимость поиска препаратов альтернативных кормовым антибиотикам, которые способны поддерживать устойчивость к заболеваниям объектов разведения. Естественные механизмы защиты, в большинстве случаев, позволяют животным в условиях большой концентрации адекватно реагировать на стрессы связанные с технологическими приемами выращивания (кормление, содержание и т.д.).

Пограничной зоной между внешней и внутренней средой организма является вся поверхность тела, полости внутренних органов и, прежде всего, слизистая желудочно-кишечного тракта, которая непосредственно соприкасается с тем, что животное потребляет в пищу. В этом случае основным защитным барьером от проникновения патогенных представителей флоры и фауны является биопленка на поверхности кишечника, включающая в себя слой слизи и массу пристеночных микроорганизмов. Механизм ее действия связывают с конкурентными взаимодействиями микрофлоры организма животных и поступающей с пищей. Поэтому любое заболевание алиментарного характера чаще всего проявляется в нарушении количественного и качественного состава микрофлоры пищеварительной системы. В связи с этим выращивание здоровых, обладающих хорошим ростом животных связано с поддержанием их микробиального баланса в пределах физиологических норм .

Одним из заменителей кормовых антибиотиков могут служить пробиотики, которые нашли широкое применение в медицине, ветеринарии и зоотехнии. Механизм их действия связывают с подавлением патогенной микрофлоры и стимулированием развития полезных микроорганизмов. Пробиотики можно применять отдельно, или в комплексе с витаминами и микроэлементами, что позволяет повысить естественную резистентность животных. Несмотря на интенсивное использование в животноводстве их влияние на организм изучено еще недостаточно, особенно на рост и морфофункциональные особенности органов желудочно-кишечного тракта, печени, почек, желез внутренней секреции различных животных и в частности, бройлеров. Исследования, направленные на установления влияния пробиотиков на пищеварительную систему и другие органы цыплят-бройлеров, дающих основную продукцию мяса птицы, весьма ограничены и фрагментарны.

Формирование организма человека и животных в процессе его эволюции происходило в постоянном тесном контакте с миром микроорганизмов. Этот огромный мир представляет собой целый микрокосмос. Контакт с миром микроорганизмов вооружил человека и животных эффективными механизмами иммунитета. Без нормальной микрофлоры невозможны полноценное пищеварение и усвоение пищи, поддержание постоянства внутренней среды организма, его защиты от патогенной микрофлоры. Число полезных бактерий, сосуществующих с макроорганизмом, примерно на два порядка превышает численность клеток самого макроорганизма.

И. И. Мечников впервые выдвинул теорию о влиянии нормальной микрофлоры на обмен веществ организма хозяина. При нормальном физиологическом состоянии взаимоотношения макроорганизма и микрофлоры носят симбиотический характер, и микроорганизмы при этом выполняют ряд весьма важных и полезных функций. Таким образом, макроорганизм теснейшим образом связан с микрофлорой, состав которой

в норме характеризуется постоянством и сбалансированностью популяций ее основных представителей. В больном организме очень часто нарушаются количественные соотношения микробных популяций, их распределение в кишечном тракте, верхних дыхательных путях, коже, а также их биологическая активность.

Нарушение нормальных микробиоценозов, ведущие к неблагоприятным последствиям, стало усугубляться после появления мощных антибиотиков и ухудшения экологических условий окружающей среды.

Возросшая нагрузка на организм, обусловленная широким производством вредных для всего живого химических продуктов, попадающих в окружающую среду, изменила иммунобиологическую реактивность животных и человека, особенно молодых развивающихся организмов. Все это приводит к расстройствам основных регуляторных систем организма, способствуя массовому росту различных заболеваний, генетическим нарушениям и другим изменениям.

Поиск путей нормализации полезной микрофлоры в организме стал одной из самых актуальных задач науки. Всё большую актуальность во всем мире приобретают пробиотические препараты, их широкое использование и внедрение в промышленное животноводство.

В птицеводстве все шире стали применять ветеринарные иммунобиологические препараты – пробиотики, необходимые для формирования нормобиоценоза и повышения общей резистентности организма птицы к воздействию неблагоприятных факторов. Это, прежде всего инфекции, неполноценное кормление, токсичность и микробная загрязненность кормов, неблагоприятные условия содержания, постпрививочные реакции и многое другое. Хорошо известно, что у птицы, потребляющей неполноценный корм, снижается резистентность организма и увеличивается риск заболеваемости. Так, микотоксины резко ухудшают состав микрофлоры кишечника и приводят не только к

дисбактериозу, но и ослабляют иммунную защиту. Иммунодефицит снижает эффект прививок, возникают постпрививочные осложнения, возрастает активность условно патогенной микрофлоры, повышается процент колибактериозов и диарей разной этиологии.

Сегодня нарушение микробиоценоза у птицы и снижение иммунного ответа организма на различные инфекционные и неинфекционные неблагоприятные факторы – серьезная проблема.

Развитие биотехнологии привело к появлению кормовых продуктов и биологически активных добавок с новыми свойствами. К их числу относятся пробиотики. Последние предназначены для коррекции кишечного биоценоза, повышения естественной резистентности птицы. Они способствуют увеличению продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы, повышению усвояемости питательных веществ в кормах, снижению себестоимости продукции. Кроме того пробиотики используются для профилактики и лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта различной этиологии, стимуляции неспецифического иммунитета птицы, восстановления нормальной микрофлоры после лечения различными антимикробными препаратами [3.68,84,83].

ОБОСНОВАНИЕ И АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Сегодняшний день на первый план выдвигается управление качеством сельскохозяйственной продукции в условиях производства и переработки. При этом возрастает роль систем научного сопровождения ресурсосберегающих технологий в производстве сельскохозяйственного сырья и его переработке до поставки продуктов питания с гарантией безопасности для человека, в которых не должно присутствовать патогенных микроорганизмов, токсинов, радиоактивных и химических веществ, опасных для здоровья человека.

В условиях интенсивного развития животноводства одним из основных определяющих критериев становится качество продукции и ее экологическая чистота. Проблемы внедрения экологически безопасной сельскохозяйственной продукции заставляют по-новому взглянуть на организацию кормления животных. Поэтому актуальным является вопрос об использовании в кормлении животных новых кормовых продуктов, в том числе нетрадиционных и препаратов биологически активных веществ нового поколения. Здоровье пищеварительного тракта, связанное со сбалансированной микрофлорой кишечника, считается основным условием низкочастотного и благоприятного для окружающей среды животноводства.

Увеличение производства продукции животноводства и снижение ее себестоимости требует мобилизации всех ресурсов на основе широкого внедрения достижений науки. Одним из факторов, определяющих продуктивность животных и птиц, является полноценность их кормления, которое достигается не только набором кормовых средств, но и включением в рацион биологически активных веществ.

Статистика показывает, что птица больше всего страдает и гибнет от желудочно-кишечных болезней. Чаще всего в лечении используют антибиотики. Но эти препараты убивают как патогенные, так и полезные бактерии. К тому же антибиотики полностью не выводятся из организма,

отчего снижается питательная ценность птицеводческой продукции. Уничтожая нормальную флору желудка и кишечника, антибиотики часто подавляют иммунитет птицы. Самое распространенное последствие их применения - дисбактериоз. Сегодня стали широко использовать в качестве кормовых добавок препараты-пробиотики. Входящие в их состав микроорганизмы не патогенны, не токсичны, сохраняют жизнеспособность при прохождении через желудочно-кишечный тракт и при хранении. Их можно включать в комбикорма в жидкой форме или в виде лиофилизированных порошков, содержащих бифидобактерии, лактобактерии и их комбинации, использовать для восстановления микробиоценоза кишечника, поддержания хорошего здоровья и в результате — повышения мясной и яичной продуктивности.

В профилактике и борьбе с желудочно-кишечными заболеваниями, а также для повышения переваримости питательных веществ комбикормов, высвобождения дополнительной энергии используют и такие кормовые добавки, как пребиотики. К ним относятся небактериальные препараты, способствующие восстановлению микрофлоры животных. Известны преби-отики на основе олигосахаридов, инозита, фруктоолигосахаридов, лактулозы, органических кислот, инулина. Эти кормовые добавки стимули-руют естественный рост грамположительных бактерий в пищеварительном тракте.

Пробиотики — это не лекарства, а кормовые добавки, их можно рассматривать как важную часть в общем комплексе мер, по улучшению здоровья и сохранности птицы.

В настоящее время многими хозяйствами в состав комбикормов для животных вводятся биопрепараты из живых микробных культур. Это необходимо для того, чтобы улучшить работу желудочно-кишечного тракта животных, повысить усваиваемость кормов, и в результате, увеличить продуктивность. Применение пробиотических препаратов позволяет также усилить резистентность организма животных к

заболеваниям и повысить эффективность вакцинаций, обеспечивая снижение себестоимости продукции животноводства и птицеводства [1]. основой многих пробиотических препаратов являются спорообразующие бактерии рода *Bacillus*. [2].

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью настоящей работы явилось:

Оптимизация питательной среды для *Bacillus subtilis* и изучения эффективности влияния *Bacillus subtilis* на питательную ценность кормов животных, применить в качестве кормовой биодобавки *Bacillus subtilis* кормам цыплятам; изучить эффективности влияние *Bacillus subtilis* на показатели роста и развития, продуктивности цыплят-бройлеров

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

- Изучить эффективности замена в составе питательной среды для *Bacillus subtilis* глютена на кукурузную муку, подсолнечникового шрота на пивную дробину и пшеничные отруби и определить экономическую эффективность
- Изучить динамику и интенсивность роста живой массы цыплят-бройлеров при включении в состав комбикорма бактерий *Bacillus subtilis*
- - установить влияние скармливания бактерий *Bacillus subtilis* на убойные и мясные качества цыплят-бройлеров;

Научная новизна исследований. Впервые при выращивании цыплят-бройлеров проведены комплексные исследования по изучению влияния местных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* на рост и развития, сохранность, убойные и мясные качества.

Практическая значимость и реализация результатов исследований. Установлены рациональные способы использования *Bacillus subtilis* в комбикормах для цыплят-бройлеров.

Использование *Bacillus subtilis* в качестве кормовых добавок обеспечивает необходимый состав нормофлоры в желудочно-кишечном тракте, способствующий повышению биологических резервов организма, выражающийся в увеличении интенсивности роста и развитии птицы, снижении затрат кормов на единицу продукции.

Результаты исследований могут быть использованы в птицеводстве для повышения естественной резистентности, сохранности и продуктивности цыплят. Применение пробиотических и пребиотических препаратов может служить альтернативой использованию антибиотиков и способствовать повышению качества продукции птицеводства.

Глава I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Понятие о пробиотиках

Пробиотики - живые микробные добавки, которые оказывают благоприятное действие на организм человека и животного путем улучшения кишечного микробного баланса. Они положительно влияют на организм хозяина, способствуют восстановлению пищеварения, биологического статуса, иммунного ответа, повышают эффективность вакцинаций. При их применении снижаются заболеваемость, количество фармакологических обработок и связанные с ними материальные издержки. К числу наиболее известных пробиотиков относятся молочно-кислые бактерии, бифидобактерии, стрептококки. [100], стимулируют обменные иммунные процессы [55]. Это объекты всесторонних научных исследований и важный товар на мировом рынке, объем продаж которых оценивается в миллиарды долларов в год. Широкому кругу потребителей доступны сотни пробиотических продуктов питания и пищевых добавок, а производители кормов для сельскохозяйственных и домашних животных, птицы и рыбы используют пробиотические препараты в составе кормов. Применение пробиотиков связано с решением различных проблем со здоровьем, повышением эффективности пищеварения, стимуляцией роста и развития.

Пробиотики перспективны в качестве профилактических средств и сопутствующей терапии, но не являются основным средством для лечения заболеваний. На специальном коллоквиуме Американской Академии Микробиологии в ноябре 2005 г. обсуждались вопросы взаимосвязи между микроорганизмами, иммунитетом и болезнями, доказательные данные в отношении лечебных свойств пробиотиков и возможные перспективы их использования [88]. Установлено, что применение пробиотиков может оказывать противoinфекционное, иммунномодуляторное воздействие на организм, повышать барьерные функции (физиологические механизмы,

защищающие организм от воздействия окружающей среды, препятствующие проникновению в него бактерий, вирусов и вредных веществ), стимулировать моторику и экскреторную функции кишечника.

Введенные с препаратами пробиотические штаммы взаимодействуют с сообществом бактерий кишечника, выделяют метаболиты, влияющие на активность иммунной, гормональной, пищеварительной систем организма-хозяина.

В последнее десятилетие концепция пробиотиков претерпела существенные изменения. Возросло внимание исследователей к структурным компонентам и продуктам метаболизма пробиотических микроорганизмов. Данные изменения связаны с расширением представлений о биологической эффективности пробиотиков и обнаружении того факта, что структурные элементы клеток и их метаболиты в ряде случаев оказываются не менее эффективными [66]. Выделяют 4 поколения пробиотиков [65] (табл. 1).

Таблица 1

Современные поколения пробиотиков

I поколение	Монокомпонентные препараты, содержащие один штамм бактерий
II поколение	Самозлиминирующиеся антагонисты, к которым относятся представители рода <i>Bacillus</i> , главным образом, <i>B.subtilis</i> , <i>B.licheniformis</i>
III поколение	Комбинированные препараты, состоящие из нескольких штаммов бактерий (поликомпонентные) или включающие добавки, усиливающие их действие
IV поколение	Иммобилизованные на сорбенте (сорбированные) живые бактерии

В настоящее время на рынке пробиотиков востребованы комбинированные препараты. Входящие в комплексный пробиотик

штаммы бактерий объединяются по способности штаммов продуцировать различные ферменты, биологически активные вещества так, чтобы они дополняли друг друга по биологической активности. Кроме того, для получения новых поликомпонентных биологически активных препаратов комбинируют комплексы пробиотиков с пребиотическими веществами.

К прогрессивным формам препаратов нового поколения относятся сорбированные формы пробиотиков. Сорбированные пробиотики содержат бактерии, иммобилизованные на частицах твердого сорбента. За счет химических и электростатических сил взаимодействие таких форм со стенкой кишечника выше. Сорбент ускоряет дезинтоксикацию и репаративный процесс. Наиболее часто использующиеся природные сорбенты - угли, цеолиты и кремнеземы. Они обладают относительно хорошей сорбционной и ионообменной способностью, имеют сильно развитый поверхностный каркас, с порами разного диаметра, способными взаимодействовать с различными веществами и клетками пробиотика.

Биологическая активность таких препаратов связана с тем, что микробная масса живых пробиотических бактерий иммобилизована на сорбенте, благодаря чему они лучше выживают и быстрее заселяют кишечник [24,74.].

Иммобилизованная форма пробиотического препарата позволяет существенно повысить защиту бифидо- и лактобактерий при прохождении через желудок, где обычные препараты, содержащие лиофильно высушенные клетки пробиотиков, теряют более 90 % активности. Композиции цеолиты + пробиотик обладают выраженными иммунокорректирующими свойствами [72], нормализуют микробиоценоз желудочно-кишечного тракта, повышают неспецифическую резистентность организма, стимулируют функциональную деятельность пищеварительной системы, обладают, как правило, детоксикационными свойствами. Биологическая эффективность сорбированных пробиотиков позволяет применять уменьшенные дозы бактерий. В частности, одна доза

Бифидумбактерин форте (пробиотик, сорбированный на косточковом активированном угле) содержит не менее 10^7 КОЕ/г бифидобактерий (количество колониеобразующих клеток бактерий (КОЕ) - указано в инструкции по применению), что сравнимо с содержанием бактерий в кисломолочных продуктах, и на два порядка меньше дозы, рекомендованной для обычных пробиотиков. Адсорбированные на нейтральном фито-носителе клетки пробиотических микроорганизмов содержатся в препаратах кормового назначения Целлобактерин и Целлобактерин-Т [60], доза ввода которых в корма составляет 1 кг на тонну комбикорма. Учитывая, что в 1 т комбикорма с Целлобактерином Т содержится 104 КОЕ пробиотика [40], это составляет 10^7 КОЕ на 1 кг препарата.

В качестве сорбента эффективно использование пребиотиков. Пребиотики - это класс препаратов для регуляции кишечной микрофлоры, который приобретает все большую популярность. Пребиотики - субстраты, стимулирующие естественную микрофлору, не перевариваются и не всасываются в желудке и тонком отделе кишечника. Попадая в толстый отдел кишечника, пребиотики используются в качестве питательной среды для нормальной микробиоты [80,88,95]. У млекопитающих в первые дни после рождения основным пребиотическим субстратом является лактулоза, входящая в состав молока. С переходом на смешанное кормление субстратом, способствующим росту нормальной микробиоты, становятся структурные элементы растительных тканей, различные полисахариды (пектины, инулин и др.). Для разных видов животных предложен пробиотический препарат Зоонорм, который состоит из лиофилизированной микробной массы живых бактерий *Bifidobacterium bifidum* в виде микроколоний, сорбированных на частицах активированного угля и лактулозы [31].

Научное обоснование конструирования пробиотических препаратов основано на анализе взаимоотношений макро- и микроорганизма. В

настоящее время активно развивается представление о кишечной микробиоте как о самостоятельном «органе», который в виде биопленки покрывает стенку кишечника [11,50,51,39,87,86]. Сложившаяся в ходе развития организма биопленка - прочная система, препятствующая внедрению чужеродных штаммов. Коллективный иммунитет биопленки кишечника не позволяет в полной мере осуществлять коррекцию дисбактериозов с помощью препаратов живых культур пробиотиков - бифидобактерий, лактобацилл, энтеробактерий, поскольку промышленные штаммы микроорганизмов вследствие биологической несовместимости не могут войти компонентом в биопленку, и пополняют пул транзиторных бактерий.

Тем не менее, пробиотические препараты применять следует. В содержимом кишечника присутствуют различные симбионты и паразиты - транзиторные бактерии, простейшие, гельминты, роль которых в нормальном функционировании животного организма нельзя недооценивать. Введенные с препаратами пробиотические штаммы, выделяя биологически активные метаболиты, сигнальные вещества, антибиотики, бактериоцины, вступают во взаимодействие с кишечной микрофлорой и оказывают воздействие на функционирование различных физиологических систем организма-хозяина.

1.2. Пробиотические препараты кормового назначения

Современная интенсивная индустрия животноводства, птицеводства и рыбоводства основывается на использовании в качестве обязательных компонентов комбикормов различных биологически активных стимуляторов обмена веществ, пищеварения, иммунитета животных. Для повышения перевариваемости и усвояемости кормов, стимуляции роста и развития животных, повышения неспецифического иммунитета применяются ферментные, пробиотические, пребиотические и

комбинированные ферментно-пробиотические препараты, а также комплексные пробиотические препараты, обогащенные фитоконпонентами [14,48,33,44,975,76, 95, 102,105].

Пробиотики положительно влияют на организм хозяина, способствуют восстановлению пищеварения, биологического статуса, иммунного ответа, повышают эффективность вакцинаций. Применение пробиотиков существенно уменьшает расходы на лечение заболеваний у животных, повышает продуктивность последних и улучшает качество продукции.

Аспекты использования пробиотиков затрагивают широкий круг проблем, связанных с коррекцией кишечного биоценоза, иммунной, гормональной и ферментной систем молодняка и взрослых животных. Кроме того, использование пробиотиков имеет актуальное значение не только для животноводства, но и для здравоохранения в целях: снижения риска заболеваемости людей и повышения экологической безопасности сельскохозяйственной продукции.

Пребиотики – это препараты немикробного происхождения, являющиеся низкомолекулярными углеводами, предназначенные для коррекции микрофлоры хозяина путем создания оптимальных условий для жизнедеятельности и развития существующей (собственной) микрофлоры в организме.

Синбиотики - рациональная комбинация пробиотика и пребиотика. Следует отметить, что многие авторы относят к пробиотикам препараты, состоящие из отдельных структур клеток микробного происхождения, а также метаболиты, органические кислоты и соединения любой природы, способствующие качественному и количественному восстановлению нормальной микрофлоры. Поэтому, выбирая для использования тот или иной пробиотик, необходимо анализировать его состав. Он определяет основные показания к применению и фармакологические свойства [10].

Несмотря на тот факт, что полезные свойства нормальной кишечной микробиоты известны уже более 100 лет, учение о пробиотиках только развивается, и история его становления охватывает не более чем 25-летний период, когда стало известно, что нормальная кишечная микрофлора участвует в поддержании колонизационной резистентности слизистой кишечника и играет немаловажную роль в предупреждении заболеваний человека и животных. Неинфекционные желудочно-кишечные заболевания молодняка животных и птицы распространены повсеместно, развиваются с первых часов жизни животного, сопровождаются тяжелыми токсическими явлениями, характеризуются высокой смертностью, нанося значительный экономический ущерб. Проблема профилактики и лечения желудочно-кишечной патологий у животных и птицы, возбудителями которых являются условно-патогенные кишечные микроорганизмы, имеет не только экономическое, но и социальное значение. Экономические убытки от сальмонеллеза в США оцениваются в 2 млрд долларов, в Канаде 300 млн долларов. В странах СНГ за последние 15 лет заболеваемость людей и птицы сальмонеллезом возросла в 7 раз, при этом этиологическое значение *S. enteridis* в заболевании людей возросло на 30 %, у животных и птицы на 75 %, а индикация возбудителя в продуктах питания увеличилась на 50 % [23]. Предотвратить развитие многих патологий у животных позволяет использование кормов, обогащенных биологически активными кормовыми пробиотическими добавками.

Развитие интенсивных форм животноводства, птицеводства, рыбоводства и последовательное повышение их эффективности требуют решения как технических проблем, так и вопросов кормления и использования полноценных и экономически выгодных кормов для всех видов разводимых животных. Важнейшей задачей является создание и применение в практике таких кормовых смесей, которые бы максимально усваивались организмом для обеспечения его жизненных функций и обладали профилактическими свойствами [6]. Пробиотики считаются

эффективным элементом технологии производства безопасной продукции животноводства и птицеводства [71].

Пробиотики кормового назначения рассматриваются ведущими специалистами как «...часть рационального потенциала животных, поддержания их здоровья и получения продукции высокого качества, безопасной как в бактериальном, так и в химическом отношении» [21].

В кишечнике человека, млекопитающих и птиц обитает более 400 видов микроорганизмов, которые выполняют различные функции. По численности и физиологической значимости преобладают бифидо- и лактобактерии. Лактобактерии - аэротолерантные анаэробы, бифидобактерии - облигатные анаэробы. В норме они заселяют слои, прилежащие к клеткам ворсин в нижних отделах тонкого и в толстом отделах кишечника.

Постоянно, находясь там, они участвуют в при мембранном пищеварении, создают колонизационную резистентность: закрепляясь на поверхности слизистой, препятствуют ее заселению патогенной и условно-патогенной флорой, безвредны. Но "не вредны" не означает "полезны", или способны оказывать лечебный и профилактический эффект. Дело в том, что бифидо- и лактобактерии, так же как и другие микроорганизмы, не все одинаковы. Род бифидобактерии, например, объединяет 24 вида микроорганизмов. Род лактобактерии еще больше. Одни виды обитают только у животных определенных видов, другие у животных многих видов, третьи у животных и человека, четвертые только у человека. Соответственно способность заселять кишечник у человека, животных или птиц различна.

При селекции штаммов для пробиотиков учитывают эти и многие другие биологические свойства. Поэтому физиологическая активность и эффективность разных препаратов зависят от состава штаммов, технологии производства, способов сушки. Иногда в составе пробиотиков, регулирующих кишечное пищеварение, используют энтерококки,

непатогенные эшерихии, другие микроорганизмы. Фармакологическое действие:

- заселяют с первых дней жизни организма животных и птиц нормальной микрофлорой (стимуляция пищеварения, иммунитета, профилактика колибактериоза, сальмонеллеза, других инфекций, вызываемых патогенной и условно-патогенной микрофлорой);

- восстанавливают микробиоценоз и пристеночное пищеварение при инфекционных заболеваниях. Можно использовать одновременно с антибиотиками, если пробиотики включают устойчивые к антибиотикам штаммы (например, лактобифадол). Если штаммы, входящие в препарат, не устойчивы к антибиотикам, то его применяют после антибиотикотерапии для восстановления нормальной микрофлоры. Антагонизм к патогенной флоре проявляется в разной степени у разных препаратов за счет продукции органических кислот, перекисей, низкомолекулярных пептидов. При легких формах диареи иногда достаточно применение пробиотика на фоне ограничения диеты без антибиотиков. Но в промышленном животноводстве и птицеводстве для профилактики распространения инфекции, на наш взгляд, необходима комбинация эффективного антибиотика и пробиотика;

- нормализуют пищеварение при дисбактериозах различной природы, после кормовых отравлений, использования фармакологических препаратов (антибиотиков, антгельминтиков, кокцидиостатиков и др.);

- способствуют повышению иммунитета.

Пробиотики являются неотъемлемым компонентом при организации фармакологического обеспечения в условиях промышленного животноводства и птицеводства. В настоящее время функционируют современные предприятия, использующие новейшие технологии, одновременно восстанавливаются производства с более старым, приобретенным в прошлом оборудованием. Однако во всех случаях отмечают действие факторов, способствующих нарушению нормальной

микрофлоры у животных и птицы. Действие патогенетических факторов быстро приводит к функциональным срывам со стороны различных систем и органов; в условиях крупномасштабного производства с высокой концентрацией поголовья на ограниченных территориях создается необходимость многочисленных вакцинаций, что приводит к высокой антигенной нагрузке; вакцинальный и технологический стрессы резко снижают резистентность, способствуют персистенции условно-патогенной микрофлоры в желудочно-кишечном тракте и других биотопах (легкие, мочеполовые пути, кожный покров); многие живые аттенуированные вакцины (особенно из так называемых горячих штаммов) приводят к прямой колонизации клеток кишечника, респираторной и других систем и к поствакцинальным сдвигам в микрофлоре соответствующих областей; резкое возрастание фармакологической нагрузки на животных и птицу. Вопреки сложившимся стереотипам нарушать микробиоценоз могут не только антибиотики, антгельминтики и кокцидиостатики, но и избыточно назначаемые несбалансированные кормовые добавки; существенное ухудшение экологической ситуации. Корма, воздух, вода могут быть дополнительными источниками токсических веществ, пестицидов, которые нарушают слизистую оболочку различных полостей и прямо влияют на микробиоценоз; широкое распространение кормовых микотоксикозов.

В настоящее время одним из наиболее перспективных направлений в области профилактики болезней птиц, увеличения привесов и сохранности молодняка сельскохозяйственных животных и птицы стало применение препаратов пробиотиков, в состав которых входят различные микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности с лечебной и лечебно – профилактической целью. Живые бактерии, входящие в состав препаратов - пробиотиков являются антагонистами патогенных и условно патогенных клеточных микроорганизмов. С их помощью удается нормализовать состав микрофлоры сложившийся в результате эволюции в

различных экосистемах макроорганизма, в том числе и птиц. В частности устранить проблемы, связанные с широко распространенными дисбактериозами желудочно – кишечного тракта (ЖКТ), приводящими к множеству вторичных заболеваний, в том числе и хронического характера; оптимизировать функционирование стенок ЖКТ, путем устранения не переваренных остатков пищи и избыточного количества слизи, что обеспечивает их транспортные функции. Из экспериментальных данных, полученных в результате использования препаратов – пробиотиков в животноводстве и птицеводстве следует, что препараты этого класса способны стимулировать иммунитет животных и птиц (86, 87), нормализовать микрофлору желудочно-кишечного тракта, усиливать выработку интерферона, способствуют повышению среднесуточного прироста цыплят.

Пробиотики в процессе жизнедеятельности создают наиболее благоприятный баланс желудочно-кишечной микрофлоры, обеспечивая благоприятные условия для утилизации корма и его отдельных элементов.

Термин пробиотики был предложен в 1972 году Ричардом и Паркером для обозначения живых микроорганизмов и продуктов их ферментации, обладающих антагонистической активностью по отношению к патогенной микрофлоре.

Желудочно-кишечный тракт птиц содержит приблизительно 40 разновидностей микроорганизмов. Микрофлора играет важную роль в процессе пищеварения. Бактериальные ферменты способствуют перевариванию белка, липидов и углеводов. Бактерии также синтезируют витамины, необходимые для птиц.

Новорожденные птенцы сельскохозяйственной птицы, в отличие от млекопитающих, не получают тех жизненно необходимых питательных элементов, иммуностимулирующих веществ, которые содержатся в материнском молоке. Поэтому птенцы ещё более уязвимы к различным

заболеваниям, инфекциям и неблагоприятным факторам окружающей среды, чем млекопитающие.

Основное место среди причин отхода молодняка стали занимать заболевания, связанные с нарушением деятельности желудочно-кишечного тракта, возбудителями которых является условно-патогенная микрофлора. В промышленном птицеводстве участились вспышки заболеваний колибактериозом, кампилобактериозом. Возрос риск контаминации мяса и яйца птицы патогенными для человека штаммами сальмонелл.

Вместе с интенсивными технологиями в птицеводство пришли антибиотики, которые вначале применялись только с лечебной целью, но в последующем антибиотики стали применять с первых дней жизни с профилактической целью. С появлением кормовых антибиотиков их стали применять во многих хозяйствах повседневно с пищевым рационом птиц.

В последние годы отношение к антибиотикам изменилось, т. к. обнаружилось их негативные последствия. Антибиотики могут накапливаться в пищевых продуктах, яйцах, мясе, а затем и в организме людей, потребляющих эти продукты. Широкое использование антибиотиков способствовало появлению резистентных форм патогенных микроорганизмов. Заболевания вызванные устойчивыми формами бактерий трудно поддаются лечению, требуют больших денежных затрат и вызывают другие негативные последствия.

Мы являемся свидетелями того, как ширится движение за производство и потребление экологически чистых продуктов.

С тем чтобы уменьшить отрицательное влияние патогенной микрофлоры, которая попадает в желудочно-кишечный тракт птицы с кормами, рекомендуется с первых дней жизни цыплят заселять его молочнокислыми бактериями. В течение ряда столетий для этих целей использовалась молочная сыворотка. В настоящее время созданы специальные препараты на основе молочнокислых бактерий и разработаны

технологии получения готовых продуктов непосредственно на птицефабриках.

1.3. Использование пробиотических препаратов в промышленном птицеводстве

В условиях промышленного птицеводства при интенсивном использовании птицы необходимо учитывать физиологическое состояние организма, резистентность органов и тканей, их устойчивость к различным воздействиям. Эти факторы являются основой для сохранения здоровья и продуктивности птицы. Для увеличения жизнеспособности молодняка сельскохозяйственной птицы применяют различные биологические активные вещества. Особого внимания заслуживают пробиотики [1].

Как самостоятельный термин «пробиотик» был использован в 1965 году Lilly and Stillwell для обозначения метаболитов, продуцируемых одними микроорганизмами для стимулирования роста других. В 1989 году Fuller, подчеркивая микробное происхождение, так определил понятие «пробиотики» - это живые микроорганизмы, позитивно влияющие на организм, вследствие улучшения функции его нормальной микрофлоры [94].

Пробиотики содержат микроорганизмы, которые имеют множество положительных свойств. Так, при добавлении их в корм они стабилизируют пищеварительную систему, уничтожают болезнетворные бактерии, являющиеся причиной заболеваний, секретируют специальные ферменты, позволяющие птице лучше усваивать питательные вещества. Особенное значение они играют в первые дни жизни молодняка, когда происходит заселение кишечника микрофлорой [8].

Спектр применения пробиотиков в промышленном птицеводстве достаточно широк, о чем свидетельствуют многочисленные результаты

научных исследований. Так, установлена эффективность использования пробиотического препарата Моноспорин при выращивании цыплят-бройлеров. Включение данного пробиотика в рацион способствует повышению прироста живой массы и сохранности птицы. При убойе и анатомической разделке туш отмечается больший выход грудных мышц и меньшее содержание подкожного жира в тушках [30].

Результаты исследований использования пробиотиков Бацелл и Пролам на цыплятах кросса Shaver показывают, что их включение в состав комбикорма способствует повышению сохранности поголовья до 97-98% и снижению себестоимости прироста на 8-10% [47].

Установлено положительное влияние введения в рацион цыплят-бройлеров пробиотика Энтероспорин, который способствует повышению предубойной массы птицы на 9,4%, массы потрошеной тушки на 17,1%, при повышении сохранности поголовья на 1,9% и среднесуточных приростов на 2,7% [20].

Проведенные исследования оценки продуктивности и качества мяса бройлеров кросса «СК Русь 8», выращенных с использованием пробиотиков Бацелл, Моноспорин и Пролам, показывают сравнительно более высокие значения по сравнению с контролем по показателям выхода мяса в потрошеном виде, который составил в среднем 73,2%, выхода всех мышц – 65,5%, выхода съедобных частей – 81,0% [53].

Введение пробиотика Глаукорина в дозе 2,5 кг на 1 т комбикорма способствует, по данным ВНИТИП, увеличению живой массы бройлеров на 2,6-7,6%, при 100 %-ной сохранности, а также снижению затрат корма на 2,8% [28].

По результатам исследований применения пробиотика Бифидум СКЖ при выращивании ремонтного молодняка яичной птицы установлено, что его использование позволяет обеспечить повышение сохранности поголовья на 1,2% при снижении затрат на ветеринарные

препараты на 23%, а выход деловой молодки достигает при этом 94,5% [52].

Отмечены положительные результаты применения пробиотика Субтилис в условиях Суворовской птицефабрики, выражающиеся в повышении сохранности птицы до уровня 99,8% [16].

Установлено положительное влияние на сохранность цыплят-бройлеров и переваримость питательных веществ корма включение в состав комбикорма пробиотика Микроцикол. Использование препарата способствует повышению сохранности цыплят на 2,9%, увеличению живой массы на 4,4%, при снижении затрат корма на единицу прироста на 6,1% [28].

Результаты исследования эффективности дрожжевого пробиотического препарата Агримос в комбикормах для бройлеров также показывают положительные результаты, подтверждающиеся увеличением сохранности на 5% и живой массы на 4,8-5,1%, что указывает на практическую целесообразность его использования [15].

Эффективно использование и пробиотика Целлобактерина. Его включение в состав комбикорма при выращивании птицы способствует повышению сохранности, увеличению живой массы, снижению затрат кормов на 6,3-7,2% [28].

Результаты исследований Волковой Е. и Сенько А. показывают, что совместное использование пробиотика Веткор и витаминного препарата Витанель оказывает положительное влияние на гематологические показатели, сохранность и рост индюшат. Установлено, что включение в рацион индюшат пробиотика Веткор и препарата Витанель повышает эффективность выращивания индюшат на мясо [12].

Отмечены положительные результаты использования пробиотиков и в промышленном утководстве. Так, включение в комбикорм пробиотика Витафорт оказывает положительное влияние на рост и

развитие утят, при сравнительно более высоких показателях, характеризующих мясные качества тушек птицы [13].

Исходя из вышеизложенного, следует, что пробиотические препараты можно применять с первых дней жизни в течение всего технологического цикла выращивания птицы. Это способствует более высокой сохранности молодняка, повышению прироста живой массы, и возможности отказа от применения антибиотиков. Таким образом, применение пробиотиков в птицеводстве является обоснованным и достаточно эффективным.

1.4. Механизм действия пробиотиков

После открытия А.Флемингом пенициллина произошло самое выдающееся событие первой половины нашего столетия — началась эра антибиотиков. Пенициллин стал известен на всех континентах и спас миллионы человеческих жизней. В то же время были пересмотрены методы борьбы и профилактики инфекционных заболеваний животных. Количество бактериальных заболеваний сократилось, уменьшился падеж, стало возможным содержание большого количества животных на ограниченной территории без риска массовых вспышек заболевания. И все казалось бы хорошо, но вдруг выяснилось, что через какой-то промежуток времени эффективность антибиотиков падает. Однако исследователи решили проблему — создали новые препараты, названные антибиотиками второго поколения, — и что же? Процесс снова повторился. Потом были разработаны препараты третьего, а сейчас и четвертого поколения, и каждый раз природа отвечала образованием антибиотико-устойчивых форм патогенных микроорганизмов и снижением эффективности вновь разработанных антибиотиков [48].

Если взять ветеринарную практику, то снижение эффективности ряда антибиотиков в основном оборачивается экономическими потерями. Но, если коснуться медицины, то все гораздо сложнее. Оказывается

антибиотико-устойчивые формы патогенных бактерий могут привести к серьезным последствиям. Механизм этого процесса состоит в следующем: если животные длительное время получают какой либо антибиотик, то образуются резистентные штаммы патогенных бактерий и, если эти бактерии являются патогенными также и для человека, то использование тех же антибиотиков людям будет неэффективно, инфекционные заболевания протекают тяжело, в отдельных случаях возможен летальный исход [20].

Учитывая это, крупные фармацевтические компании (как правило, имеющие отделения по ветеринарии) никогда не предлагают одни и те же препараты как для людей, так и для животных. Но, увы! Обнаружена так называемая перекрестная резистентность, т.е. образование устойчивости к неродственному антибиотику или даже антибиотику из другой группы!

Понимая серьезность комплекса проблем, связанных с небезопасностью применения антибиотиков в сельском хозяйстве и собрав многочисленные научные и практические данные, специальная комиссия Европейского Совета приняла непростое решение о запрете использования 4-х популярных антибиотиков. В настоящее время готовятся решения и по другим препаратам [69].

Пробиотические препараты позволяют улучшить процессы пищеварения, обмен веществ, повысить продуктивность животных и экономические результаты производства, добиться экологической безопасности продуктов. Стадо, отличающееся высокой молочной или мясной продуктивностью, имеет ресурс продуктивности, обусловленный генетически. Нет сомнений, что высокие показатели нельзя обеспечить без качественной кормовой базы. Однако при соблюдении первых двух условий успех не всегда гарантирован. Если молодняк, который вводят в основное стадо в качестве ремонтного, переболел желудочно-кишечными или респираторными болезнями, то его продуктивность в последующем оказывается ниже обусловленной генетически на 30-40%. Поэтому

профилактика болезней молодняка значительно целесообразнее с экономической точки зрения, чем лечение. Наибольший ущерб скотоводству наносят желудочно-кишечные болезни телят, которые во многом обусловлены нарушениями баланса нормальной микрофлоры.

Действует комплекс факторов, которые нарушают баланс нормальной микрофлоры кишечника и снижают ее естественные защитные свойства. Естественно, нельзя отказываться от вакцинаций, дезинфекций, применения антибиотиков, антигельминтиков, кокцидиостатиков при соответствующих показаниях. Например, полный отказ от антибиотиков может привести к распространению инфекции на все поголовье с резким снижением производственных показателей [79].

Но восстановить нормальную микрофлору после их применения необходимо. Для этого предназначены пробиотические препараты. Если слизистая пищеварительного тракта повреждена, эффективное производство невозможно, так как компоненты корма просто не усваиваются. То же относится и к рубцовой микрофлоре у жвачных.

Пробиотики — препараты, которые содержат живые микроорганизмы, относящиеся к нормальной, физиологически и эволюционно обоснованной флоре кишечного тракта, и положительно влияют на организм хозяина [70].

Механизм лечебно-профилактического действия пробиотиков: вскоре после попадания препарата в желудочно-кишечный тракт начинают выделяться биологически активные вещества и функционировать системы микробных клеток, оказывающие как прямое действие на патогенные и условно патогенные микроорганизмы, так и опосредованное — путем активации специфических и неспецифических систем защиты макроорганизма. В этот же период времени бактериальные клетки пробиотика, которые могут рассматриваться как биокатализаторы многих жизненно важных процессов в пищеварительном тракте, активно продуцируют ферменты, аминокислоты, витамины, антибиотические

вещества и другие физиологически активные субстраты, дополняющие комплексное лечебно-профилактическое действие [18,19.17].

Отмечая многообразные механизмы лечебно-профилактического действия препаратов из бацилл, нельзя утверждать, что какие-либо из них являются главными, а какие-то — второстепенными. При различных острых и хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта, регистрируемых у животных, терапевтическое действие в одних случаях может достигаться преимущественно за счет антагонистических свойств бацилл, в других — за счет продуцирования ими ферментов, в третьих — за счет активации защитных реакций [67].

1.5. Биологические эффекты, вызываемые использованием пробиотиков

Последние годы слово пробиотик используется в нескольких различных значениях. Первоначально оно использовалось для описания субстанции продуцируемых одним простейшим, который стимулировал рост других, но несколько позже оно применялось для описания кормовых добавок для животных, оказывающих полезный эффект на животного хозяина и его кишечную микрофлору [16].

Местная кишечная микрофлора, которая стабилизируется в кишечнике, является очень сложной и содержит микроорганизмы, представляющие более 400 различных видов бактерий. Внутри такой сложной системы имеются многие взаимосвязи между различными микроорганизмами, а также между микробами и животными. Однако, микрофлора быстро превращается в очень стабильную популяцию, которая помогает животному в устойчивости к инфекциям [97].

Достижения науки позволяют констатировать, что полезные эффекты пробиотиков могут проявляться через прямое антагонистическое действие против специфических групп микроорганизмов (образование антибактериальных веществ), конкуренция за питательные вещества

и место жизни, изменение микробного метаболизма (увеличение или уменьшение ферментативной активности, стимуляции иммунной системы и др.)

Как было обнаружено, представители рода *Lactobacillus spp.*, и в частности *Lactobacillus acidophilus*, обладают выраженными ингибирующими свойствами против кишечных патогенов. И это специфическое действие обусловлено продукцией таких антибиотиков, как ацидофилин, лактолин и ацидолин. Образующий ацидолин вместе с молочной кислотой обеспечивает высокую антимикробную активность против энтеропатогенных видов *E.coli*, различных сальмонелл, стрептококков, клостридий и других спорообразующих микроорганизмов [37]. Помимо образования специфических антибиотиков, ингибирование патогенов лактобациллами может быть обусловлено продуктами их метаболизма. Они образуют значительные количества уксусной, муравьиной, молочной кислот и перекиси водорода, ингибирующие свойства которых хорошо известны [105].

Другим механизмом предотвращения колонизации кишечника патогенами является конкуренция за места адгезии на поверхности кишечного эпителия. Бактерии, которые растут медленно, но прикрепляются к кишечной стенке, могут колонизировать кишечник, в то время, как неадгезирующие виды компенсируются за счет повышения скорости роста.

Прикрепление обеспечивает микроорганизму устойчивость к вымыванию из кишечника при перистальтических потоках содержимого. Из этого следует, что если пробиотический штамм может оккупировать места адгезии на кишечной стенке, то он приживается в пищеварительном тракте, и наоборот [22].

Исследования показали, что принцип является правильным. Если поросят обрабатывали непатогенным штаммом *E.coli* K-88, то они были более резистентными к инфекции, чем контрольные животные.

Обнаружено также, что адгезия *E.coli* может быть предотвращена предобработкой последних фрагментами клеточных стенок или целыми клетками лактобацилл [31,82].

При выборе штаммов для приготовления пробиотиков следует, однако, помнить, что адгезия является специфичным для хозяина феноменом, она варьирует между штаммами одного вида и может быть изменена условиями роста и используемыми средами.

Штамм *Euterococcus faecium* (вид, часто используемый в пробиотических препаратах), установленный как моноассоциат у безмикробной мыши, способен снижать количество *S.tuphimurium* в селезенке, что указывает на его системное действие. Обнаружено, что при скармливание безмикробным мышам йогурта, в их крови увеличивается уровень антител, а лактобациллы вовлекаются в стимуляцию фагоцитарной активности. При этом особенно активной была культура *L.casei*, когда вводилась мышам через рот.

Лактобациллы способны мигрировать из кишечника в системную циркуляцию и могут много дней выживать в селезенке, печени и легких. *L.casei* и *L.plantarum*, вводимые парентерально, стимулируют фагоцитарную активность, а при даче *L.plantarum* увеличивается природная киллерная клеточная активность. Пробиотики имеют потенциал не только в балансирующем действии на кишечную флору, но и влияют на патогенез заболеваний, которые встречаются в тканях, удаленных от пищеварительного тракта [37].

Доказано, что различные виды лактобацилл, обитающих в пищеварительном тракте, деконъюгируют таурохолевую и гликохолевую кислоты. Такая деканьюгационная активность обычно проявляется у организмов в анаэробных условиях, и она становится важной по отношению к уровню холестерина в сыворотке крови потому, что деканьюгированные желчные кислоты обеспечивают меньшее всасывание липидов из кишечного тракта, чем коньюгированные. Это может

приводить к уменьшению всасывания холестерина из кишечника и таким образом влиять на уровни холестерина в крови [48.78].

Таким образом, выше приведенные данные свидетельствуют, что пробиотики оказывают многообразное действие как на микрофлору желудочно-кишечного тракта, так и на обменные функции организма животных, а пробиотический эффект различных бактерий определяется суммой специфических активностей, которыми эти организмы обладают.

Молочно-кислые бактерии, например, оказывают полезное действие посредством образуемых антибиотиков, продукции органических кислот и изменения величины рН, образования перекиси водорода, снижения окислительно-восстановительного потенциала среды, конкуренции за места адгезии, питательные вещества и другие эффекты [59].

Бактерии других систематических групп, и в частности рубцовые виды, могут продуцировать биологически активные вещества, необходимые для роста других бактерий, утилизировать вредные продукты обмена и, таким образом, поддерживать экологическое равновесие в пищеварительном тракте. Поэтому наиболее перспективными, хотя и технологически более сложными, могут быть пробиотические препараты, которые состоят из бактерий различных видов (микробный консорциум), находящиеся в синтрофных взаимоотношениях. При этом, однако, не исключается использование отдельных видов бактерий, обладающих необходимыми свойствами или улучшенных генно-инженерными методами [59].

По данным Подобед Л. И. (2009), с целью нормализации формирования микробиологического статуса желудочно-кишечного тракта в первую неделю жизни цыплятам необходимо вводить в корм надёжные пробиотики.

Наилучшим эффектом обладают «Моноспорин» и Лактин К. Согласно профилактической схеме, «Моноспорин» вводят с 1 по 9 день жизни птицы в дозе 2,5% на тонну комбикорма. Такая добавка подавляет

патогенную микрофлору, стабилизирует рост и развитие молочнокислых бактерий. Благодаря быстрому формированию нормального микробиологического статуса улучшается аппетит, повышается поедаемость корма. Параллельно с этим за счёт быстрого нарастания активности гидролитических ферментов увеличивается переваримость питательных веществ и восстанавливается график роста птицы. «Моноспорин» увеличивает напряжённость иммунитета и снижает отрицательную реакцию птицы на плановые вакцинации и ветообработки [46]/

По данным Лебедевой И. и др. (2009), пробиотический препарат «Моноспорин», основу которого составляют спорообразующие аэробные бактерии *B.subtilis*, рекомендуется использовать при иммунодефиците и смешанных желудочно-кишечных заболеваниях. При выпаивании «Моноспорины» после применения антибиотика начиная с 6-го дня жизни в течение 10 дней из расчёта 3 мл на 100 голов в опытной группе, при сравнении гистологических срезов бursы у цыплят контрольной и опытной групп выявлены различия. У курочек контрольной группы границы коркового и мозгового вещества фолликулов нечётко контурированы. Фолликулы крупные, просветлённые. Эпителий неравномерный, от истончённого до гипертрофированного. Соединительнотканые прослойки узкие, обозначены нечётко. У курочек опытной группы фолликулы равномерно развиты, границы слоев хорошо очерчены. Корковый слой — компактный, мозговой — разреженный. Соединительнотканые прослойки рельефно отделяют один фолликул от другого. Эпителий равномерно развит, ядра эпителиальных клеток располагаются у базального края, апикальный край чёткий. В мясе курочек опытной группы повышено содержание сухого вещества, остаточного жира, протеина, золы, полноценных аминокислот. Соотношение триптофана и оксипролина также свидетельствует в пользу опытной группы [29].

Ученые Кубанского госагроуниверситета Кощаев А. Г. и Гудзь Г. П. вводили в корма цыплят 0,2% от массы корма «Бацелл» в течение всего периода выращивания, препарат-аналог — 0,1% от массы корма в течение всего периода выращивания, а «Моноспорин» — выпаивали по 3 мл на 100 гол. с 3 по 14 и с 30 по 35 сутки выращивания. Результаты анатомической разделки показали, что птица опытных групп при ранних сроках убоя обладала более высокими мясными качествами. Так выход съедобных частей в тушке петушков и курочек в третьей группе составил в 36 дней 80,05% и 82,43%, а в 39 дней 80,35% и 83,85% соответственно. Выход наиболее ценной части тушки — грудного филе составил у петушков и курочек бройлеров в 36 дней 22,39% и 24,20%, а в 39 дней 23,75% и 25,10% соответственно. Белки мяса цыплят-бройлеров отличаются высоким содержанием аминокислот. Так, по сумме незаменимых и заменимых аминокислот грудные мышцы 36-дневных бройлеров (только петушков) уступали 39-дневным цыплятам. По физическим свойствам мяса (сочность и нежность) бройлеров в 38-, 39-дневного возраста практически не уступало мясу цыплят 36-дневного возраста. Сочность мяса была достаточно высокой в пределах 62,72–64,00%. Мясо бройлеров в возрасте 36 дней имело нежную консистенцию, особенно отличались ножные мышцы курочек, в которых нежность составила 4,06 мм. Результаты анализов по определению количества тяжелых металлов показали отсутствие ртути в мясе бройлеров, а уровень кадмия, свинца в грудных и ножных мышцах было на порядок ниже ПДК [27].

Украинский ученый Николаенко В. М. (2006), установил положительное влияние пробиотика «Моноспорин» ПК и «Лактин-К» на повышение иммунитета и при экспериментальном сальмонеллезе, колибактериозе и микоплазмозе у цыплят-бройлеров [38].

1.6. Пробиотические препараты на основе спорообразующих бактерий

Способность спорообразующих бактерий оказывать пробиотическое действие привела к разработкам на их основе препаратов, отнесенных к поколению так называемых «самоэлиминирующихся антагонистов» [12]. В итоге на сегодняшний день в мире создано более полусотни таких препаратов, которые полностью или частично составлены на основе спороформирующих бактерий.

В истории этих препаратов имели место некоторые вольности в названии видов и штаммов микроорганизмов, что вносило путаницу при повторном анализе их составов (см. сноску к табл. 1). В этой связи, чтобы избежать дальнейших ошибок, были разработаны положения о современной номенклатуре (List of Bacterial names with Standing in Nomenclature, LBSN) микроорганизмов, которые можно найти на сайте www.bacterio.net [13,90].

Российскими учеными на основе представителей рода *Bacillus* и других спорообразующих микробов заявлены на сегодняшний день около 25 наименований препаратов и часть из них производится для нужд медицины и ветеринарии.

Бактиспорин, представляющий собой лиофилизированные живые бактерии *B. subtilis* штамма №3Н [63], выпускается Государственным институтом кровезаменителей и медпрепаратов (г. Москва) и в ГУП «Иммуннопрепарат» (г. Уфа). Являясь препаратом широкого спектра действия и обладая устойчивостью к ряду антибиотиков, он показан при острых кишечных инфекциях (в том числе дизентерия, сальмонеллез); дисбактериозе кишечника различного генеза (в том числе с аллергодерматозом и пищевой аллергией), бактериальном вагините, а также в

профилактике гнойно-септических осложнений в послеоперационном периоде[77,5].

Споробактерин жидкий и лиофилизированный разрешен для клинического применения приказом №353 МЗ РФ с теми же показателями, что и Бактиспорин [19]. В1 мл жидкой формы препарата содержится 10 млрд. живых микробных тел(споры и палочки) штамма *B. Subtilis* 534, а его производит ООО«Бакорен» из г. Оренбурга[2].

Научно-производственная фирма«Исследовательский центр» и ООО«Соджи» (г. Кольцово, Новосибирск) с 1997 г. выпускает пробиотики серии Ветом, а также Субалин и Коредон . Отличительной особенностью этих препаратов является использование рекомбинантного штамма ВКПМ В-7092 культуры *B. subtilis* с плазмидой рВМВ105, способного продуци-ровать человеческий лейкоцитарный альфа-2-интерферон [7]. Препараты указанной серии успешно применяются для профилактики и лечения диарей, бактериальных, вирусных и паразитарных болезней, для коррекции имму-нодефицитных состояний и улучшения функ-ционирования желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных, домашних и диких жи-вотных(в том числе птицы и пушных зверей), а также для стимуляции роста и развития молод-няка, получения дополнительных привесов животных и т. д. [22].

Препарат медицинского назначения Био-спорин создан в Киевском НИИ микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного (Украина) на основе природных штаммов *B. subtilis* и *B. licheniformis* и производится в Днепропетровском АОО«Днепрофарм» [55, 58]. Биоспорин предназначен для лечения детей и взрослых, страдающих острыми кишечными инфекциями (ОКИ) различных форм тяжести, вызванными патогенными и условно-патогенными микроор-ганизмами, для лиц, перенесших ОКИ, для кор-рекции микрофлоры кишечника при дисбакте-риозах, возникших в результате антибиотикоте-рапии и пр. [58].

ГУДП«Биофаг» и ГУП«Иммунопрепарат» (г. Уфа) выпускают лечебные препараты Вита-спорин и Споровит на основе штаммов *B. subtilis* 11В ВКМ В-2218Д и *B. Subtillis* 12 В, соответственно [43]. Первый из них используется в медицине, второй – для домашних животных, пушных зверей. Для лечения неинфицированных ран, гнойно-некротических процессов, ожогов и дерматитов у животных изготавливается мазь Биосептин, которая содержит споры *B. subtilis* и *B. Licheniformis* [34].

Центром медико-ветеринарных экологических исследований (ЦМВЭИ) совместно с Всероссийским Государственным НИИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов (ВГНКИ) Минсельхоза РФ разработаны пробиотические добавки Интестевит [28.] и Биокорм Пионер [49]. Первый препарат содержит сухие культуры *Bifidobacterium globosum*, *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis*, второй – два штамма *B. subtilis*. Они предназначены для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний у молодняка животных, птиц, для коррекции микробного пейзажа после антибиотико- и химиотерапии, а также для повышения сохранности животных и птицы [17].

Для лечения и профилактики дисбактериозов и аллергий у животных на основе штамма *Bacillus spp.* № ВКПМ В-4401 разработан препарат Бациллоспорин [4]. С такой же целью на основе генетически измененного штамма *B. subtilis* Волгоградским научно-исследовательским противочумным институтом создан лечебнопрофилактический препарат РАС [16].

Фирмой «НИИ Пробиотиков» (г. Москва) на основе *B. subtilis* и *B. Licheniformis* (штаммы депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов Федерального Биологического Центра РАН) разработан и выпускается препарат Субтилис. Он предназначен для профилактики и лечения дисбактериоза у животных, птиц и рыб, диареи, легочных

инфекций, эндо-метритов, острых маститов у крупного рогатого скота, санации мест содержания животных [32].

На основе штаммов *B. subtilis* в Республике Саха(Якутия) был разработан и применяется для коррекции микробиоценоза гениталий у ко-ров пробиотик Сахабактисубтил[36].

Целлобактерин– препарат, сочетающий свойства мощного кормового фермента(способен расщеплять подсолнечный шрот, повышать питательную ценность злаков) и пробиотика, стал продуктом совместной разработки ООО «Биотроф» (г. Санкт-Петербург) и НИИ селькохозяй-ственной микробиологии[26].

Препарат Эндобактерин, созданный на ос-нове штамма535 *Bacillus pulvi-faciens*, показан для профилактики и лечения бактериальных и грибко-вых инфекций у свиней, крупного рога-того скота, овец, коз, пушных зверей, домашних животных и птиц[7], а также мастита у коров [36]. Еще ранее на основе этого вида бацилл был запатентован препарат Ветбактерин, который рекомендовался для профилактики и лечения пневмоний, диспепсий, отежной болезни, маститов у животных[42].

Менее известны комплексные препараты, в состав которых помимо представителей рода *Bacillus* входили другие микроорганизмы. Так, С.Р. Резник и др. [41] описали синергидный эффект препарата Споролакт, полученного ими из смеси двух ранее известных–Бактерина-СЛ(*B. subtilis* 2335, *B. licheniformis* 2336) и Лактобактерина (*Lb. fermentum*). Бактоцеллолактин и Субтикол созданы на основе трех родов бактерий– *B. subtilis*, *Lb. plantarum*, *Ruminococcus albus* и *B. subtilis* 3, *E. coli*М-17, *B. licheniformis* 31, соответственно[5].

1.7. Технология производства пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus*

Во всём мире продолжается работа по созданию новых пробиотиков. Важным арсеналом разработки и совершенствования биопрепаратов являются бактерии рода *Bacillus*. Свойства некоторых штаммов этой группы бактерий настолько разносторонни, что только за последние годы на их основе разработано более десятка эффективных препаратов (табл. 2).

Важнейшими свойствами некоторых штаммов бацилл являются: антагонистическая активность ко многим патогенным и условно патогенным микроорганизмам; высокая ферментативная активность, позволяющая существенно регулировать и стимулировать пищеварения; противоаллергенное и антитоксическое действие и ряд других.

Таблица 2.

Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus*

Препарат	Микроорганизм	Страна-производитель
Медицинские		
Споробактерии	<i>B. subtilis</i>	Россия
Бактиспорин	<i>B. subtilis</i>	Россия
Биоспорин	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>	Украина
Гинеспорин	<i>B. subtilis</i>	Украина
Энтерогермин	<i>B. subtilis</i>	Италия
Флонивин	<i>B. subtilis</i>	Югославия
Бактисубтил	<i>B. subtilis</i>	Франция
Цереобиоген	<i>B. subtilis</i>	Китай
Ветеринарные		
Энтеробактерин	<i>B. subtilis</i>	Россия

Биод-5	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>	Россия
Бактерин-СЛ	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>	Украина
Эндоспорин	<i>B. subtilis</i>	Украина
БПС-44	<i>B. subtilis</i>	Украина
Глоген-8	<i>B. natto</i>	США
Прималас	<i>B. subtilis</i>	Нидерланды
Протексин	<i>B. subtilis</i>	Нидерланды

Биоспорин применяется для коррекции нарушений микрофлоры кишечника человека. Вызванной нерациональным применением антибиотиков, нарушением питания, перенесёнными инфекционными заболеваниями, для профилактики и лечения острых кишечных инфекций. Однако установлено, что спектр показаний для применения пробиотиков в клинической практике может быть существенно расширен. Так, выявлены их позитивные эффекты при лечении ревматоидного артрита, некоторых инфекций мочеполовых путей, гнойно-воспалительных осложнений в хирургической практике, гинекологических заболеваниях инфекционной природы и многих других.

Биод-5 – новый пробиотик ветеринарного назначения, разработанный сотрудниками кафедры биотехнологии МГАВМиБ имени Скрыбина, включает два штамма бацилл - *B. Subtilis* ТПИ 13 и *B. Licheniformis* ТПИ 11.

Препарат предназначен для лечения животных, больных острыми кишечными инфекциями, вызванных сальмонеллами, шигеллами, стафилококками и другими патогенными микроорганизмами, для восстановления нормальной микрофлоры кишечника.

Технология предусматривает отдельное культивирование

B. subtilis ТПИ 13 и *B. Licheniformis* ТПИ 11 и смешивание их после стадии концентрирования в соотношении 3:1.

Одним из перспективных направлений разработки новых биопрепаратов является создание пробиотиков на основе микроорганизмов с заданными свойствами, полученными методами генной инженерии. Первый такой пробиотик медицинского назначения Субалин, наряду с высокой антибактериальной активностью в отношении широкого спектра патогенных микроорганизмов, характеризуется антивирусными свойствами. Этот препарат разработан в Институте микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины совместно с НПО «Вектор» (Россия) и в настоящее время проходит с успехом клинические испытания.



Рис. 2. Схема технологического процесса производства пробиотика

Создание пробиотиков и их широкое применение являются сегодня стратегическим направлением в борьбе со многими инфекционными заболеваниями человека и животных [8].

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследований

Объектом исследований является местный штамм AN16 ssp выделенный из почвы.

2.2. Характеристика спорообразующих

Бактерий рода *Bacillus*

Род *Bacillus*. Этот род, насчитывающий 77 видов [90], объединяет обширную группу строго аэробных или факультативно анаэробных грамположительных хемоорганотрофных микроорганизмов палочковидной формы, образующих термоустойчивые эндоспоры. Типовой вид – *B. subtilis* (Ehremberg) Cohn 1872, 174 [25].

Примечательно, что *B. subtilis* и *B. cereus* стали известны как микроорганизмы, с помощью которых создавали анаэробные условия роста [91].

Особенностью этой группы бактерий является широкий диапазон G+C пар оснований – от 32 до 69 мольн. % [103].

Род *Bacillus* обычно связан с почвой, но его представители также выделяется из воды, пыли и воздуха. Эти бактерии могут вызывать порчу продуктов питания – картошки, хлеба, молока.

Терморезистентные споры бацилл создают проблемы в производстве сухого молока, которые не погибают в процессе обезвоживания и попадают в готовые продукты. Представители *Bacillus* отличаются высоким и разно-образным спектром биологической активности. Часто обладая явным антагонизмом к патогенным микроорганизмам, они продуцируют целый ряд ферментов, лизирующих крахмал, пектины, целлюлозу, жиры, белки, производят различные аминокислоты и антибиотики [57]. На Востоке вошло в традицию использование бацилл при ферментации некоторых продуктов питания. Например, при помощи штамма *Bacillus natto* (*subtilis*) готовят национальное японское блюдо «Натто» – специальным образом ферментированные бобы [92]. В отношении кишечника человека виды *Bacillus* являются

аллохтонными микроорганизмами, которые попадают туда в результате либо случайного поедания, либо осознанного употребления в пищу ферментированных продуктов питания.

Несмотря на то, что представители *Bacillus* в норме не колонизируют кишечный тракт у человека и не являются его обитателями, тем не менее, существует более двух десятков пробиотических препаратов, полученных на основе та-ких видов как *coagulans*, *subtilis*, *clausii*, *cereus*, *toyoi*, *lichemiformis*, *mesentericus*, *polymyxa* и др.

К сожалению, не всегда точно в них указывались названия использо-ванных штаммов. Так, в препарате якобы на основе «*Lactobacillus sporogenes*» фактически находилась культура *Bacillus coagulans*[98]. Такое название спорообразующей бактерии, ошибочно отнесенной к виду *Lactobacillus*, прослеживается с публикации от 1932 г. (цитируется по[99]).

Проверка семи препаратов споровых пробиоти-ков на идентичность названий показала, что только один из них соответствовал заявленному составу[85,93]. Дело в том, что идентификация представителей рода *Bacillus*, изначально осно-ванная на фенотипичных признаках, всегда была недостаточно точна. Но и более прогрессив-ный генетический подход к идентификации на основе последовательности 16 рРНК также оказался перед проблемой неразличимости некото-рых видов [81].

Род *Bacillus* – прямые палочки $0,5-2,5 \times 1,2-10$ мкм, с закругленными или обрубленными концами, часто в парах или цепочках. Грамположительные, подвижные за счет перетрихиальных жгутиков. Эндоспоры овальные или иногда сферические либо цилиндрические, устойчивые ко многим неблагоприятным воздействиям. В клетке образуется не более одной споры. Споруляция не подавляется атмосферным воздухом. Аэробы или факультативные аэробы. Отношение к повышенной температуре, рН и солености сильно варьирует.

Хемоорганотрофы: метаболизм бродильного или дыхательного типа. Обычно каталазоположительные. Обнаружены в различных местах обитания, некоторые виды патогенны для позвоночных и беспозвоночных.

2.3. Определение количества *Bacillus subtilis*

Род *Bacillus subtilis*. Грамположительные, не кислостойчивые, образующие спор, неподвижные бактерии.

Морфологические признаки:

Чрезвычайно вариабельные по внешнему виду палочки. Для свежесвыделенных штаммов характерны прямые или разветвленные палочки, Y- или V- формы, булабовидные или лопатовидные формы.

На морфологию могут влиять условия питания, при пересевах прямые и изогнутые палочки неравномерной ширины могут иметь изломы. Газа не образуют. Глюкоза сбраживается до уксусной и L-(+) молочной кислот. Масляная, пропионовая кислоты и CO₂ не образуются.

Анаэробы, хотя в присутствии CO₂ изредка могут быть толерантными к кислороду. Оптимальная температура роста 36-38⁰С.

Сущность метода

Метод основан на способности *Bacillus subtilis* расти в питательных средах, разлитым высоким столбиком в пробирках при температуре (37±1)⁰С и образовывать в них через 24 – 72 часа гвоздикообразные характерные колонии.

Методика определения

Готовят десятикратные разведения продукта. Причем, перемешивание продукта производят способом, исключая попадание воздуха в пробирку.

Перед посевом разведений, среды в пробирках следует разогреть в кипящей водяной бане до полного расплавления агара и появления на поверхности пузырьков. Далее выдержать их в течение 20 минут, а перед посевом охладить до температуры 45⁰С, погружением в холодную воду.

Из приготовленных разведений исследуемого продукта делают посева по 1,0 см³ в два параллельных ряда пробирок с питательной средой. Для каждого посева (пробирки) берут отдельную пипетку.

Инкубация.

Посевы выдерживают в термостате при температуре (37±1) ⁰С в течение (72±1) часов.

Учет и обработка результатов.

Подсчет количества клеток бифидобактерий в 1 см³ (1г.) продукта производят путем умножения числа выросших колоний на соответствующее разведение.

$$X = \frac{a \times 10^n + a \times 10^{n+1}}{2} \times 10;$$

где: **X** – количество колонеобразующих единиц лактобактерий в 1,0 г исследуемого продукта;

a₁, a₂ – среднее арифметическое значение количества колоний в каждом учитываемом разведении;

10 – поправочный коэффициент на объем исследуемого образца.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение результатов, полученных в двух параллельных посевах.

2.4. Окраска клеток по Граму

Сущность метода заключается в том, что в клетках одних видов микроорганизмов образуется нерастворимое в спирте соединение йода с основным красителем, у других видов это соединение появляется временно и после обработки спиртом растворяется. Первые микроорганизмы называются грамположительными, вторые - грамотрицательными.

- Раздавленная капля.

Сущность метода заключается в определении подвижности клеток.

- Окраска клеток по Трухильо.

Метод применяется для выявления спор бактерий

- Тест на каталазу.

Сущность теста заключается в способности клеток бактерий образовывать в процессе роста фермент каталазу, количество которой различно у разных видов бактерий. Каталаза разлагает перекись водорода на воду и молекулярный водород.

- Отношение к кислороду

Сущность метода заключается в определении типа дыхания у бактерий. Аэробные бактерии растут только на поверхности среды, не залитой парафином; анаэробные бактерии - только на прогретой среде, залитой парафином, а факультативные анаэробы растут на среде в двух пробирках.

- Определение способности бактерий к дыханию и (или) брожению.

Сущность данного метода заключается в изменении pH среды, вследствие способности сбраживать углеводы.

Определение видовой принадлежности бактерий рода *Bacillus*.

- Культуральные признаки

- Характерные признаки колоний - сущность метода заключается в описании колоний 5-7 суточной культуры при росте на МПА.
- Особенности роста в жидкой среде – сущность метода заключается в следующем: рост в жидкой среде сопровождается помутнением среды, образованием пленки, хлопьев или осадка. Для этого используют 5-7 суточную культуру, выросшую на МПБ или глюкозо-пептонной среде.
- Физиолого-биохимические признаки.
- Образование кислоты из глюкозы;
- Образование кислоты из арабинозы, ксилозы, маннита;
- Образование ацетона (реакция Вогес-Проскауэра);
- Гидролиз крахмала – обнаруживают по зоне просветления среды вокруг колонии.
- Гидролиз казеина - выявляют по просветлению среды вокруг штриха;
- Гидролиз желатина – отмечают по его разжижению; учитывают интенсивность и форму разжижения;
- Гидролиз мочевины – выявляют по изменению цвета индикатора: от оранжево-желтого (при рН 6,8-6,9) до малиново-красного (при рН 8,4).
- Восстановление нитратов - о восстановлении нитратов до нитритов судят по положительной реакции на нитриты; о восстановлении нитратов до молекулярного азота свидетельствует пузырёк газа в поплавке. Нитриты определяют качественной реакцией с реактивом Грисса. Эта реакция основана на образовании в кислой среде в присутствии нитритов и ароматических аминов азосоединения, окрашиваемого в красно—розовый цвет.
- Использование органических кислот. Об образовании кислот судят по изменению цвета индикатором – бромтимолового синего до зеленого при рН 6.6-6.8 до синего при рН выше 7.0 или фенолового

красного от оранжево-желтого при рН 6,6-6,8 до малиново-красного при рН 8.4.

- Рост на среде с 7% NaCl. Способность к росту оценивать при появлении пленки или помутнении среды.
- Рост на среде при рН 5.7. О росте судят по появлению пленки и по помутнению среды.
- Отношение к температуре. Оптимальную температуру для роста определяют по интенсивности помутнения среды.

Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оптимизация питательной среды для *Bacillus subtilis*

Основная цель запрета использования кормовых антибиотиков в кормлении птицы состоит в том, чтобы избавиться от содержания в продуктах бактерий, устойчивых к действию антибиотиков.

Поэтому учёные всего мира ищут замену кормовым антибиотикам – стимуляторам роста, используя для этих целей различные биостимуляторы, жирные кислоты, органические кислоты и т.д. [1–4].

Многие из предлагаемых в настоящее время на рынке препараты рекламируют как пробиотики. Они различны по составу, качеству, фармакологической направленности действия, показаниям к применению. В настоящее время в странах с развитым птицеводством на рынок поступает большое количество пробиотиков нового поколения. Определение эффективности применения их в кормлении птицы высокопродуктивных кроссов с интенсивным обменом веществ, а значит, и более требовательных к условиям содержания и кормления, весьма актуально.

В настоящее время многими хозяйствами в состав комбикормов для животных вводятся биопрепараты из живых микробных культур. Это необходимо для того, чтобы улучшить работу желудочно-кишечного тракта животных, повысить усвояемость кормов, и в результате, увеличить продуктивность. Применение пробиотических препаратов позволяет также усилить резистентность организма животных к заболеваниям и повысить эффективность вакцинаций, обеспечивая снижение себестоимости продукции животноводства и птицеводства [35]. основой многих пробиотических препаратов являются спорообразующие бактерии рода *Bacillus*. [45].

Стоимость биопрепаратов во многом зависит от состава питательных сред, применяемых для культивирования микроорганизмов, входящих в состав пробиотиков. Они должны не только полностью обеспечивать бактерии всеми необходимыми питательными веществами для роста и развития, но и в тоже время иметь разумную стоимость. Одним из способов ее снижения является оптимизация питательных сред и использование побочных продуктов переработки растительного сырья.

В связи с вышеизложенным целью наших исследований явилось подбор оптимального состава питательной среды и определение эффективности применения местных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* при выращивании цеплят бройлеров.

В данной работе нами изменялся состав традиционной питательной среды для выращивания *Bacillus subtilis*. Целью проведенных экспериментов являлся подбор оптимальной питательной среды для снижения ее стоимости при неизменной или даже увеличенной активности роста микроорганизмов.

Таблица 3

Рецептура приготовления питательной среды для глубинного культивирования продуцента *Bacillus Subtilis*

Наименование компонентов	Питательные среды	Наименование компонентов	Питательные среды
	Контрольная		Опытная
Шрот подсолнечниковый %	4	Пивная дробина % или пшеничные отруби	4
Глютен, %	3	Кукурузная мука, %	5
NH ₄ H ₂ PO ₄ , %	3	NH ₄ H ₂ PO ₄ , %	4
KCl, %	0,15	KCl, %	0,15

CaCl ₂ , %	0,01	CaCl ₂ , %	0,01
MgSO ₄ , %	0,05	MgSO ₄ , %	0,05

Шрот подсолнечниковый в соотношении 1:1 поочередно заменяли на пивную дробину (побочный продукт пивоваренного производства), и отруби пшеничные (побочный продукт мукомольного производства) Все остальные компоненты среды и параметры выращивания *Bacillus subtilis* оставались неизменными. Кроме того дорогостоящий кукурузный глютен заменяли на более дешевую кукурузную муку.

В исследуемых объектах были определены основные характеристики, такие, как органолептические свойства, массовые доли сырого протеина, жира, крахмал и др.

Результаты анализов химического состава подсолнечного шрота, пшеничных отрубей и пивных дробин приведены на рис. 2.

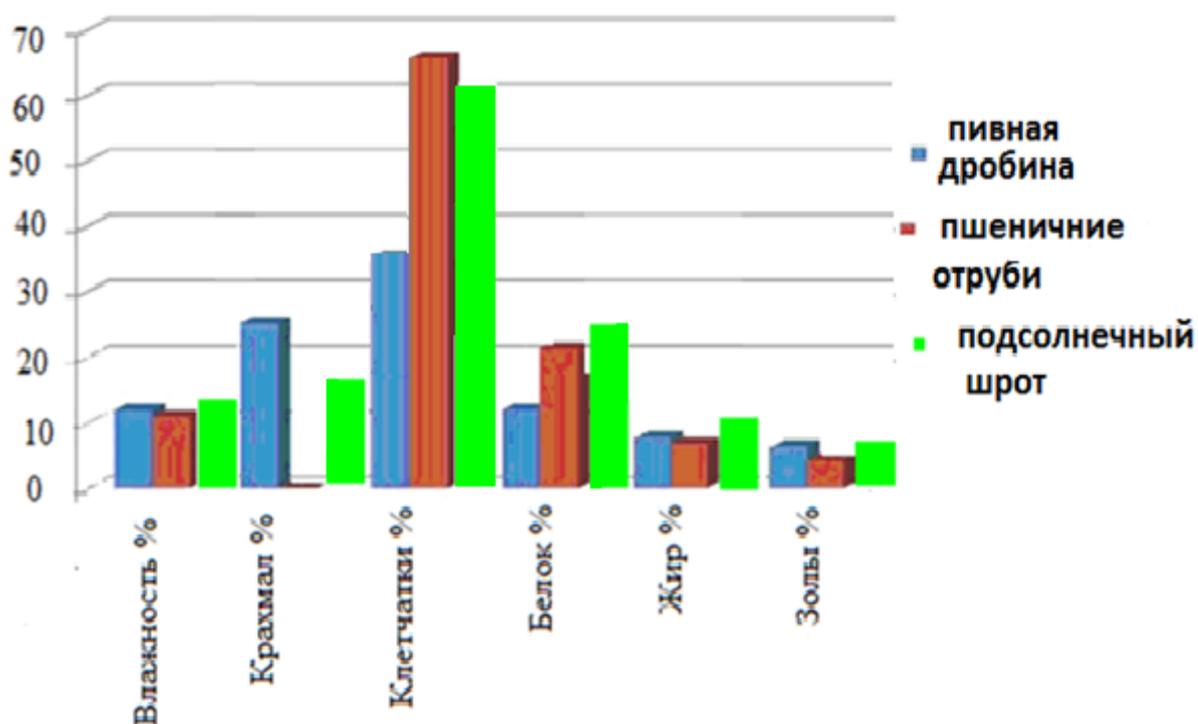


Рис.2. Диаграмма сравнения химического состава пшеничных отрубей,

пивных дробин и подсолнечного шрота

Согласно полученным данным видно, что пивные дробинки и пшеничные отруби не уступят подсолнечным шротам по содержанию клетчатки, белка и золы. Это свидетельствует о возможности использования пивных дробин и пшеничные отруби в качестве добавок к питательной среде для поверхностного культивирования с целью экономии сырья и придания рыхлости среде.

Для приготовления питательной среды для *Bacillus Subtilis* данные компоненты смешивают с водой и стерилизуют при 0,5 атм с продолжительностью 60 минут. Среду охлаждают до температуры 37 °С и проводят засев маточных культур (5-6млд клет/мл) в количестве 1мл/100 мл. рН питательной среды корректируют с помощью Na₂CO₃ от исходного значения 5,8 до оптимального 6,9 для *Bacillus Subtilis*. Достижение значения рН в процессе культивирования 5,5- 5,6 свидетельствует об окончании ферментации.

Bacillus subtilis выращивали в жидкой среде, в конических колбах объемом 200 мл, в течении 48 ч, в термостате при температуре 40°С, на качалках при скорости 180 об/мин. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл культуры *Bacillus subtilis* определяли каждые 2 часа в течение всего времени культивирования [3. Методы общей бактериологии. В 3-х томах/ Под ред. Ф. Герхардта [и др.] // М., «Мир». – 1983 - 1984. Т. 1. - С 458-464.]. В качестве контрольной группы использовали микроорганизмы, выращенные на традиционной питательной среде.

При замене в питательной среде для *Bacillus subtilis* глютена на кукурузную муку количество микроорганизмов в 1 мл на момент начала фазы стационарного роста (28 ч) КОЕ/мл увеличивается на 2,6 %.

Замена подсолнечникового шрота на пивную дробину значительно повышает интенсивность роста *Bacillus subtilis*. Так, с применением глютена в начале стационарной фазы роста (28 ч) КОЕ/мл больше на 20 %и при замене глютена на кукурузную муку на 26 %

В то время, как интенсивность роста в группах в которых шрот подсолнечниковый был заменен на пшеничные отруби, была ниже, чем в контрольной группе бактерий.

При замене в питательной среде растительных субстратов цены варьируют незначительно от - 0,8 до 3,25 %. Однако при замене глютена на кукурузную муку стоимость питательной среды можно снизить в среднем на 27 %

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что замена подсолнечникового шрота на пшеничные отруби нецелесообразна, поскольку в перечисленных вариантах значение КОЕ/мл *Bacillus subtilis*не превышает такового в традиционной питательной среде. Однако необходимо отметить, что замена в вышеперечисленных вариантах питательных сред глютена на кукурузную муку позволяет не только повысить КОЕ/мл *Bacillus subtilis*(в среднем на 0,24 единицы) но и значительно (до 27%) снизить стоимость питательной среды.

Необходимо отдельно отметить результаты полученные при замене подсолнечникового шрота в питательной среде пивной дробине. В этом случае значение КОЕ/мл *Bacillus subtilis* с применением глютена на момент выхода на стационарную фазу роста (28 ч) больше на 20 %, а при замене глютена на кукурузную муку КОЕ/мл *Bacillus subtilis* выше на 26%, а стоимость 1 кг питательной среды снижается на 28 % по сравнению с контрольной группой.

3.2. Влияние бактерий *Bacillus subtilis* на рост, развитие и сохранность цыплят-бройлеров

В промышленном птицеводстве для профилактики заболеваний, сохранности птицы, повышения их продуктивности проводят вакцинации, дегельминтизации, часто применяют антибиотики и другие химиопрепараты. Большинство из них оказывает отрицательное влияние на организм птицы, часто вызывая дисбактериозы. Применение антибиотиков существенно нарушает микробаланс в кишечнике молодняка животных и птицы.

С целью обеспечения экологической безопасности продуктов питания во многих странах запрещено применение антибиотиков при выращивании сельскохозяйственных животных и получении продукции животноводства. Поэтому во всем мире, идет активная разработка и внедрение безопасных, эффективных пробиотических препаратов, как альтернативы антибиотикам.

Пробиотики на основе штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, эффективно применяют в животноводстве для профилактики и лечения дисбактериозов, болезней органов дыхания, воспроизводства, гнойно-некротических ран, микотоксикозов и повышения иммунобиологической реактивности организма животных.

Селекция по признакам высокой продуктивности, плодовитости и скороспелости современного поголовья сельскохозяйственной птицы привела к понижению естественной резистентности организма. Низкий уровень иммунологической реактивности и естественной резистентности организма является одной из основных причин снижения жизнеспособности и продуктивности птиц.

Особо восприимчивыми к различным стрессам являются высокопродуктивные и быстрорастущие цыплята-бройлеры современных кроссов, срок выращивания которых сократился до 35-42 дней, а живая

масса с суточного возраста увеличилась в 50-55 раз. Они успевают пройти стадию роста, но не стадию развития. Несформированная иммунная и ферментативная системы делают их высокочувствительными к бактериальным и вирусным агентам [48].

По литературным данным известно, что первое место в промышленном птицеводстве занимают желудочно-кишечные заболевания (более 50 %), которые являются основной причиной гибели молодняка птицы. Среди желудочно-кишечных заболеваний основными являются колибактериоз, возбудитель которого, как правило, обладает множественной лекарственной устойчивостью.

В научно-производственной практике массовый характер заболеваний связывают с особенностями промышленной технологии выращивания птицы, а их причину - с глубокими изменениями кишечной микроэкологии, которые выражаются увеличением численности представителей условно-патогенной микрофлоры при одновременной элиминации из кишечника бифидо и лактобактерий.

Для увеличения жизнеспособности молодняка сельскохозяйственной птицы с лечебно-профилактической целью применяют биологически активные вещества - пробиотики.

В настоящее время механизм действия пробиотиков является предметом изучения многих ученых в нашей стране и за рубежом. Установлено, что микроорганизмы, входящие в состав препаратов-пробиотиков, способны оказывать влияние на организм на системном уровне, активизировать неспецифическую резистентность организма, что приводит к повышению устойчивости молодняка и взрослой птицы к инфекционным заболеваниям.

Таким образом, поиск пробиотиков, способных оказывать комплексное воздействие на организм птицы, а также разработка

эффективных схем их применения являются актуальными для решения основных проблем птицеводства.

Целью этого опыта было изучения влияния бактерий *Bacillus Subtilis* на рост, развитие и сохранность цыплят-бройлеров

В контрольной группе пробиотики не использовались.

Опыты проводились на здоровых цыплятах-бройлерах. Цыплят опытных и контрольной групп содержали в клеточных батареях. Питательность комбикормов для всех была одинаковой, в рацион опытных групп вводили бифидобактерии.

Пробиотик содержит живые бактерии «*Bacillus Subtilis*», которые способствуют пристеночному пищеварению и усвояемости корма и таким образом в целом улучшают деятельность желудочно-кишечного тракта. Бифидобактерии образуют защитный слой на слизистой кишечника, препятствуя проникновению в кровотоки эндотоксинов.

Были проведены исследования по влиянию бактерий «*Bacillus Subtilis*» на жизнеспособность, рост и развитие цыплят бройлеров кросса «ИСА-15». Для этого были сформированы две группы по принципу аналогов по 80 голов в каждой.

Цыплята контрольной группы получали основной рацион без пробиотиков. В опытной группе использовался бактерии «*Bacillus Subtilis*» из расчета 1 г на 1 кг живой массы однократно перед первым кормлением в течении первых 7 суток выращивания в соответствии с инструкцией по применению (табл. 4).

Схема проведения исследований

Группы	Количество цыплят, гол.	Испытуемые факторы
Контрольная	80	основной рацион без пробиотиков
Опытная	80	основной рацион + бактерии «Bacillus Subtilis» однократно в течении 7 суток с кормом

При проведении опыта учитывались следующие показатели:

- сохранность птицы и падеж – учитывались и определялись ежедневно;
- живая масса – путем индивидуального взвешивания в суточном и еженедельном возрасте;

Сохранность птицы по периодам выращивания

Возрастные периоды, дней	Группы					
	контрольная			опытная		
	поголовье на начало периода	пало, гол	% сохранности	поголовье на начало периода	пало, гол	% сохранности
1-7	80	4	95	80	3	96,2
8-14	76	3	96	77	1	98,7
15-21	73	2	97,2	76	1	98,6
22-28	71	1	98,6	75	-	100
29-35	70	1	98,5	75	-	100
36-42	69	-	100	75	-	100
1-42	69	11	86,2	75	5	93,7

- прирост живой массы – рассчитывался на основании данных живой массы по периодам выращивания, путем определения абсолютного и относительного приростов;

Пробиотик *Bacillus Subtilis* способствовал нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта и повышению иммунологической реактивности птицы (табл. 5)

Данные таблицы 3.2. свидетельствуют о том что в период с 1-го по 7 день сохранность в опытной группе была на 1,2%, выше, чем в контрольной группе. Основной падеж в контрольной и опытных группах наблюдался в первую неделю выращивания.

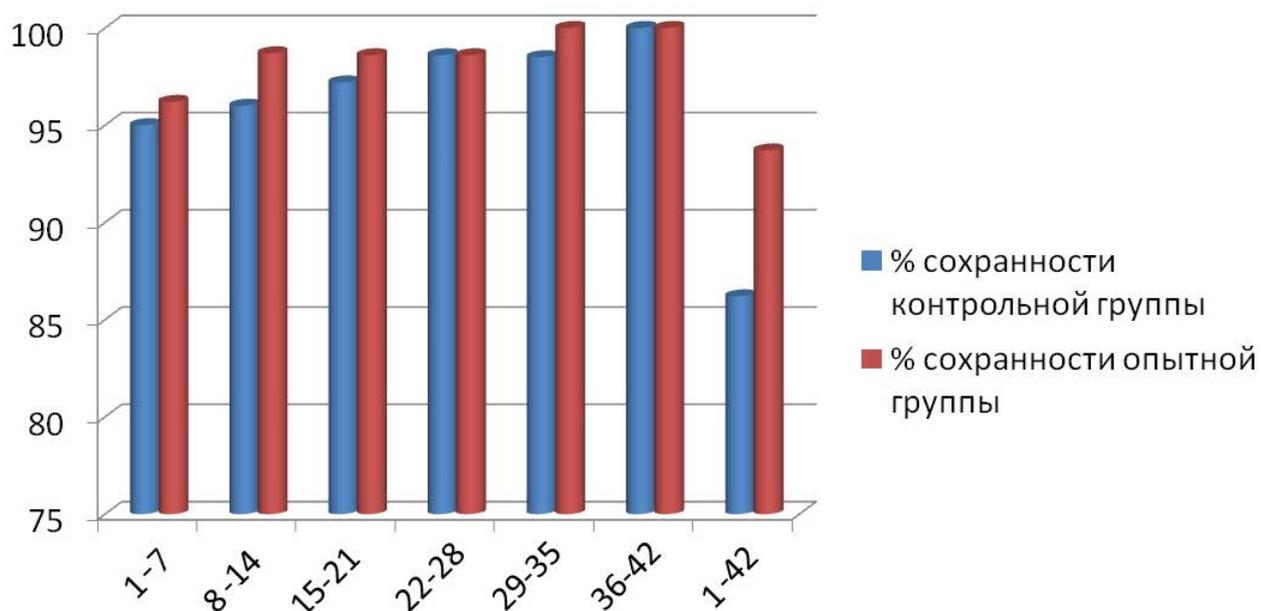


Рис.3. Динамика показателей сохранность птицы по периодам выращивания

В период с 8-го по 14-й день опыта средняя сохранность цыплят, по сравнению с контрольной, увеличилась в опытной группе на 2,7.

В период с 15-го по 21-й день опыта средняя сохранность цыплят опытной на 1,4 % больше чем у контрольный.

В период с 22-го по 28-й день опыта средняя сохранность цыплят в опытной группе, по сравнению с контрольной группой больше на 2,4%.

В период с 29-го по 35-й день опыта средняя сохранность цыплят в опытной группе, по сравнению с контрольной группой больше на 2,5%.

В период с 28-го по 35-й день опыта средняя сохранность цыплят в опытной группе, по сравнению с контрольной группой больше на 2,5%.

В период с 36-го по 42-й день опыта по сохранности результаты свидетельствуют что у обеих групп цыпляти почти сохранились все .

Одним из показателей, характеризующих безвредность применения любого препарата, является живая масса (табл. 3).

Таблица 6

Динамика живой массы цыплят бройлеров

Возраст цыплят, дней	Группы	
	Контрольная г.	опытная г.
1	42,4±0,3	42,4±0,4
7	136±2,4	143±1,2
14	308±3,0	322±2,5
21	598±4,3	614±4,1
28	942±8,3	996±5,0
35	1340±10,1	1400±8,1
42	1751±17,0	1836±11,9

Данные таблицы 3.1 свидетельствуют о том, что в период с 1-го по 7-й день опыты средняя масса цыплят опытной группына, по сравнению с контрольной группой, больше на 7 г.

В период с 7-го по 14-й день опыта средняя масса цыплят, по сравнению с контрольной, больше на 14г.

В период с 14-го по 21-й день опыта средняя масса цыплят опытной группы, по сравнению с контролем больше , на 16г

В период с 21-го по 28-й день опыта средняя масса цыплят в опытной группе, по сравнению с контрольной группой увеличилась на 54 г.

Динамика живой массы цыплят бройлеров



Рис.4. Динамика живой массы цыплят бройлеров

В период с 28-го по 35-й день опыта средняя масса цыплят в опытной группе по сравнению с контрольной группой на 60 г больше.

В опытной группы 35-й день опыта средняя масса цыплят увеличилась по сравнению с контрольной больше на 60 г.

В период с 35-го по 42-й день опыта средняя масса цыплят в опытной группы увеличилась, по сравнению с контрольной группой, соответственно на 0,05% и 0,02%. на 85 г

В 1-ой, 2-ой опытных и контрольной группе на 35-й день опыта средняя масса цыплят увеличилась соответственно на 34,5%, 34,4% и 34,3%, по сравнению с их живой массой на 35-й день опыта.

Нормализация физиологических процессов в организме цыплят под влиянием пробиотика «Bacillus Subtilis» отразилась на их росте и развитии.

Контрольное взвешивание цыплят проводилось еженедельно с суточного до 42-х дневного возраста. В результате проведенных исследований установлено позитивное влияние препарата на интенсивность роста бройлеров. Полученные данные свидетельствуют, что уже в 7-ми дневном возрасте живая масса в опытной группе была выше на

Под влиянием пробиотического препарата произошли как качественные отклонения, проявившиеся в изменении живой массы, так и количественные. Убойный выход в опытной группе увеличился на 1%, выход съедобных частей был выше на 140,4 г или 1,6%, коэффициенты съедобных частей к несъедобным и отношение массы мышц к массе костей в опытной и контрольной группах различались незначительно, но можно отметить, что стимулирующее воздействие пробиотика улучшило мясную продуктивность бройлеров.

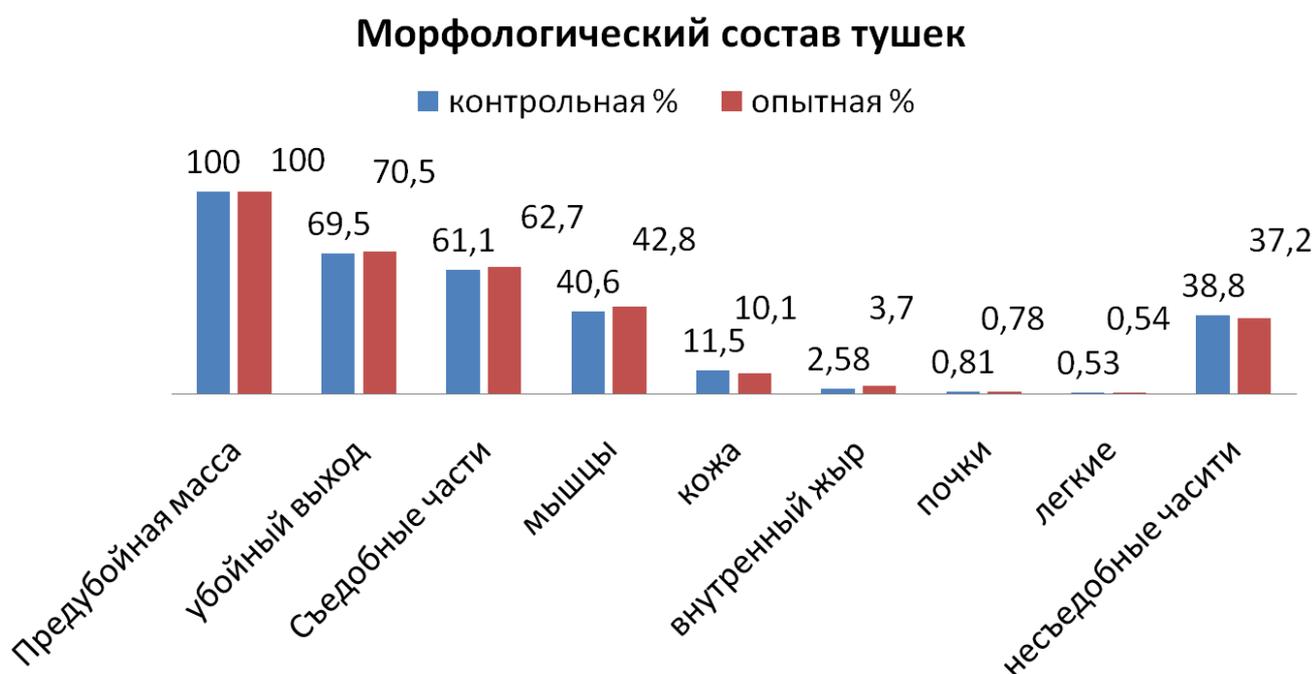


Рис.5. Динамика показателя морфологический состава тушек

Исходя из вышеизложенного, следует, что пробиотические препараты можно применять с первых дней жизни в течение всего технологического цикла выращивания птицы. Это способствует более

высокой сохранности молодняка, повышению прироста живой массы, и возможности отказа от применения антибиотиков.

Таким образом, применение пробиотиков в птицеводстве является обоснованным и достаточно эффективным. Действие пробиотиков в одних случаях может достигаться преимущественно за счет антагонистических свойств микробов, в других - за счет продукции ими ферментов и других биологически активных веществ, в третьих - за счет активации защитных реакций организма. Таким образом, в условиях интенсификации производства большее значение приобретают вопросы кормления, поскольку именно они определяют качество и рентабельность конечного продукта. Нарушение баланса микрофлоры пищеварительного тракта ведет к уменьшению всасывания питательных веществ, раздражению кишечных стенок и снижению переваримости корма. В связи с этим, в питании птицы необходимо использование пробиотиков, так как именно они способны оптимизировать кишечную микрофлору и, как следствие, повышение уровня продуктивности.

ВЫВОДЫ

Анализ и обобщение результатов, проведенных научных опытов и физиологических исследований с использованием бактерий *Bacillus subtilis* позволяют сделать следующие выводы:

1. В наших исследованиях установлено, что мясную продуктивность птицы, сохранность поголовья и эффективность использования комбикормов можно повысить путем добавок в комбикорма для бройлеров бактерий *Bacillus subtilis*.

2. При замене в питательной среде для *Bacillus subtilis* глютена на кукурузную муку количество микроорганизмов увеличивается на 2,6 %, стоимость питательной среды можно снизить в среднем на 27 %, Замена подсолнечникового шрота на пивную дробину и глютена на кукурузную муку на 26 %.

3. Применение кормовой биодобавки бактерии *Bacillus Subtilis* повышает сохранность цыплят на 7,5 %, выше, чем в сравнении с контрольной группой, что объясняется повышением естественной резистентности организма цыплят.

4. Скармливание биологически активных кормовых добавок *Bacillus subtilis* цыплятам до 42-дневного возраста позволяет повысить убойный выход птицы, соответственно, на 0,9 и 1,9% и содержание мышечной ткани в тушках – на 3,69 и 4,08% в сравнении с цыплятами контрольной группы.

5. Включение в состав рационов цыплят бактерий *Bacillus subtilis* способствует повышению среднесуточных приростов. Сохранность в опытной группе была на 7,5 %, выше, чем в контрольной группе. что позволяет выращивать к 42-дневному возрасту цыплят-бройлеров живой массой 1836-1900 г., при 1750 г. – в контрольной группе.

6. Стимулирующее воздействие бактерий *Bacillus subtilis* улучшило мясную продуктивность бройлеров. Убойный выход в опытной группе увеличился на 1%, выход съедобных частей был выше на 140,4 г или 1,6%.

7. Бактерии *Bacillus Subtilis* способствовал нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта и повышению иммунологической реактивности птицы. При контрольное взвешивании цыплят еженедельно с суточного до 42-2х дневного возраста установлено позитивное влияние препарата на интенсивность роста бройлеров.

8. Среднесуточный прирост цыплят опытной группы по сравнению с аналогами из контроля был выше на протяжении всего периода выращивания. Наиболее высокая разница в приросте была в опытной группе с 22 по 28 сутки - 10,4%.

Список использованной литературы

1. Аказеева, О.И. Физиологическое состояние и продуктивность птицы при использовании пробиотика коредон в условиях промышленного содержания: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.13; 06.02.04 / О.И. Аказеева.- Чебоксары, 2007.- 23 с.
2. Алешкин, А.В., Афанасьев, С.С., Давыдкин, В.Ю., Манько, Т.Н., Давыдкин, И.Ю. Бактерийный препарат нового поколения «Споробактерин» // Мед. кар-тотека. – 2003. – №4.
3. Антипов А. А. и др. Эффективность применения пробиотика Olin при выращивании цыплят-бройлеров/ А. А. Антипов. В. И. Фисинин. И. А. Егоров// Зоотехния. 2011. - № 1. - С. 18-19.
4. А. с. 4465884/13 СССР, МПК1710575 А1, С12N1/20, А61 К 35/74. Штамм бактерий *Bacillus* sp.– компонент лечебно-профилактического препарата против дисбактериозов и аллергий. – Оpubл. 07.02.92, Бюл. №5.
5. Бакулина, Л.Ф., Перминова, Н.Г., Тимофеев, И.В. и др. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии// Биотехнология. – 2001. – №2. – С.
6. Башкиров О.Г. «Биоплюс 2Б» в современном высокоэффективном птицеводстве // Био. – 2002. – №11. – С. 6–8.
7. Белявская, В.А., Кашперова, Т.А., Бондаренко, В.М. и др. Экспериментальная оценка биобезопасности генно-инженерных бактерий на модели штамма *Ba-cillus subtilis*, продуцирующего интерферон// Ж. микробиол. – 2001. – №2. – С. 16–20.
8. Берсенева, Е.В. Морфофункциональные изменения в организме цыплят-бройлеров при применении пробиотика«Биоспорин»: автореф. дисс. ... канд. вет. наук: 16.00.02 / Е.В.Берсенева. – Екатеринбург, 2004. - 19 с.
9. Биопрепараты в сельском хозяйстве. Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве /

И.А. Тихонович, А.П. Кожемяков, В.К. Чеботарь и др. – М. Россельхозакадемия, 2005. – 154 с.

10. Биотехнология: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н., Орехов, Чакалева; под ред. А.В. Катминского. – М.: Издательский центр «Академия», 2006. – с. 183-192.

11. Верховцева Н.В., Осипов Г.А. Свойства и трофические связи основных групп микроорганизмов отделов кишечника и фекалий по данным измерений микробных маркеров методом ГХ-МС // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы: сб. материалов Международной конференции. – М., 2004. –С. 20–64.

12. Волкова, Е. Влияние Веткора и Витанеля на рост индюшат/ Е. Волкова, А. Сенько// Птицеводство. – 2010. - №6. – С. 18-19.

13. Гайдук, А.Г. Пробиотик Витафорт в рационах утят/ А.Г. Гайдук, Ф.С. Хазиахметов// Птицеводство. – 2011. - №12. – С. 27.

14. Грязнева Т.Н. Применение пробиотика Биод-5 в рационах кормления поросят-отъёмышей // Зоотехния. – 2005. – № 8. – С. 15.

15. Гулюшин, С. Эффективность применения пробиотика Агримос в комбикормах для бройлеров/ С. Гулюшин, Н. Садовников, И. Рябчик// Птицеводство. – 2010. - №5. – С. 11-12.

16. Данилов, И. Пробиотик Субтилис в промышленном птицеводстве/ И. Данилов, О. Сорокин, М. Сафанов// Птицеводство. – 2010. - №5. – С. 23.

17. Елфимова, И.А., Ясников, С.В., Перов, А.Н. Интестевит и биокорм «Пионер» для повышения сохранности молодняка // Ветеринария. – 2006. – №7. – С. 16–17.

18. Зернов В.С. Биологически активные вещества и их значение для животноводства // Тез. Докл. Науч. Конф. «Теория и практика использования биологически активных веществ в животноводстве» — Киров, 1998. –С.3-4

19. Зернов В.С., Нурбаков Г.Ф., Бурнышева Н.В. Рост телят-молочников при скармливании пробиотика БЦЛ в смеси с фито-экстрактом левзеи сафлоровидной // Аграрная Наука Евро-Северо-Востока, 2004. — № 5. — С.92-95.
20. Иванов, А.В. Опыт применения пробиотика Энтероспорин/ А.В. Иванов, Л.Е. Матросова, Л.Г. Бурдов, С.О. Белецкий, М.Я. Тремасов// Птицеводство. – 2011. - №12. – С. 15-16
21. Использование биологически активных кормовых добавок для повышения питательных свойств комбикормов и увеличения норм ввода в комбикорма шротов и жмыхов / Д.С. Павлов, И.А. Егоров, Р.В. Некрасов, К.С. Лактионов, Л.З. Кравцова, В.Г. Правдин, Н.А. Ушакова // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2011. – №1. –С. 89–92.
22. Канаян Л. Р., Акопян В. И., Натишвили Н. Н., Саакян С. Г., Александрян К. М, Качарян Е. Н. Лекарственные и биологически активные вещества в животноводстве и ветеринарии // Тр. Ереванского ордена «Знак Почета» зооветеринарного института, 1986. Вып. 59 С. 54-57.
23. Кислюк С.М., Новикова Н.И., Лаптев Г.Ю. Целлобактерин-многофункциональная кормовая добавка// Свиноводство.–2004.–№3.–С.34.
24. Клименко В.В. Применение пробиотиков в ветеринарии // Биотехнология, экология, медицина: материалы III-IV Международных научных семинаров 2001–2002 гг.; под ред. А.Ф.Труфанова. – М.-Киров: ЭКСПРЕСС, 2002. – С. 32–34.
25. Краткий определитель бактерий Берги. – М.: Мир, 1980. – 495 с40.
26. Компания БИОТРОФ– микробиология для животных.
27. Коццаев А. Г., Гудзь Г. П. Результаты совместного применения пробиотиков «Бацелл» и «Моноспорин» на цыплятах-бройлерах Кубанский государственный аграрный университет. 2009.
28. Кузнецова, В.Ф. Использование пробиотиков, пребиотиков и симбиотиков в птицеводстве/ В.Ф. Кузнецова. – Сергиев Посад, 2007. - 27 с.

29. Лебедева И. Влияние «Моноспорина» на фабрициеву бурсу, Уральский государственный университет В. Бурун, птицефабрика «Свердловская» М. Новикова, Л. Дроздова, Уральская ГСХА, 2009.
30. Лебедева, И. Пробиотик Моноспорин– стимул для синтеза белка в клетках/ И. Лебедева// Птицеводство. – 2011. - №9. – С. 44.
31. Лимаренко А., Катрич Л., Хохова О. И др. Стимулятор роста. Сельские зори, 1983. № 7. С. 43.
32. Лебедева, И. Пробиотик Моноспорин– стимул для синтеза белка в клетках/ И. Лебедева// Птицеводство. – 2011. - №9. – С. 44.
33. Марков А.В. Проблема происхождения эукариот // Палеонтологический журнал. – 2005. – Т.2. – С. 3–12.
34. Мазь Биосептин(Unguentum Bioseptin). [http: // webmvc.com /vet /leki /13/ biosept.php](http://webmvc.com/vet/leki/13/biosept.php)
35. Микробный пробиотический препарат «Бацелл» для животноводства/ А. Г. Кошаев, А. И Петенко., В .А Ярошенко. Кубанский государственный аграрный университет. - 2004. - 17 с.
36. Неустроев, М.П., Татарина, С.С. Применение пробиотика «Сахабактисубтил» стельным коровам// Зоотехния. – 2006. – №12. – С. 21
37. Николичева Т. А., Тараканов Б. В., Бравова Г. Б., Гаврилова Н. Н., Белевич Е. Н. Ассоциация микроорганизмов для скармливания молодняку крупного рогатого скота. // Авт. свид. СССР. № 1671693. Заяв. 16.03.89.
38. Николаенко В. М. Эффективность пробиотиков «Моносприн-ПК» и «Лактин-К» для повышения иммунитета и при экспериментальном сальмонеллезе, колибактериозе и микоплазмозе у цыплят-бройлеров // Ветеринарная медицина / Укр. акад. аграр. наук, 2006. - В. 86. - С. 258-263.
39. Образование биопленок – пример «социального» поведения бактерий / Ю.М. Романова, Т.А. Смирнова, А.Л. Андреев, Т.С. Ильина, Л.В. Диденко, А.Л. Гинцбург // Микробиология. – 2006. –Т. 75, № 4. – С. 556–561.
40. Панин А.Н., Малик Н.И. Пробиотики – неотъемлемый компонент рационального кормления животных//Ветеринария. - 2006. - №7. - С. 19-22.

41. Пат. 2035186 Российская Федерация, МПК С1, 61К35/66. Профилактический биопрепарат споролакт/ Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Вьюницкая В.А., Литвин В.П., Смирнов В.В. – Заявл. 09.07.92; опубл. 20.05. 95, БИ, №14.
42. Пат. 1723117 , МПК С12 N 1/20. Штамм бактерий *Bacillus pulvifaciens*, используемый для изготовления лечебнопрофилактического препарата против бактериальных инфекций у животных. – БИ, 1992, №12.
43. Пат. 2181596 Российская Федерация, МПК С1, А61К35/74. Лекарственный препарат из бактерий рода *Bacillus*/ Байгузина Ф.А., Алсынбаев М.М., Штроман Г.А., Кулагин В.Ф., Осипова И.Г., Байгузина С.Н.. – Заявл. 05.04.01; опубл. 27.04.02, БИПМ, №12.
44. Правдин В., Ушакова Н., Пономарев С. Льяной жмых для карповых и осетровых рыб // Комбикорма. – 2009. – №8. – С. 58–60. ,
45. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии/ Бакулина Л. Ф. [и др.] // Биотехнология.-2001. - Т. 2. - С.48-56.
46. Подобед Л. И. Курчат рахують не тільки в осені, як що хочуть вигодувати нормальну курку // <http://podobed.org>, 2009.
47. Пышманцева, Н. Эффективность пробиотиков Пролам и Бацелл/ Н. Пышманцева, Н. Ковехова, И. Лебедева// Птицеводство. – 2010. - №3. – С.29-30.
48. Пробиотик лактоамиловарин стимулирует рост цыплят / И. Егоров, П. Паньков, Б. Розанов и др. // Птицеводство. – 2004. – № 8. – С. 32–33.
49. Пробиотики. Достижения и перспективы использования в животноводстве / Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева, В.В. Алешин и др. // Прошлое, настоящее и будущее зоотехнической науки: Тр. ВИЖа. – 2004. – Т.3. – Вып. 62. –С. 69–73.
50. Пробиотики и микронутриенты при интенсивном выращивании цыплят кросса Смена / Г.А. Ноздрин, А.Б. Иванова, А.И. Шевченко, С.А. Шевченко // Новосибирск: НГАУ. –2009. – 207 с. ,

51. Прокуратова А. Пробиотики в кормах для животных // Молоко & Корма. Менеджмент. – 2007. – № 3(16).
52. Салеева, И. Применение пробиотика Бифидум СХЖ при выращивании ремонтного молодняка яичных кур/ И. Салеева, Е. Лебедева// Птицеводство. – 2010. - №6. – С. 13-14.
53. Слепухин, В.В. Влияние пробиотиков на мясные качества и качество мяса бройлеров«СК Русь8» / В. В. Слепухин, И. А. Емашкина// Птицеводство. – 2011. - №12. – С. 35-37.
54. Сканчев А.И. Опыт применения пробиотической добавки «пионер» для повышения продуктивности и сохранности животных // Био. — 2005. — № 6. — с. 34-36.
55. Смирнов, В.В., Резник, С.Р., Вьюницкая, В.А., Со-рокулова, И.Б., Литвин, В.П. Влияние комплексного пробиотика споролакта на микробиоценоз кишеч-ника теплокровных// Микробиол. ж. – 1995. – Т. 57, №4. – С. 42–49.–44
56. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / Т.А. Смирнова, Л.В. Диденко, Р.Р.Азизбекян, Ю.М. Романова // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 4. –С. 435–446.
57. Смирнов, В.В., Резник, С.Р., Вьюницкая, В.А., Сорокулова, И.Б., Самгородская, Н.В., Тофан, А.В. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus*// Микробиол. ж. – 1993. – Т. 55, №4. – С. 92–112.
58. Сорокулова, И.Б. Влияние пробиотиков из бацилл на функциональную активность макрофагов// Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – №2. –С. 20–25.
59. Тараканов Б. В. Использование пробиотиков в животноводстве // Калуга.- 1998. 53 с.
60. Тараканов Б.В. Новый пробиотик микроцикол // Птицеводство. — 2005. — № 2. — С. 19.

61. Тараканов Б. В., Клабукова Л. Н. Сравнительная оценка эффективности применения пробиотиков лактоамиловорина и максиллина при выращивании поросят // Вторая междунар. конф. «Актуальные проблемы биологии в животноводстве». 5-8 сентября 1995.- Боровск. 1995. С.
62. Тараканов Б.В., Нурбаков Г.Ф., Бурнышева Н.В. Влияние цикличности использования пробиотика лактоамиловорин на рост и обмен веществ телят-молочников // Аграрная Наука Евро-Северо-Востока, 2005. -№ 7. -С. 76-80.
63. Тарасова, Т.А., Хамадеева, Л.Р. Комплексное лечение трихомонадных вагинитов во время беременности с использованием препарата Бактиспорин// Актуал. вопр. акушерства и гинекол.- 2001–2002. - Т. 1, №1.
64. Шендеров Б.А., Манвелова М.А. Функциональное питание и пробиотики: микрoэкологические аспекты. – М.: Агар, 1997. – 24 с.
65. Шендеров Б.А. Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома. – М.: Дели принт, 2008. –320 с.
66. Швыдков, А.Н. Пробиотическая молочно-кислая кормовая добавка при выращивании цыплят-бройлеров/ А. Н. Швыдков, Н. Н. Ланцева, Р. Ю. Килин, О. С. Котлярова, В. П. Чебаков// Птицеводство. – 2012. - №10. – С. 27-30.
67. Шишков В.П. Болезни новорожденных телят // В кн.: Патологическая диагностика болезней крупного рогатого скота. — М.: Агропромиздат, 1989. — С. 118-119.
68. Шмидт ГС. Плешакова ГО. Биологические свойства микроорганизмов, выделенных из толстого кишечника перепелов в норме и при дисбактериозе // Ветеринарная патология. 2012. №1. С. 61-63.
69. Шчука Л. Резистентность бактерий к противобактериальным активным субстанциям и их применение в ветеринарии // Био. - 2003. - № 1. - С. 20.
70. Шаршунов В.А. и др. Комбикорма и кормовые добавки: Справочное пособие. — М., 2002. — С. 440.

71. Характеристика биологических препаратов и пищевых добавок для функционального питания и коррекции микрофлоры кишечника / В.М. Коршунов, Н.Н. Володин, Б.А. Ефимов и др. // Микробиология. – 2000. – № 3. – С. 86–91.
72. Эффективность пробиотика терацид С / И. Егоров, Ш. Имангулов, К. Харламов и др. // Птицеводство. – 2007. – № 6. – С. 56.
73. Эндобактерин. Подберезный, В.В., Полянцев, Н.И. Влияние эндобактерина на иммунный статус организма и паренхиматозные органы коров при мастите // С.-х. биол. – 1994. – №6. – С. 106–111.
74. Ушкалова Е.А. Роль пробиотиков в гастроэнтерологии // Фарматека. – 2007. – № 6. – С. 16–23
75. Ющук Н.Д., Бродов Л.Е. Острые кишечные инфекции: диагностика и лечение. – М. Медицина, 2001. –304 с.,
76. Юхименко Л.Я., Койдан Г.С., Бычкова Л.Я. Перспективы использования субалина для коррекции микрофлоры кишечника и профилактики БГС // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре: тез. докл. науч. практ. конф. – М.: МИК, 2000. – С. 133–136.,
77. ФАРМ-индекс: оперативная и профессиональная информация о рынке лекарственных средств и парафармац
78. Фисинин В. И., Лысенко М. А., Способ снижения уровня свинца в органах и тканях цыплят-бройлеров//Проблемы экологической безопасности технологии производства, переработки и хранения сельскохозяйственной продукции. Сергиев Посад,1996. С. 84-86.
79. Чернышев А.И. Как сохранить телят. — Казань, 1986. — С. 112. 0. Müller Z. Antibiotic ve antibodies ageist bacterial polysaccharides by leucocytes, 1967. — V. 12. — № 6. — P. 562.
80. Anadyn A., Martnnez-Larranaga M.R., Aranzazu-Martnnez M. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and Safety Assessment. Regulatory Toxicology // Pharmacology. – 2006. – Vol. 45. – P. 91–95.

81. Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-sub-unit ribosomal RNA sequence // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1991. – Vol. 13. – P. 202–206
82. Beattie S., Shrimpton D. H. Surgical and clinical techniques for in vitro study of the metabolism of the intestinal mikroflora of domestic fowl. *Quart. S. Exp. Phisiol.*, 1958. Vol. 43. P. 399-407.
83. *Denev S.* Probiotics - past, present and future / *Denev S.* // *BulgJ.agr.Sc*, 1996: Vol.2, N 4. - P. 445-474
- 84.11. *Gandhi A.B.* Probiotics in veterinary use / *Gandhi A.B. Nagarathnam T.* // *Poultry Guide*. 1990: T. 27. N 3. - p. 43-49.
85. Green, D.H., Wakeley, P.R., Page, A., et al. Characterization of two *Bacillus* probiotics // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol. 65. – P. 4288–4291.
86. Cummings J.H., Macfarlane G.T., Englyst H.N. Prebiotics digestion and fermentation // *Am. J. Clin.Nutr.* – 2001. – 73(suppl.) – P. 415–420.
87. Collins M.D., Gibson G.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut // *Am. J. Clin.Nutr.* – 1999. – Vol. 69, №5. – P. 1052–1057. .
88. Microbial biofilms / J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott. *Annu. // Rev. Microbiol.* – 1995. – Vol. 49. – P. 711–745.
89. Müller Z. Antibiotic ve antibodies ageist bacterial polysaccharides by leucocytes, 1967. — V. 12. — № 6. — P. 562.
90. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Formerly List of Bacterial names with Standing in Nomenclature (LBSN)
91. Nakano, M.M., Zuber, P. Anaerobic growth of a “strictaerobe” (*Bacillus subtilis*) // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1998. – Vol. 52. – P. 165–190.

92. Hosoi, T., Kiuchi, K. Natto – A food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto)// Handbook of Fermented Functional Foods / Farnworth E.R. (editor). – Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2003. – P. 227–245.
93. Hoa, T.T., Baccigalupi, L., Huxham. A., et al. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66.
94. Fuller Ray (Ed.) Probiotics. The scientific basis. Chapman & Hall. – London. N.Y. Tokyo, 1992. – 397 p.,
95. Reid G. Probiotics for urogenital health // *Nutr.Clin.Care.* – 2002. – Vol. 5, №1. – P. 3–8.
96. Roberfroid M.B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? // *Am.J.Clin.Nutr.* – 2001. – 73(suppl). – P. 406–409.
97. Parker R. S. Probiotics the other half of the antibiotics story // *Anim. Nutrition and Health.* 1974. V. 29. P.4-
98. Sanders, M.E., Morelli, L., Bush, S. “*Lactobacillus sporogenes*” is not a *Lactobacillus* probiotic // *ASM News.* – 2001. – Vol. 67. – P. 385–386.
99. Sanders, M.E., Morelli, L., Tompkins T.A. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*// *Compr. Rev. Food Sci. and Food Safety.* – 2003. – Vol. 2. – P. 101–110
100. Somatostatin antagonist analog increases GH, insulin, and glucagon release in the rat / J.L. Fries, W.A. Murphy, J. Sueiras-Diaz, D.H. Coy // *Peptides.* – 1982. – Vol. 3, № 5. – P. 811–814
101. Stephenson S.J., Perego M. Interaction surface of the Spo0A response regulator with the Spo0E phosphatase // *Molecular Microbiology.* – 2002. – Vol. 44, №6. – P. 1455–1467.
102. Simon O., Jadamus A., Vahjen W. Probiotic feed additives – effectiveness and expected modes of action // *Journal of Animal and Feed Sciences.* – 2001. – Vol. 10. – P. 51–67.
103. Sneath, P.H.A. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Vol. 2. – Baltimore, Md.: William & Wilkins Co., 1986. – P. 1104.

104. Shrimpton D. H. Surgical and clinical techniques for in vitro study of the metabolism of the intestinal mikroflora of domestic fowl. Quart. S. Exp. Physiol., 1958. Vol. 43. P. 399-407.

105. Walker R., Buckley M. Probiotic microbes: the scientific basis // A report from the American Academy of Microbiology. – 2006. – 22 p.