

Ветеринарная медицина

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№1
2014



Сайт журнала <http://www.veterinarymedicine.ru>

issn 2073-1108

Общество с ограниченной ответственностью «Агровет»
Продукция ООО «Агровет» -
надежная защита животных
от инфекций и паразитов



г. Москва, ул. Ташкентская, д. 34, к. 5

Тел.: 7-495-377-69-97, 7-495-638-52-74

Факс: 7-495-377-69-87

Email: agrovvet@agrovvet.ru, info@agrovvet.ru

Сайт: www.agrovvet.ru

Содержание

Патология и терапия болезней животных

Исмаилов Э.И.

Клинико-биохимические и патоморфологические показатели у новорожденных телят при гастроэнтеритах в условиях республики дагестан 2

Исмаилов Э.И.

Биохимические показатели новорожденных телят при гастроэнтеритах 5

Н.В. Данилевская, Е.В. Иовдальская

Сравнительная оценка эффективности диетотерапии, антиоксидантной терапии и комплексного лечения при МС у кошек для нормализации биохимических показателей крови..... 9

Э.М. Агаева, Ш.К. Зейналова

Изучение поствакцинальной напряженности иммунитета при ньюкаслской болезни..... 14

Эпизоотология и инфекционные болезни животных

П.М. Кабахова, С.Г. Хаиров, О.Ю. Юсупов,

Э.А. Яникова

Сравнительное изучение разных питательных сред для промышленного культивирования бруцелла абортус 19 17

Д.А. Девришов, В.В. Шведов, Д.В. Шведов, Бедоева З.М.

Сравнительная оценка ростовых свойств производственных культур бруцелл на различных питательных сред 19

Бедоева З.М. Жарова Т.П., Печникова Г.Н.

Сравнительная оценка антагонистической активности производственных штаммов лактобактерий... 35

Паразитология

Девришов А.Д.

Экспериментальные испытания биосинтетического противопаразитарного, быстро деградирующего препарата липомек 37

Биотехнология

В.М. Бакулин, Е.М. Гордеева, Н.С. Кондратьева, М.К. Бакулин, Ю.С. Овсянников

Выделение и использование глифосатустойчивых изолятов протеобактерий *Proteus vulgaris* и *Pseudomonas alcaligenes* в биотехнологии деградации глифосата, загрязняющего окружающую среду 40

Девришов Д.А., Брылина В.Е., Шведов Д.В.

Концентрирование микробной массы бруцеллезной вакцины из штамма *B. melitensis* Rev-1 45

Фармакология и токсикология

Д.А. Девришов, В.А. Оборин, А.Г. Ивонин, Е.В. Пименов, С.Н. Копылов

Роль эритроцитов в транспорте лекарственных средств 48

Девришов Д.А., Жарова Т.П., Печникова Г.Н.

Морфофункциональные изменения у лабораторных моделей при применении пробиотика на основе микробных культур *L.plantarum* и *L.buchneri*..... 51

Учредитель и издатель: ООО «Агровет»

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина»

Редакционная коллегия:

Василевич Ф.И. — академик РАН (главный редактор (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ))

Гулюкин М.И. — академик РАН (ГНУ ВИЭВ)

Панин А.А. — академик РАН (ФГБУ ВГНКИ)

Самуйленко А.Я. — академик РАСХН (ГНУ ВНИТИБП)

Уша Б.В. — академик РАН (Институт ветеринарной экспертизы, санитарии и экологии ФГБОУ ВПО МГУПП)

Девришов Д.А. — член-корр. РАН (заместитель главного редактора, председатель редакционно-экспертного совета (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ))

Джавадов Э.Д. — член-корр. РАН (ГБНУ ВНИИВМП)

Дорожкин В.И. — член-корр. РАН (ГБНУ ВНИИВГСЭ)

Иванов А.И. — член-корр. РАН (ФГБУ ФЦТРБ-ВНИВИ)

Кочин И.И. — член-корр. РАН (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)

Стекольников А.А. — член-корр. РАН

Непоклонов Е.А. — профессор (Россельхознадзор)

Редакционно-экспертный совет:

Тихонов И.В. — профессор: заместитель председателя (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)

Балакирев Н.А. — академик РАН (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)

Антипов В.А. — член-корр. РАН (Краснодарский НИВИ)

Мирзаев М.Н. — профессор (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)

Обухов И.Л. — профессор (ФГБУ ВГНКИ)

Скляров О.Д. — профессор (ФГБУ ВГНКИ)

Волков М.Ю. — профессор (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)

Гаврилов В.А. — профессор (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)

Ответственный редактор — Девришова Ю.Д.

Дизайн, верстка — В.В. Котов

Корректура — В.А. Мальцева

Адрес редакции:

109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 23
Тел. редакции: (495) 376-70-01.

Факс: (495) 377-69-97, (495) 377-69-87

E-mail: vetmed@agrovvet.ru, sci@mgavm.ru,

WWW-адрес: vm.agrovvet.ru

Подписной индекс: 209064 ("Пресса России")

Рукописи не возвращаются и не редактируются.

Подписано в печать 30.03.2014 г.

Формат 70×108 1/16, печать офсетная.

Заказ № 129, тираж 3000 экз.

© «Ветеринарная медицина», 2014 г.

Индексирование журнала: РУНЭБ

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ ПРИ ГАСТРОЭНТЕРИТАХ В УСЛОВИЯХ РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН

Диспепсия телят на молочных фермах, комплексах Республики Дагестан имеет широкое распространение с пиком заболевания март-апрель месяцы, когда идет массовый отел с ослабленной естественной резистентностью и иммунным состоянием коров и нетелей. Результаты гематологических исследований, свидетельствуют о количественном и качественном изменении морфологического состава крови телят. При этом выявлено у больных телят лейкоцитоз ($12,3 \pm 0,64 - 14,3 \pm 0,7$ тыс./мкл) и эритропения ($3,80 \pm 0,42$ млн./мкл), что обусловлено подавлением гемо- и гемоглобинопоэза в кроветворных органах на фоне клеточной и тканевой гипоксии, а также общей интоксикацией организма. Содержание эозинофилов у больных телят доходил до $5,7 \pm 0,2$ %, лимфоцитоз от $69,3 \pm 2,3$ до $77,2 \pm 2,1$ %, что указывает на стрессовый характер токсической диспепсии.

Ключевые слова: *гастроэнтерит, телята, клиника, показателли, биохимия, патоморфология*

ISMAILOV E.I.

Dagestan State Agricultural University.

MM Jambu-Latova

CLINICAL AND BIOCHEMICAL AND PATHOMORPHOLOGICAL INDICATORS OF NEWBORN CALVES FOR GASTROENTERITIS IN THE REPUBLIC OF DAGESTAN

Dyspepsia calves on dairy farms, complexes of Dagestan is widespread disease with a peak in March-April, when there is a massive hotel with weakened natural resistance and immune status of cows and heifers. The results of hematological studies indicate quantitative and qualitative changes in the morphological composition of the blood of calves. At the same time revealed leukocytosis in patients with calves ($12,3 \pm 0,64 - 14,3 \pm 0,7$ thousand. / L) and eritropeniya ($3,80 \pm 0,42$ Mill. / L) due to the suppression of hemo- and gemoglobinopoeza in hematopoietic organs against the background of the cell and tissue hypoxia, as well as the general intoxication. Eosinophils in patients calves reached $5,7 \pm 0,2$ %, by lymphocytosis to $69,3 \pm 2,3$ $77,2 \pm 2,1$ %, indicating that the toxic nature of stress dyspepsia.

Tags: *gastroenteritis, calves, clinic, pokazatenli, biochemistry, patomorfologija*

Одной из актуальных задач ветеринарной науки и практики является получение и выращивание физиологически крепкого, жизнеспособного молодняка для дальнейшего развития животноводства. Однако одним из основных препятствий в количественном и качественном росте поголовья скота являются желудочно-кишечные болезни новорожденных телят до 10-дневного возраста, среди которых значительное место занимает диспепсия. В отдельных хозяйствах Дагестана, также как и в других регионах России, она поражает фактически

весь рождающийся молодняк с падежом до одной трети заболевших. Только на этой почве все еще существующие колхозы, совхозы, а также крестьянско-фермерские хозяйства республики ежегодно теряют до 10 тысяч телят. Кроме этого они несут огромные убытки из-за патологии обмена веществ как маточного, так и молодняка, из-за снижения продуктивности, невозможности использования такого молодняка в дальнейшем для воспроизводства и расходов на проведение ветеринарно-санитарных и оздоровительных мероприятий [1].

Диспепсия здесь наблюдается круглый год, особенно она широко проявляется зимой и ранней весной, когда коровы не получают моцион, а скудный рацион несбалансирован по белку, углеводам и биологически активным веществам, с преобладанием в них кислых, недоброкачественных кормов (силоса, сенажа), при ограниченной даче сена и углеводистых компонентов. В результате этого у беременных коров и нетелей нарушаются все виды обмена веществ, о чем свидетельствуют выполненные нами и М.М. Джамбулатовым, Г.И. Зубаиловым исследования. Как установлено многочисленными исследованиями отечественных ученых (Р.А. Цион, 1963-1966; В.К. Чернуха, 1963-1974; В.П. Шишков, 1964-1999; В.А. Аликаев, 1972-1982; И.Г. Шарабрин, 1957; М.Х. Шайхаманов, 1976-1994; В.М. Подкопаев, 1967-1999; В.П. Урбан, 1978-1984; В.В. Митюшин, 1965-1988; М.И. Немченко, 1973-1993; С.С. Абрамов и соавт., 1990; И.М. Карпуть, 1987-1989; В.Г. Зароза, 1989-1995; И.П. Кондрахин, 1965-2003; М.М. Джамбулатов, Г.И. Зубаилов, 1975-2002; Ю.Н. Федоров, 1984-2006; А.В. Жаров, 1993-2001; С.М. Сулейманов, 1977-2006; Ал-Кейси, 2006; В.Р. Хусаинов, 2006) и зарубежных авторов (К. Геров, П. Чушков, 1964; Б. Начев, 1965; М. Mortin, 1974; С. Radests, 1975; К. Staples, 1974; J. Schulz, W. Volharolt, 1983) в изучении желудочно-кишечных заболеваний новорожденных телят, в том числе и диспепсии, достигнуты значительные успехи: установлены характер и механизм развития болезни, этиологические факторы, клиникопатоморфологические особенности, разработаны комплексные схемы лечения и профилактики [2].

Новой серьезной проблемой в ветеринарии стало появление ранее неизвестных заболеваний новорожденных телят, в этиологии которых участвуют бактерии, ранее считавшиеся сапрофитами — это микроорганизмы сем. *Enterobacteriaceae*. Они с участием 2-3-х и более представителей вызывают смешанную инфекцию телят, идентичную диспепсии (Л.С. Каврук, С.Н. Золотухин и др., 1998; Е.С. Воронин и др., 2002; Х.З. Гафуров и др., 2002; М.А. Сидоров, 2004; Н.М. Ковальчук, 2004; С.Н. Золотухин и др., 2005; Н.А. Шкиль с соавт., 2006; О.П. Ольховик, Н.Ю. Басова и соавт., 2006). Для лечения и профилактики желудочно-кишечных болезней, в том числе диспепсии, наукой и практикой предложено много средств и способов. Однако предпринимаемые ветеринарными специалистами лечебно-профилактические меры везде и не всегда дают желаемого эффекта.

Это связано, в основном, с тем, что сложное разнообразие факторов внешней среды, кормление и содержание животных в каждом регионе, районе, даже в отдельном хозяйстве имеют свои особенности, которые также, по-разному сочетаясь между собой, оказывают отрицательное воздействие на иммунитет как материнского, так и организма теленка с последующим возникновением желудочно-кишечных болезней [3].

Сложность борьбы с токсической диспепсией заключается еще в том, что она очень часто возникает в результате одновременного воздействия на организм новорожденных телят ряда этиологических, способствующих и осложняющих возникшую патологию факторов как экзогенного, так и эндогенного происхождения. Проблема борьбы с нарушениями обмена веществ маточного поголовья и желудочно-кишечных заболеваний новорожденных телят, требует дальнейших углубленных исследований. Это позволит разработать высокоэффективные, экологически безопасные средства и методы лечения токсической диспепсии и других болезней телят [4].

Целью исследований является выяснение этиологии, клинко-биохимического состояния здоровых и больных диспепсией телят.

Материалы и методы исследований.

Работа выполнялась в 2002-2007 г.г. на молочно-товарных фермах колхоза им. Хизроева и им. К. Маркса Хунзахского района, а также в лаборатории обмена веществ кафедры терапии и клинической диагностики и в лаборатории патоморфологии кафедры микробиологии, вирусологии и патанатомии ФГОУ ВПО «Дагестанская государственная сельскохозяйственная академия». Опыты и наблюдения по изучению диспепсии телят проводились в указанных хозяйствах в период отелов коров (февраль-апрель 2004-2006 г.г.). В указанных хозяйствах выясняли эпизоотическую ситуацию по желудочно-кишечным и другим заболеваниям молодняка и их матерей за последние 2-3 года. Особое внимание при этом обращали на условия содержания, ухода и кормления маточного поголовья и молодняка. Для этой цели определяли морфологические показатели крови здоровых и больных диспепсией общепринятыми методами. Материалом для проведения биохимических исследований служили кровь и ее сыворотка здоровых и больных диспепсией телят. Общее количество эритроцитов и лейкоцитов определя-

ли в камере Горяева по методу, описанному И.И. Болотниковым (1965), СОЭ — в приборе Панченкова, гемоглобин — по Сали. Мазки крови окрашивали по Романовскому-Гимза. Подсчет форменных элементов для вывода лейкоцитарной формулы проводили методом «Меандра». Всего было вскрыто 17 трупов телят, павших от токсической диспепсии. Контролем служил материал от 3-х вынужденно убояных здоровых телят. Материал обрабатывали статистически по программе «Биометрия».

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты гематологических исследований свидетельствует о том, что у всех групп животных развивались те или иные качественные изменения со стороны форменных элементов крови, связанные, в первую очередь, изменениями у них всех видов обмена веществ. Особенно резко эти изменения были выражены у телят, больных токсической диспепсией. У них в разгар болезни наблюдали лейкоцитоз, достигающий до $12,22 \pm 0,64$ — $14,3 \pm 0,7\%$, со сдвигом ядра влево; содержание эозинофилов у всех групп животных было увеличено от $2,0 \pm 0,5\%$ до $4,04 \pm 0,2\%$, у части телят этот показатель доходил до $5,7 \pm 0,2\%$, что было обусловлено их стрессовым состоянием. Содержание эритроцитов и гемоглобина у больных диспепсией телят было несколько ниже физиологических показателей и зависело от формы течения болезни. Так, у больных токсической формой диспепсии телят содержание эритроцитов было меньше ($3,42 \pm 0,13$ — $4,05 \pm 0,68$ млн/мкл) по сравнению с клинически здоровыми телятами ($4,27 \pm 0,15$ — $6,43 \pm 0,52$ млн/мкл). У отдельных больных диспепсией телят регистрировали увеличение содержания не активных популяций эритроцитов с меньшим содержанием гемоглобина, что связано процессами обезвоживания организма, сгущения плазмы крови и токсическими явлениями, что, в основном, согласуются с литературными данными (И.П. Краснов, 1975; Г.И. Зубаилов, Е.А. Емец, Л.К. Скоморохова, 1989; В.В. Митю-

шин, 1989; М.И. Немченко, 1974; И.П. Кондрахин, 2003; I. Schulz, W. Volharolt, 1983 и др.). В тоже время наши исследования расходятся с данными других авторов, касающихся содержания лимфоцитов в крови у больных диспепсией телят, где в наших исследованиях установлен лимфоцитоз, достигающий от $69,3 \pm 2,3\%$ до $77,4 \pm 2,1\%$.

Заключение. Диспепсия телят на молочных фермах, комплексах Республики Дагестан имеет широкое распространение с пиком заболевания март-апрель месяцы, когда идет массовый отел с ослабленной естественной резистентностью и иммунным состоянием коров и нетелей. Результаты гематологических исследований, свидетельствуют о количественном и качественном изменении морфологического состава крови телят. При этом выявлено у больных телят лейкоцитоз ($12,3 \pm 0,64$ - $14,3 \pm 0,7$ тыс./мкл) и эритропения ($3,80 \pm 0,42$ млн./мкл), что обусловлено подавлением гемо — и гемоглобинопоэза в кроветворных органах на фоне клеточной и тканевой гипоксии, а также общей интоксикацией организма. Содержание эозинофилов у больных телят доходил до $5,7 \pm 0,2\%$, лимфоцитоз от $69,3 \pm 2,3$ до $77,2 \pm 2,1\%$, что указывает на стрессовый характер токсической диспепсии.

Литература.

1. Алиев Ш.К., Мантаева С.Ш. Гельминты коз в Чеченской Республике. Материалы докладов Международной научно-практической конференции «Современные проблемы биологии и экологии». — Махачкала. — 2011. — С. 16-19.
2. Биттиров А.М. Гельминтофауна животных КБР. Изд-во КБГСХА. 2007. — 72С.
3. Зубаирова М.М., Атаев А.М. Ассоциативные инвазии животных Дагестана и Чечни. Материалы докладов Международной научно-практической конференции «Современные проблемы биологии и экологии». — Махачкала. — 2011. — С. 194 — 198.
4. Юсупов А.О., Биттиров А.М. Зоонозные инвазии домашних коз КБР (эпизоотология, диагностика, меры борьбы и профилактики). Издательство «ЭЛЬФА». — Нальчик. — 2009. 48С.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ ПРИ ГАСТРОЭНТЕРИТАХ

Диспепсия телят отмечается во все сезоны и изменения биохимических показателей проявляется в форме гипопроотеинемии, гипокальцемии, гипофосфотемии, гипокаротинемии при увеличении содержания сахара в крови. Часто гастроэнтериты у телят раннего возраста проявляются на фоне иммунодефицита.

Ключевые слова: гастроэнтерит, телята, кровь, сыворотка, биохимические показатели

ISMAILOV E.I.

Dagestan State Agricultural University

BIOCHEMICAL INDICATORS NEWBORN CALVES FOR GASTROENTERITIS

Dyspepsia calves observed in all seasons and the changes of biochemical parameters is shown in the form of hypoproteinemia, hypocalcemia, gipofosfotemii, gipokarotinemii with an increase in blood sugar. Often gastroenteritis in calves early age appear on the background of immunodeficiency.

Tags: gastroenteritis, calves, blood, serum biochemical parameters

При диспепсии в организме телят происходят дисбаланс белка, углеводов и биологически активных веществ на фоне развивающейся дегидратации [1]. По данным М.М. Джамбулатова, Г.И. Зубаилова (2000) у беременных коров и нетелей нарушаются все виды обмена веществ, что подтверждено многочисленными исследованиями отечественных ученых [2]. В изучении желудочно-кишечных заболеваний новорожденных телят, в том числе и диспепсии, достигнуты значительные успехи: установлены характер и механизм развития болезни, этиологические факторы [3]. При этом проблема нарушений обмена веществ маточного поголовья и новорожденных телят требует дальнейших углубленных исследований [4].

Целью исследований является изучение биохимического статуса организма коров-матерей, здоровых и больных диспепсией телят в разные сезоны года и в зависимости от технологий кормления и содержания.

Материалы и методы исследований. Работа выполнялась в 2002-2007 г.г. на молочно-товарных фермах колхоза им. Хизроева и им. К. Маркса Хунзахского района, а также в лаборатории обмена веществ кафедры терапии и клинической диагностики и в лаборатории патоморфологии кафедры микробиологии, вирусологии и патанатомии

ФГОУ ВПО «Дагестанская государственная сельскохозяйственная академия». Опыты и наблюдения по изучению диспепсии телят проводились в указанных хозяйствах в период отелов коров (февраль-апрель 2004-2006 г.г.). В указанных хозяйствах выясняли эпизоотическую ситуацию по желудочно-кишечным и другим заболеваниям молодняка и их матерей за последние 2-3 года. Особое внимание при этом обращали на условия содержания, ухода и кормления маточного поголовья и молодняка. Для этой цели определяли качественный и количественный состав кормов, используемых при кормлении животных, биохимические и морфологические показатели крови здоровых и больных диспепсией телят и их матерей, выясняли сроки сухостойного периода коров и телок, режимы и правила выпойки молозива новорожденным и т.д. Диагноз на диспепсию устанавливали комплексно на основании анализа и подробного изучения обеспеченности животных, особенно беременных коров, полноценными и сбалансированными по всем биоэлементам рационам. При этом учитывали результаты клинических, патоморфологических исследований и отрицательной бактериологической экспертизы материала от больных телят, которые проводились на кафедре микробиологии и вирусологии

логии и в Республиканской ветеринарной лаборатории. Материалом для проведения биохимических исследований служили кровь и ее сыворотка здоровых и больных диспепсией телят, дойных и сухостойных коров, а также различные корма, входящие в состав рациона коров и телят. В крови определяли: биохимические показатели, в кормах содержание макро- и микроэлементов, нитратов и нитритов, общую кислотность, содержание масляной, молочной и уксусной кислот. Общий белок определяли рефрактометрическим методом, соотношение белковых фракций электрофорезом на бумаге с последующей колориметрией на КФК-2; кислотно-щелочное равновесие — по методу Раевского; сахар — по методу Самоджи; активность щелочной фосфатазы — по Бодянскому; каротин — колориметрическим методом; кетоновые тела — йодометрическим методом; общие триглицериды — по методу компании «Bio-lachema-test» (Чехословакия, 1986); фосфолипиды — по Сванбергу и Свенерхому; холестерин — по Либерману-Бухарду. Статистическую обработку цифрового материала проводили по программе «Биометрия».

Результаты исследований и их обсуждение

Анализируя результаты биохимических исследований, можно отметить, что в организме больных диспепсией телят наступало уменьшение: содержания общего белка (из-за нарушения процесса пищеварения); альбуминов (потери с испражнениями); макро- и микроэлементов (из-за дефицита их в молозиве и не достаточного усвоения); углеводов (тоже из-за дефицита их в молозиве и нарушения гликогенообразующей функции печени), содержания ретинола и витамина

А, нередко концентрация этого важного биорегулятора у всех групп животных доходила до «следов». Недостаток этого витамина, как установлено исследованиями ученых, негативно отражается на многие функции организма, в первую очередь, на секреторную функцию желез пищеварительного тракта, подавляя резко выработку желудочного сока, соляной кислоты и других ферментов. Это является основой для развития дисфункций сычуга и несварения принятого молозива, которое, сворачиваясь, превращается в казеиновые безоары. Они, в свою очередь, служат хорошей питательной средой для развития гнилостной или другой условно-патогенной микрофлоры, которая отравляет организм теленка своими продуктами жизнедеятельности. Данные полученные нами в той или иной последовательности отражаются и в исследованиях В.А. Аликаева, В.В. Митюшина, 1982; С.М. Сулейманова, 1977; М.И. Немченко, 1974; Т.С. Самохина, 1974; М.М. Джамбулатова и Г.И. Зубаилова, 1990; И.П. Кондрахина, 2003 и других. У всех возрастных групп животных изменения биохимического статуса организма обнаруживали и со стороны липидно-холестеринового обмена в зимний период (таблица 1).

Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что содержание общих липидов и холестерина в сыворотке крови у телят было выше нормы, а фосфолипидов — ниже её. У дойных коров содержание общих липидов было выше нормы, а холестерина и фосфолипидов ниже её. У сухостойных коров содержание общих липидов в осенний период было ниже нормы, а в зимний — выше нормы. Как свидетельствуют результаты биохимических исследований

Таблица 1

Показатели липидного обмена у крупного рогатого скота совхоза им Хизроева Хунзахского района

Вид животного	Липиды, г/л	Холестерин, мг%	Фосфолипиды, мг%
Осенний период			
Телята	3,1 ± 0,2	68,0 ± 2,3	100,0 ± 1,07
Коровы дойные	4,4 ± 0,3	76,3 ± 2,3	108,0 ± 1,07
Коровы сухостойные	4,2 ± 0,2	79,2 ± 1,2	104,0 ± 6,02
зимний период			
Телята	5,8 ± 1,2	68,1 ± 2,7	99,1 ± 1,1
Коровы дойные	5,1 ± 1,2	79,5 ± 1,2	105,9 ± 1,02
Коровы сухостойные	5,04 ± 1,2	76,2 ± 2,5	108,7 ± 1,07

у маточного поголовья, от которых получены телята, больные диспепсией, а также в кормах для животных, содержание одних макро- и микроэлементов было в избытке, тогда как такие элементы как натрий, калий, хлор, а по данным Г.И. Зубаилова (1996), медь, цинк, марганец, железо и частично и йод, находились в недостающем для нормальной жизнедеятельности количестве. Полученные нами данные подтверждены результатами исследований В.Т. Самохина (1974-1992), Д.Я. Луцкого, А.В. Жарова (1978), И.П. Кондрахина (1974-2003), Н.Х. Мамаева и соавт. (2002), Н.А. Уразаева, В.Я. Никитина,

А.А. Кабыша (1990) и других авторов. Ими установлено, что как избыток, так и дефицит минеральных веществ в кормах отрицательно влияет на их содержание в организме коров, и приводят не только к нарушению минерального обмена, но и расстройству многих других биохимических процессов, протекающих в клетках, тканях, органах и, в целом, во всем организме. Отмечалось также уменьшение количества сахара, что отражалось на углеводный обмен, окислительно-восстановительные процессы и развитие плода. Нарушение щелочного равновесия в сторону ацидоза и снижение активности

Таблица 2

Биохимические показатели сыворотки крови крупного рогатого скота к/за им. К. Маркса

Группа	Телята больные	Телята здоровые	Коровы дойные	Коровы сухостойные
Весенний период				
Общий белок, г%	5,3 ± 0,05	5,6 ± 0,27	7,38 ± 0,012	6,9 ± 0,34
Кальций, мг%	7,3 ± 0,07	11,3 ± 0,36	6,01 ± 0,4	11,6 ± 0,05
Фосфор, мг%	6,8 ± 0,001	7,8 ± 0,23	5,6 ± 0,8	6,2 ± 0,31
Каротин, мкг%	следы	следы	32,2 ± 5,1	23,8 ± 0,9
Резервная щелочность, мг%	386,0 ± 1,106	406,0 ± 0,02	414,0 ± 0,9	402,0 ± 0,75
Сахар, мг%	80,0 ± 3,3	71,2 ± 1,1	41,8 ± 2,95	38,8 ± 0,8
Летний период				
Общий белок, г%	6,38 ± 0,40	6,90 ± 0,30	7,64 ± 0,2	7,86 ± 0,15
Кальций, мг%	8,52 ± 0,85	11,0 ± 0,27	9,74 ± 0,7	10,02 ± 0,2
Фосфор, мг%	5,4 ± 0,95	8,2 ± 0,5	6,5 ± 0,4	6,19 ± 0,2
Каротин, мкг%	следы	0,005 до 10	138,0 ± 1,8	243,0 ± 7,9
Резервная щелочность, мг%	430,0 ± 4,38	400,0 ± 1,5	400,0 ± 1,5	415,0 ± 4,44
Сахар, мг%	33,0 ± 4,2	53,39 ± 1,18	28,0 ± 2,4	30,2 ± 4,6
Осенний период				
Общий белок, г%	6,23 ± 0,29	6,62 ± 0,52	8,3 ± 0,83	8,31 ± 0,23
Кальций, мг%	8,05 ± 0,7	12,4 ± 0,3	11,65 ± 0,11	13,0 ± 0,58
Фосфор, мг%	5,0 ± 0,6	9,3 ± 0,2	5,15 ± 0,34	6,4 ± 0,04
Каротин, мкг%	следы	20,2 ± 1,4	26,0 ± 2,34	34,1 ± 4,5
Резервная щелочность, мг%	338,0 ± 3,52	408,0 ± 2,02	420,0 ± 6,82	435,0 ± 10,2
Сахар, мг%	37,0 ± 2,3	70,6 ± 1,04	45,2 ± 2,21	47,7 ± 1,8
Зимний период				
Общий белок, г%	5,7 ± 0,05	6,9 ± 0,1	7,29 ± 0,33	7,2 ± 0,002
Кальций, мг%	7,92 ± 1,02	11,45 ± 0,28	10,0 ± 0,6	10,2 ± 0,25
Фосфор, мг%	5,39 ± 0,12	7,6 ± 0,3	6,2 ± 0,001	5,6 ± 0,27
Каротин, мкг%	следы	следы	60,8 ± 1,22	100,0 ± 3,5
Резервная щелочность, мг%	330,0 ± 1,69	370,0 ± 1,6	382,0 ± 2,64	403,0 ± 1,4
Сахар, мг%	53,8 ± 0,95	51,68 ± 2,24	31,9 ± 1,5	38,0 ± 2,73

щелочной фосфатазы, по данным Г.И. Зубаилова (1996) также являются признаком нарушения белкового, жирового, углеводного, витаминного и минерального обменов. Эти данные согласуются с результатами исследований отечественных и зарубежных авторов, которые считают, что главной причиной диспепсии телят является недостаток в кормах и, соответственно в организме коров и новорожденных телят; каротина, протеина, минеральных элементов и других биохимически активных веществ (В.В. Митюшин, 1989; М.М. Джамбулатов, Г.И. Зубаилов, 1996; В.Т. Самохин, 1999; И.П. Кондрахин, 2003 и др.). Результаты наших исследований не только подтверждают эти данные, но и позволили определить, в какой степени, какие виды нарушенного обмена у сухостойных дойных коров в условиях низменной части Республики Дагестан влияют на возникновение диспепсии у новорожденных телят. Такими этиопатогенетическими факторами были: гипопроотеинемия, гипогликемия, гиповитаминозы, макро- и микроэлементозы, кетонемии, нитратные токсикозы, снижение активности щелочной фосфатазы и другие. Почти аналогичные показатели биохимического состава крови установлены у крупного рогатого скота колхоза им. Хизроева. В последнее время установлено и нашими исследованиями подтверждено, что в возникновении желудочно-кишечных заболеваний у телят раннего возраста большую роль играют иммунодефициты, связанные с низким содержанием в сыворотке крови коров-матерей общего белка, иммуноглобулинов, а также запоздалой дачи новорожденному материнского молозива, где содержится около 120 важных для организма телят компонентов, 60 жирных кислот, до 20 аминокислот, множество углеводов, макро- и микроэлементов, витаминов, гормонов, ферментов, пигментов и так необходимых для организма иммуноглобулинов. При своевременном, в течение 24-36 часов, потреблении достаточного количества молозива, молодняк, не имеющий при рождении иммунитета, приобретает достаточно напряженный колостральный иммунитет, способный противостоять не только против

диспепсии, но и других желудочно-кишечных заболеваний.

Как видно, во все сезоны у больных диспепсией телят отмечали изменения биохимического статуса организма, выраженное в форме гипопроотеинемии, гипокальцемии, гипофосфотемии, гипокаротинемии при увеличении содержания сахара в крови, что связано с нарушениями белкового, витаминного, минерального и углеводного обмена веществ (таблица 2).

Результаты наших исследований согласуются с данными В.А. Аликаева (1982), В.П. Шишкова (1999), М.М. Джамбулатова, Г.И. Зубаилова (2002), Ю.Н. Федорова (2006), В.Р. Хусаинова (2006) и других авторов.

Заключение. Во все сезоны, особенно, зимой и весной у больных диспепсией телят отмечали изменения биохимического статуса организма, выраженное в форме гипопроотеинемии, гипокальцемии, гипофосфотемии, гипокаротинемии при увеличении содержания сахара в крови, что связано с нарушениями белкового, витаминного, минерального и углеводного обмена веществ. В возникновении гастроэнтеритов у телят раннего возраста большую роль играют иммунодефициты, связанные с низким содержанием в сыворотке крови коров-матерей общего белка, иммуноглобулинов, а также запоздалой дачи новорожденному материнского молозива

Литература.

1. Алиев Ш.К., Мантаева С.Ш. Гельминты коз в Чеченской Республике// Материалы докладов Международной научно-практической конференции «Современные проблемы биологии и экологии». — Махачкала. — 2011. — С. 16-19.
2. Биттиров А.М. Гельминтофауна животных КБР. Изд-во КБГСХА. 2007. — 72С.
3. Зубаирова М.М., Атаев А.М. Ассоциативные инвазии животных Дагестана и Чечни. Материалы докладов Международной научно-практической конференции «Современные проблемы биологии и экологии». — Махачкала. — 2011. — С. 194 — 198.
4. Юсупов А.О., Биттиров А.М. Зоонозные инвазии домашних коз КБР (эпизоотология, диагностика, меры борьбы и профилактики). Издательство «ЭЛЬФА». — Нальчик. — 2009. 48С.

УДК 577.121

Н.В. ДАНИЛЕВСКАЯ¹, д.в.н., профессор, зав. кафедрой ветеринарной фармакологии и токсикологии имени И.Е. Мозгова

Е.В. ИОВДАЛЬСКАЯ²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина» (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ)

² Ветеринарная клиника «Ауст» (Московская область, г. Фрязино)

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИЕТОТЕРАПИИ, АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ И КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ ПРИ МС У КОШЕК ДЛЯ НОРМАЛИЗАЦИИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ.

Наиболее эффективным методом коррекции биохимических показателей сыворотки крови кошек с МС является сочетание диетотерапии и антиоксидантной терапии препаратом «Эмидонол». Это позволяет не только нормализовать уровень глюкозы крови натощак, холестерина, триглицеридов и мочевой кислоты как основных диагностических критериев МС, но и улучшить функциональное состояние печени, поджелудочной железы, сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: Кошки, метаболический синдром, антиоксиданты, эмидонол, 2-этил-6-метил-3-гидроксипирдин-3-(2,2,2-триметилгидразин)) пропионата дисукцинат, биохимический анализ крови кошек, индекс массы тела

Сокращения: МС — метаболический синдром, ИР — инсулинорезистентность, СЖК — свободные жирные кислоты, МТ — масса тела в кг, АлАТ — аланинаминотрансфераза, АсАТ — аспартатаминотрансфераза, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, КФК — креатинфосфокиназа, ИМТ — индекс массы тела, ИТК — индекс тазовой конечности

The most effective method for correcting biochemical parameters of blood serum of cats with MS is a combination of diet therapy and antioxidant therapy with «Emidonol». This allows not only to normalize fasting blood glucose, cholesterol, triglycerides and uric acid as the main diagnostic criteria of MS, but to improve the functional state of the liver, pancreas, cardiovascular system.

Введение

Широкое распространение метаболических нарушений у кошек в последние годы зачастую связано с избыточным или несбалансированным рационом, малоактивным образом жизни, отсутствием в отечественной ветеринарной литературе достаточной информации о профилактике и методах лечения МС на всех стадиях его развития [3,7]. Однако, за рубежом это заболевание хорошо изучено, разработаны методы коррекции метаболических нарушений, основанные на изменении рациона и образа жизни животного, а также фармакокоррекции МС и его осложнений [12,13,14,15].

Жировая ткань абдоминальной области и нейрогуморальные нарушения, сопутствующие абдоминальному ожирению, играют важную роль в развитии ИР — основного звена патогенеза МС [1,2,6,8,9,10,11]. При

отложении жира преимущественно в висцеральной области высвобождается огромное количество СЖК, которые через воротную вену поступают в печень. Это способствует накоплению в организме продуктов неокислительного метаболизма СЖК [2,11]. В зарубежной ветеринарной литературе, а также в медицинской литературе описаны методы антиоксидантной терапии как наиболее эффективные меры фармакокоррекции метаболических нарушений и их последствий [1,2,6,8,9,10,11,12,13,14,15]. В результате оксидативного стресса в первую очередь нарушается функция печени и развивается жировая дистрофия, стеатоз и фиброз печени [2,11], что лишь усугубляет метаболические нарушения в организме. Для снижения неблагоприятного воздействия избыточной продукции СЖК на организм чаще всего используются применяется широко распро-

страненные в России и за рубежом антиоксиданты — токоферол, янтарная кислота, пиридоксин, омега-3 и омега-6 жирные кислоты [2,8,9,10,11,12,13,14,15]. В связи с этим наше внимание привлек новый антиоксидантный препарат «Эмидонол» [4,5].

Цель исследования: оценить целесообразность применения инъекционной формы нового антиоксиданта Эмидонола 5% у кошек с МС для нормализации биохимических показателей сыворотки крови.

Материалы и методы исследования: Исследование проводилось на базе ветеринарной клиники «Аист» г. Фрязино Московской Области и ветеринарного пункта г. Щелково с ноября 2011 года по декабрь 2012 года.

На первом этапе эксперимента проводили полный клинический осмотр всех котят и кошек, поступавших в клинику за 2012 год для отбора животных, не имеющих клинических проявлений контагиозных заболеваний. Для выявления среди них кошек с избыточной массой тела были исследованы биометрические показатели. С помощью измерительной ленты определили окружность грудной клетки на уровне 9-го ребра в сантиметрах и ИТК — расстояние от коленной чашечки до угла пяточной кости. После этого вычислили ИМТ кошек в баллах по стандартной для этого вида животных формуле [12]:

$$\text{ИМТ} = 1,5 \times (A - B) / 9,$$

где А — окружность грудной клетки на уровне 9-го ребра, см; В — ИТК, см.

Животные с ИМТ 4,5 и более были признаны имеющими избыточную массу тела по 5-ти бальной шкале, что соответствует данным литературы [12,14]. Масса тела кошек была определена путем взвешивания на электронных весах марки ЕКС 8881.

Кровь у этих кошек для определения уровня биохимических показателей сыворотки брали натощак после шестичасовой голодной диеты из бедренной вены, предварительно место взятия выстригали и дезинфицировали «Велтосептом». Биохимические исследования проводили в сертифицированной экстренной круглосуточной ветеринарной лаборатории «Шанс-био». Основные биохимические показатели (общий билирубин, АсАТ, АлАТ, Коэффициент Ритиса, мочевины, креатинин, глюкоза, альфа-амилаза, ЛДГ, КФК, триглицериды, холестерин, мочевины) определяли на автоматических анализаторах AU 400 (Olimpica, Германия); А-15/25 (BioSystems S.A., Испания); EasyLyte (Medica Corp., США). Использовали реактивы Olympus,

BioSystem, Medica Corp., Human и контрольные материалы Olympus (по 2 уровням).

По результатам клинических и биохимических исследований выявили животных с МС. Диагноз ставили при наличии одного из сочетаний основных диагностических критериев:

- наличие избыточной МТ, повышение содержания в сыворотке крови холестерина и триглицеридов;
- наличие избыточной МТ, повышение содержания холестерина в сыворотке крови и гипергликемия натощак;
- наличие избыточной МТ, повышение содержания триглицеридов в сыворотке крови и гипергликемия натощак.

Артериальную гипертензию не определяли, так как ветеринарные клиники г. Фрязино и г. Щелково не оборудованы специальной аппаратурой для такого исследования.

Далее из числа животных с МС были отобраны кошки, не имеющие клинических проявлений данного заболевания, кроме избыточного веса. Это оказались в основном животные среднего возраста 6-10 лет. Поскольку основная масса животных (85%) с МС была стерилизована, то для исследования были отобраны только стерилизованные животные. В опыт взяли кошек с аналогичным рационом: исключительно готовые сухие корма фирмы «Роял Канин» в неограниченном количестве, доступ к воде свободный. Все кошки не имели выгула и находились на квартирном содержании.

По принципу пар аналогов из отобранных животных были сформированы три группы кошек по 8 голов в каждой (распределение по полу 1:1) — группа № 1 для оценки эффективности антиоксидантной терапии МС, группа № 2 для оценки диетотерапии МС и группа № 3 для исследования комплексного лечения МС диетой и антиоксидантом.

Все три группы кошек состояли из стерилизованных животных, которые имели ИМТ 4,5 и более, масса животных колебалась в пределах 6,8...8,9кг, все они имели одинаковые условия содержания и аналогичный рацион. У всех кошек были обнаружены нарушения в биохимических показателях сыворотки крови, характерные для МС.

На следующем этапе исследования первой группе животных рацион не меняли. Кошки имели свободный доступ к сухому корму «Роял Канин» для стерилизованных животных среднего возраста. Этой группе ежедневно внутримышечно вводили 5% раствор «Эмидонола» в средней терапевтической дозе 0,1 мл на кг массы в течение 10 дней.

Кошкам второй группы была назначена диетотерапия МС. Их рацион составил лечебный сухой корм «Роял Канин» для снижения веса, который дозировался строго по рекомендуемым производителем нормам на период опыта — 10 дней.

Кошкам третьей группы была назначена комплексная терапия в виде внутримышечных ежедневных инъекций антиоксиданта в средней терапевтической дозе 0,1 мл на кг в течение 10 дней одновременно с диетотерапией лечебным сухим кормом «Роял Канин» для снижения веса в рекомендуемой дозировке.

По окончании опыта всем животным были повторно исследованы биохимические показатели сыворотки крови по тем же показателям. Результаты исследования были обработаны статистически.

Результаты и обсуждение:

В ходе опыта у кошек группы № 1, которым применялся только антиоксидант без изменения рациона, были обнаружены изменения в биохимических показателях крови.

Уровень билирубина вырос на 10,71% и стал ближе к средним референтным значениям.

Средние уровни ферментов АсАТ и АлАТ, изначально повышенные, снизились на 17,45% и 31,62% соответственно, при этом уровень АсАТ после применения Эмидонола достиг верхнего предела физиологической нормы ($43,5 \pm 17,22$ Ед/л), а уровень АлАТ

($69,2 \pm 23,58$ Ед/л) все еще находился выше верхнего предела референтных значений ($18..60$ Ед/л). Это говорит о некотором нормализующем влиянии антиоксиданта на работу печени.

Среднее значение коэффициента Ритиса выросло на 16,66% ($0,6 \pm 0,30$ до $0,7 \pm 0,16$) и стало чуть ближе к нижней границе нормальных значений.

Уровень мочевины снизился на 19,49% ($11,8 \pm 5,08$ ммоль/л до $9,5 \pm 1,99$ ммоль/л) и стал стремиться к средним референтным значениям.

Уровень общей альфа-амилазы, креатинина и общего холестерина незначительно снизился.

Средний уровень глюкозы, повышенный первоначально до $7,3 \pm 1,36$ ммоль/л, снизился на 16,43% и после антиоксидантной терапии находился в пределах физиологических норм ($6,1 \pm 0,86$ ммоль/л), несмотря на то, что рацион животных не изменился.

Средние значения фермента ЛДГ снизились на 30,83% в пределах референтных значений.

Уровни холестерина и мочевой кислоты практически не изменились, а триглицериды снизились на 39,02%, но их уровень остался выше нормальных пределов почти в два раза. Это говорит о недостаточности только лишь антиоксидантной терапии для нормализации этих показателей в сыворотке крови при МС у кошек.

Таблица 1

Динамика биохимических показателей сыворотки крови кошек с МС при применении Эмидонола 5% ($M \pm m, n = 8$)

Показатель, ед. изм.	до применения Эмидонола 5%	после применения Эмидонола 5%	% к фоновому уровню	Нормальное значение
Билирубин общий, мкмоль/л*	$2,8 \pm 1,25$	$3,1 \pm 1,11$	+ 10,71	2....10
АсАТ, Ед/л	$52,7 \pm 33,37$	$43,5 \pm 17,22$	- 17,45	12....45
АлАТ, Ед/л	$101,2 \pm 78,40$	$69,2 \pm 23,58$	- 31,62	18....60
Коэффициент Ритиса**	$0,6 \pm 0,30$	$0,7 \pm 0,16$	+ 16,66	1,1...1,3
Мочевина, ммоль/л*	$11,8 \pm 5,08$	$9,5 \pm 1,99$	- 19,49	5,4....12,1
Креатинин, мкмоль/л	$152,0 \pm 47,72$	$142,9 \pm 31,73$	- 5,98	70....165
Альфа-Амилаза общая, Ед/л	$1210,5 \pm 482,62$	$1096,1 \pm 201,05$	- 9,45	500....1200
Глюкоза, ммоль/л*	$7,3 \pm 1,36$	$6,1 \pm 0,86$	- 16,43	3,3....6,8
ЛДГ, Ед/л	$239,7 \pm 57,99$	$165,8 \pm 64,63$	- 30,83	35....500
Холестерин общий, ммоль/л*	$6,3 \pm 1,44$	$6,1 \pm 0,86$	- 3,17	1,9...3,9
Триглицериды, ммоль/л*	$4,1 \pm 1,89$	$2,5 \pm 0,88$	- 39,02	0,38...1,10
КФК, Ед/л	$455,3 \pm 897,51$	$238,1 \pm 245,71$	- 47,70	150.... 350
Мочевая кислота, мкмоль/л	$44,4 \pm 43,33$	$44,2 \pm 18,71$	- 0,45	До 60

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$;

Средние значения КФК, повышенные у кошек этой группы до начала опыта снизились на 47,70% и после применения Эмидонола находились в пределах физиологических норм.

Результаты опыта приведены в таблице 1.

У кошек группы № 2, которым была назначена только диетотерапия МС, изменения в биохимических показателях сыворотки крови натошак носили несколько иной характер.

Уровень общего билирубина снизился на 6,25% в пределах физиологических норм. Аналогично изменились значения АсАТ.

Изначально повышенные средние значения фермента АлАТ при диетотерапии выросли еще на 5,84%.

Средние показатели коэффициента Ритиса снизились на 20%, что свидетельствует об ухудшении функционального состояния печени.

Средние уровни мочевины, креатинина, альфа-амилазы и глюкозы изменились не существенно.

Уровень ЛДГ снизился в пределах физиологической нормы на 10,09%.

Сильно повышенные до начала опыта средние значения общего холестерина ($6,5 \pm 1,11$ ммоль/л) снизились при диетотерапии на 7,69% и составили после окончания исследования $6,0 \pm 1,04$ ммоль/л. Этот уровень значительно превышает верхние пределы референтных значений (1,9...3,9).

Уровень триглицеридов снизился на 47,36%, но все равно при повторном исследовании превышал верхние границы нормы почти в два раза.

Средний уровень фермента КФК, повышенный до начала исследования, снизился на 50,41% и после курса диетотерапии находился в пределах физиологической нормы.

Значительно снизился в пределах нормальных значений уровень мочево́й кислоты и стал стремиться к средним референтным значениям.

Результаты исследования приведены в таблице 2.

У кошек группы № 3, которым была назначена комплексная терапия в виде диеты в сочетании с внутримышечным введением антиоксиданта в средней терапевтической дозе 0,1мл на кг в течение 10 дней, наблюдались наибольшие изменения биохимических показателей сыворотки крови.

Уровень общего билирубина вырос на 16,66% с $2,4 \pm 0,67$ мкмоль/л до $2,8 \pm 0,41$ мкмоль/л, что говорит об улучшении биосинтетической функции печени.

Первоначально повышенные средние значения АсАТ и АлАТ снизились на 26,41% и 36,22% соответственно. Значения АсАТ по окончании опыта находятся в пределах физиологических норм, а уровень АлАТ незначительно превышает верхние границы нормальных значений.

Значительно (на 33,33%) выросли средние значения Коэффициента Ритиса с $0,6 \pm 0,29$ до $0,8 \pm 0,15$ и стали ближе к границам нормальных референтных значений, что свидетельствует о нормализации функционального состояния печени.

Уровень мочевины, несколько повышенный до начала исследования снизился на 18,11% и не превышает верхней границы норм.

Средние уровни креатинина и ЛДГ изменились не значительно в пределах физиологических норм.

Уровень альфа-амилазы, снизился с $1421,8 \pm 453,81$ Ед/л до $1203,8 \pm 234,81$ Ед/л и достиг верхнего предела нормальных референтных значений.

Значительно снизились и достигли физиологической нормы уровни глюкозы (на 21,42%), триглицеридов (на 82,60%) и мочево́й кислоты (на 53,28%).

Сильно повышенный уровень КФК снизился на 61,71% и также достиг нормальных референтных значений.

Результаты исследования приведены в таблице 3.

Выводы

Таким образом, применение только диетотерапии приводит к улучшению показателей триглицеридов, КФК и мочево́й кислоты при МС у кошек, однако уровни других биохимических показателей крови меняются незначительно (уровни глюкозы, холестерина, ЛДГ, АсАТ, креатинина, билирубина) или изменения свидетельствуют об усугублении процесса нарушений метаболизма (АлАТ, коэффициент Ритиса).

Применение антиоксидантной терапии препаратом «Эмидонол 5%» без изменения рациона животного имеет несколько более выраженный нормализующий эффект на основные биохимические показатели крови кошек, однако уровни глюкозы, холестерина и мочево́й кислоты снижаются незначительно. Поскольку повышение значений этих показателей является основанием для постановки диагноза МС, нормализация их уровня чрезвычайно важна в терапии данного заболевания. Следовательно, применение только

Таблица 2

**Динамика биохимических показателей сыворотки крови кошек с МС
при диетотерапии (M ± m, n = 8)**

Показатель, ед. изм.	до начала опыта	по окончании опыта	% к фоновому уровню	Нормальное значение
Билирубин общий, мкмоль/л*	3,2 ± 1,39	3,0 ± 0,96	- 6,25	2....10
АсАТ, Ед/л	42,3 ± 19,49	39,4 ± 20,69	-6,85	12....45
АлАТ, Ед/л	112,9 ± 137,94	119,5 ± 133,51	+ 5,84	18....60
Коэффициент Ритиса**	0,5 ± 0,26	0,4 ± 0,13	- 20,0	1,1...1,3
Мочевина, ммоль/л**	9,3 ± 0,88	9,0 ± 0,96	- 3,22	5,4....12,1
Креатинин, мкмоль/л	158,1 ± 28,28	150,3 ± 17,88	- 4,93	70....165
Альфа-Амилаза общая, Ед/л	1211,7 ± 312,88	1232,6 ± 297,96	+ 1,72	500....1200
Глюкоза, ммоль/л*	6,5 ± 1,11	6,2 ± 1,06	- 4,61	3,3....6,8
ЛДГ, Ед/л	199,1 ± 99,51	179,0 ± 74,03	- 10,09	35....500
Холестерин общий, ммоль/л*	6,5 ± 1,11	6,0 ± 1,04	- 7,69	1,9....3,9
Триглицериды, ммоль/л*	3,8 ± 2,28	2,0 ± 1,66	- 47,36	0,38....1,10
КФК, Ед/л	468,9 ± 977,32	232,5 ± 285,42	- 50,41	150.... 350
Мочевая кислота, мкмоль/л	51,4 ± 31,50	29,2 ± 10,90	- 43,19	До 60

*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01;

Таблица 3

**Динамика биохимических показателей сыворотки крови кошек с МС
при одновременном применении Эмидонола 5 % и диетотерапии (M ± m, n = 8)**

Показатель, ед. изм.	до применения Эмидонола 5 %	после применения Эмидонола 5 %	% к фоновому уровню	Нормальное значение
Билирубин общий, мкмоль/л**	2,4 ± 0,67	2,8 ± 0,41	+ 16,66	2....10
АсАТ, Ед/л	56,4 ± 44,44	41,5 ± 17,59	- 26,41	12....45
АлАТ, Ед/л	99,1 ± 60,60	63,2 ± 24,12	- 36,22	18....60
Коэффициент Ритиса**	0,6 ± 0,29	0,8 ± 0,15	+ 33,33	1,1...1,3
Мочевина, ммоль/л*	12,7 ± 6,42	10,4 ± 2,49	- 18,11	5,4....12,1
Креатинин, мкмоль/л	149,1 ± 45,15	150,2 ± 39,39	+ 0,73	70....165
Альфа-Амилаза общая, Ед/л	1421,8 ± 453,81	1203,8 ± 234,81	- 15,33	500....1200
Глюкоза, ммоль/л*	7,0 ± 2,61	5,5 ± 1,02	- 21,42	3,3....6,8
ЛДГ, Ед/л	221,6 ± 79,22	200,4 ± 40,48	- 9,56	35....500
Холестерин общий, ммоль/л*	6,7 ± 1,37	4,6 ± 1,61	- 31,34	1,9....3,9
Триглицериды, ммоль/л**	4,6 ± 1,72	0,8 ± 0,25	- 82,60	0,38....1,10
КФК, Ед/л	620,1 ± 180,43	237,4 ± 143,1892	- 61,71	150.... 350
Мочевая кислота, мкмоль/л	74,5 ± 49,20	34,8 ± 18,01	- 53,28	До 60

*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01;

антиоксидантной терапии для лечения МС не дает желаемого эффекта.

Комплексное лечение МС у кошек с применением диетотерапии и антиоксидантной терапии дает наиболее выраженный эффект для нормализации биохимических показателей крови кошек. Так, комплексное лечение не только приводит к нормальным физиологическим значениям уровни холестерина, триглицеридов, мочевой кислоты, глюкозы крови натошак, но нормализует работу пе-

чени, поджелудочной железы и сердечно-сосудистой системы, о чем говорит нормализация показателей АлАТ, АсАТ, коэффициента Ритиса, альфа-амилазы, ЛДГ, КФК, мочевины.

Следовательно, сочетанное применение диетотерапии и антиоксидантной терапии препаратом «Эмидонол 5 %» в инъекционной форме наиболее эффективно и целесообразно для коррекции биохимических показателей крови у кошек при МС.

Библиография

1. Алексеева О.П. Метаболический синдром: современное понятие, факторы риска и некоторые ассоциированные заболевания / О.П. Алексеева, А.А. Востокова, М.А. Курышева // Нижний Новгород: Нижгма. — 2009. — стр.17-18.
2. Буеверов А.О. Оксидативный стресс и его роль в повреждении печени/ А.О. Буеверов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2002. — 4: 21 — 25.
3. Данилевская Н.В. Проблема метаболического синдрома у мелких домашних животных в современной зарубежной литературе / Н.В. Данилевская, Е.В. Иовдальская // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. — 2013. — № 3. — С. 6-8.
4. Енгашева Е.С. Изучение местно — раздражающих свойств препарата Эмидонол 20% / Е.С. Енгашева, Д.Д. Новиков, А.Ю. Ефремов // Всероссийская научно-практическая конференция «Инновации — сельскому хозяйству». — Россия, Калининград. — 2013 г. — стр. 40 — 42.
5. Енгашева Е.С. Острая и субхроническая токсичность препарата эмидонол 10% / Е.С. Енгашева, Д.Д. Новиков, Р.Ф. Тухфатова // Материалы V Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения». — Ульяновск. — 2013. — С.57-62.
6. Ивашкин В.Т. Клинические варианты метаболического синдрома / Ивашкин В.Т., Драпкина О.М., Корнеева О.Н. // — М: ООО Издательство Медицинское информационное агентство, 2011. — стр. 19-22.
7. Иовдальская Е.В. Распространенность метаболического синдрома у кошек. / Е.В. Иовдальская // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. — 2013. — № 5 — С. 26-29
8. Маколкин В.И. Метаболический синдром / В.И. Маколкин // Москва: Медицинское информационное агентство. — 2010. — стр.13 — 24.
9. Сергеев В. Метаболический синдром: причины, лечение и профилактика/ В. Сергеев // Врач. — Москва. — 2009. — № 2. — стр. 36 — 41.
10. Фонсека В. Метаболический синдром/ Фонсека В. // Москва: Практика. — 2011. — стр. 17-20.
11. Под ред. Чл-корр. РАМН Ройтберга Г.Е. Метаболический синдром / под ред. Чл-корр. РАМН Ройтберга Г.Е. // — М: МЕД-пресс-информ, 2007. — стр. 85-88.
12. Colliard L., Paragon B-M., Lemuet B., Benet J-J., Blanchard G. Prevalence and risk factors of obesity in an urban population of healthy cats // Journal of Feline Medicine and Surgery, 2009; 11: 135S–140S.
13. Cziraky M.J. Management of Dyslipidemia in Patients with Metabolic Syndrome // Medscape-cardiology, 2005; 9(2).
14. German J.A. The Growing Problem of Obesity in Dogs and Cats // Journal of Nutrition, 2006; 136: 1940S–1946S
15. Rand S.J., Fleeman L.M., Farrow H.A., Appleton D.J. and Lederer R. Canine and Feline Diabetes Mellitus: Nature or Nurture? // Journal of Nutrition, 2004; 134 supplement: 2072S–2080S.

ЭПИЗООТОЛОГИЯ И ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ ЖИВОТНЫХ

UDK: 619:616981.51

Э.М.АГАЕВА, Ш.К.ЗЕЙНАЛОВА

*Республиканская ветеринарная лаборатория
Азербайджанского медицинского университета*ИЗУЧЕНИЕ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ
ИММУНИТЕТА ПРИ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ

Изучена напряженность иммунитета у птиц, привитых ССЯ-76+ИБК+НБ вакциной против болезни Ньюкасла. Установлены высокие титры антител у птиц 320 и выше возраста.

Ключевые слова: Ньюкаслская болезнь, антитела, ИФА, РТГА, референс, вакцина

E.M.AGAYEVA, SH.K.ZEYNALOVA,

Along with the general conduct of the animal health activities in private farms of birds necessary to carry out specific immunization against Newcastle disease and constantly monitor the after vaccination immunity. The effectiveness of vaccination depends on the applied ICDO-vaccine strain, the homogeneity of the maternal immune system. It is established increase tension group immunity against Newcastle disease virus with the age of the bird.

Keywords: Newcastle, antibody, ELISA, HI, reference, vaccine

Введение. Ньюкаслская болезнь (НБ) — особо опасная высококонтагиозная вирусная болезнь птиц из отряда куриных, проявляющаяся поражением органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы (энцефаломитом). Возбудитель болезни Ньюкасла относится к семейству *Paramyxoviridae*, включающую разновидности вируса с различной степенью вирулентности: велегенные- высокопатогенные, вызывающие заболевание птиц ньюкаслской болезнью с высокой смертностью; мезогенные — умеренно патогенные, вызывают падеж молодняка птиц и снижение продуктивности у взрослых особей; и лентогенные — слабопатогенные, вирусы этой группы не вызывают гибели птиц. В зависимости от штамма вируса изменяется характер и тяжесть протекания болезни. Вирус болезни Ньюкасла относится к семейству самых опасных вирусов, среди которых возбудители чумы рогатого скота, чумы плотоядных, парагриппа многих видов животных и даже болезней кошек. Представители этого семейства также являются возбудителями болезней человека.(1,2,3,4)

Болезнь имеет широкое географическое распространение (Европа, Азия, Африка и Америка), причем удерживается стойкая тенденция к возрастанию количества случаев возникновения заболевания, так как пока не существуют способы прекращения циркуляции вируса НБ в природе и заноса вируса в хозяйство. Вследствие огромного экономического ущерба, наносимого НБ, ВОЗ относит ее к группе наиболее опасных болезней продуктивных животных — список А (1,2,4).

В настоящее время специфическая профилактика в комплексе с общими оздоровительными мероприятиями имеет большое значение в борьбе с ньюкаслской болезнью. Наряду со специфической профилактикой строгая технологическая дисциплина и высокая ветеринарно-санитарная культура производства, полноценное кормление птицы способствуют созданию в стаде прочной иммунной защиты (2,3,4,5).

Регулярное исследование напряженности иммунитета к ньюкаслской болезни в птицеводческих предприятиях, частных домовладениях, мониторинговые исследования дикой и синантропной птицы помогают контролировать эпизоотическую обстановку.(4,5)

Для специфической профилактики ньюкаслской болезни используют преимущественно лиофилизированные вирус-вакцины из штаммов «Гломорус», «Клон-30» и другие. (4,6,7)

Цель исследований было изучить динамику напряженности иммунитета у птицы после вакцинации методом — РТГА и ЕЛИЗА.

Материалы и методы. Работа выполнялась на птицеводческом хозяйстве частного предприятия закрытого типа «Гилези», расположенном в районе Хизы Азербайджанской Республики. Обследование птицеводства проводилось с помощью клинико-эпизоотологических методов, анализа документов за 2006-20012 гг. актов эпизоотологического обследования, изучения схем профилактических прививок и экспертиз по исследованию сывороток крови от птицы. Это хозяйство было выбрано не случайно т.к. в 2006-ом году здесь, произошла вспышка болезни Ньюкасла и Птичьего гриппа.

Для постановки реакции ЕЛИЗА использовали набор FLOCKSCREEN — ЕЛИЗА кит — быстрый, простой и чувствительный метод для выявления антител в сыворотке птиц. Для реакции РТГА использовали специфический антиген, который получали из Референс лаборатории OIE- IZSVE (Радова, Италия).

Результаты исследований. Частное предприятие закрытого типа «Гилези» основано в 2001 на базе государственной птицефабрики. На момент обследования (2006-20012гг.) хозяйство укомплектовано птицей кросса «Хай-лайн» яичного направления, в возрасте 363 — 548 дней, яйценоскость птиц 90-95 % в день от общего поголовья птицы.

Для специфической профилактики ньюкаслской болезни на «Гилези» используют вакцины:

Вакцинация проводится у новорожденных, аэрозольным методом.

Живая вакцина Ма5 — Clon-30 фирмы Intervet, Голландия — двойного действия, содержит штамм Ма5 вируса инфекционного бронхита, а также лентогенный штамм Clon-30 вируса болезни Ньюкасла. Прививают птицу методом выпаивания, в возрасте 13 дней.

Инактивированная вакцина ССЯ-76+ИБК+НБ. Это масляная вакцина, содержащая антиген штамма М 41 вируса инфекционного бронхита, штамма Clon-30 вируса болезни Ньюкасла, а также антиген вируса синдрома снижения яйценоскости. Вакцина, является высокоиммуногенной и защищает организм птицы на весь период яйценоскости. Прививают птицу внутримышечно в бедренную или грудную мышцы в возрасте 110-120 дней.

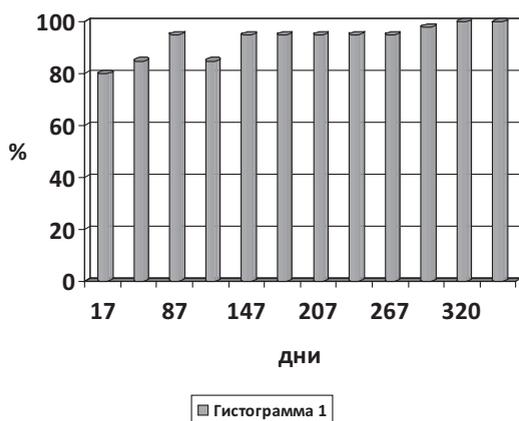
Через 17-18 день после вакцинации мы отбирали и исследовали сыворотку крови в РЗГА и ИФА для определения уровня спец-

Напряженность иммунитета к ньюкаслской болезни.

Возраст птицы (днях)	17	57	87	117	147	177
Титр в РТГА (средний)	1:128	1:512	1:1024	1:512	1:1024	1:1024
Титр в ЕЛИЗА (средний)	1-8 Log ₂	3-10 Log ₂	5-11 Log ₂	3-10 Log ₂	5-11 Log ₂	5-11 Log ₂
Количество птиц	500	500	500	500	500	500
Процент иммунизации	80 %	85 %	95 %	85 %	95 %	95 %

Продолжение табл.1

Возраст птицы (днях)	207	237	267	297	320	350
Титр в РТГА (средний)	1:1024	1:1024	1:1024	1:2048	1:4096	1:4096
Титр в ЕЛИЗА (средний)	2-9 Log ₂	3-10 Log ₂	5-10 Log ₂	5-11 Log ₂	5-11 Log ₂	5-11 Log ₂
Количество птиц	500	500	500	500	500	500
Процент иммунизации	95 %	95 %	95 %	98 %	100 %	100 %



антител к ньюкаслской болезни, представленные в таблице 1 и 2.

При анализе результатов приведенных в таблице 1 установлено, что после первой вакцинации, возникла необходимость к ревакцинации.

На 17 день групповой иммунитет составил 80%, при титрах от 1 до 8 Log₂; на 57 день групповой иммунитет — 85%, при титрах от 3 до 10 Log₂; на 87 день групповой иммунитет 95%, при титрах от 5 до 11 Log₂;

На основе показателей в таблицах построена диаграмма, где показано динамика возрастания иммунитета с возрастом птицы (до убоя):

ифических антител к вирусу болезни Ньюкасла, по которым судят об эффективности прививки. В последующем ревакцинацию птицы проводят, если менее, чем в 80% проб сыворотки крови, полученной от привитых птиц, титр антител в РТГА будет менее 1:16 или в ИФА менее 8,73 log₂, (1:400). Если титр антител будет выше, то ревакцинацию не проводят, но при этом контролируют титр антител.

Исследования проводили в Республиканской Ветеринарной Лаборатории в реакции ЕЛИЗА и РТГА.

Было установлено, что после проведения первичной иммунизации цыплят в однодневном возрасте групповой иммунитет составил 85-90%, при титрах 5-10 Log₂. После иммунизации птицы в 13 дневном возрасте групповой иммунитет составил 95%, при титрах 5-11 Log₂, что указывало на достаточно хорошую защиту против вируса.

Был проведен анализ экспертных заключений Республиканской Ветеринарной Лаборатории. Результаты определения титров

Выводы:

Наряду с проведением общих ветеринарно-санитарных мероприятий в птицеводческих хозяйствах необходимо проводить специфическую иммунизацию против Ньюкаслской болезни и постоянно осуществлять контроль напряженности поствакцинального иммунитета. Эффективность вакцинации зависит от применяемого штамма вакцины, однородности материнского иммунитета, кратности и метода вакцинации. Установлено возрастание напряженности группового иммунитета против вируса ньюкаслской болезни с возрастом птицы.

Список использованной литературы:

1. Агаева Э.М., Зейналова Ш.К. Болезнь Ньюкасла и птичьего гриппа в Азербайджане эпизоотология, Баку-2011,116-118с.
2. Зейналова Ш.К., Агаева Э.М. Сравнительная оценка методов микробиологической диагностики Птичьего Гриппа и Ньюкаслской болезни, Известия Аграрной Науки, Грузия 2011,117-120с.

3. Белявцев Е.А. Изучение динамики напряженности иммунитета при Ньюкаслской болезни, ЮФ «КАТУ» НАУ

4. Руденко Т.В. Вакцина против ньюкаслской болезни из штамма «ГАМ-61»: Дис..канд.биол. наук. — М., 2000. — 198 с.

5. Сюрин В.Н., Самуйленко А.А., Соловьёв Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных // Москва: ВНИИБП, 1998, С.214-232.

6. Brown J., Resurriccion R.S., Dickson T.G. The relationship between the hemagglutination-inhibition test and ELISA for detection of antibody to Newcastle disease//Avian Dis. — 1990. — V.34. — P.585-587.

7. Cadman H., Kelly P., Angelis N. e.a. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in ostriches// Avian Pathol. — 1997. — V.26. — P.357-363.

УДК 619:579.841.93

П.М. КАБАХОВА, С.Г. ХАИРОВ, О.Ю. ЮСУПОВ, Э.А. ЯНИКОВА
ГНУ «Прикаспийский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт», Республика Дагестан, Махачкала

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БРУЦЕЛЛА АБОРТУС 19

Проведено сравнительное изучение разных питательных сред для промышленного культивирования Бруцелла абортус 19. Для выращивания штамма 19 наиболее эффективные результаты дала обратоказеиновая среда, из которой получают хорошее накопление бактериальной массы бруцелл.

Ключевые слова: Республика Дагестан, питательная среда, штамм Бруцелла абортус 19, агар.

P.M. KABAKHOVA, S.G. HAIROV, O.YU. YUSUPOV, E.A. YANIKOVA
Kaspian zonal research veterinary institute, Republic of Dagestan, Makhachkala

COMPARATIVE STUDY OF DIFFERENT NUTRIENT MEDIA FOR THE INDUSTRIAL CULTIVATION OF BRUCELLA ABORTUS 19

Conducted a comparative study of different nutrient media for the industrial cultivation of Brucella abortus 19. For growing strain 19 the most effective results gave obratokazein mediam from which get the good accumulation of bacterial mass Brucella.

Key words: Republic of Dagestan, nutrient medium, strain Brucella abortus 19, agar.

При массовом серийном производстве диагностических препаратов большое значение приобретает унификация технологии изготовления и использования питательных сред для получения накопления бактериальной массы культур.

Накопление микробных клеток бруцелл для изготовления антигена для РНГА в существенной мере зависит от качества питательных сред.

В настоящее время для приготовления диагностических препаратов из штамма 19 используется плотная агаровая среда в четвертях или матровых колбах культивирования микроорганизмов конструкции Шестеренко А.Ф. Эта технология требует больших экономических затрат. Изготовление питательной среды на основе высококоценного пищевого продукта мяса и печени экономически не оправдано,

добавление дефицитной и дорогостоящей сыворотки крови вызывает дополнительные трудности, связанные со стерильным внесением ее в готовую среду и возможностью загрязнения культуры посторонней микрофлорой.

Цель и задачи исследований. Основная цель наших исследований заключалась в проведении сравнительного испытания различных сред для промышленного культивирования вакцинного штамма B.abortus 19.

Материал и методы. Для выращивания культуры вакцинного штамма 19 применяли следующие среды: картофельный агар на переваре Хоттингера или мясной бульон, мартеновский агар с печеночным экстрактом, мясопептонно-печеночный агар, а также обратоказеиновый агар и глубинное выращивание бруцелл штамма 19 в жидкой питательной среде.

Картофельный агар с переваром Хоттингера готовили по следующей прописи: на 1 литр среды брали перевара Хоттингера столько, чтобы в зависимости от его качества, содержание аминного азота в готовой среде составило 130-150 мг%, глицерина — 30 мл и картофельного экстракта доливали до 1 литра, поваренной соли — 5 г, пептона — 10 г, глюкозы — 10 г, агар-агара — 30 г, pH среды перед стерилизацией устанавливали — 7,3-7,6.

Печеночно-мартеновский агар. Для изготовления одного литра брали 50 мл фильтрованного мартеновского пептона, 250 мл фильтрованного печеночного экстракта, 250 мл водопроводной воды, 5 г (0,5 %) поваренной соли. Устанавливали pH 7,8-8,0, кипятили 20 минут, после чего фильтровали и добавляли 4,5 % агар-агара, снова кипятили 40-50 минут, после чего фильтровали, добавляли 3 % глицерина, 1 % глюкозы, разливали в матровые колбы и стерилизовали при 1 атм. 20 мин., pH после стерилизации 6,8-7,1.

Нами, совместно с профессором К.В. Шумиловым, на Щелковском биокомбинате для получения оптимальной питательной среды для глубинного выращивания бруцелл штамма 19 на жидкой среде были испытаны: перевар Хоттингера (20-25 %), глицерин (1 %), глюкоза (1 %), хлорид натрия (0,5 %), дрожжевой экстракт (0,25 %) и нативная сыворотка крупного рогатого скота (1 %). Содержание аминного азота составляло 150-170 мг%, pH — 6,9-7,1.

Стерилизацию питательной среды осуществляли через многорамные фильтры с использованием стерилизующих пластин СФ-1 или ЕКС.

Мясопептонный печеночный глюкозо-глицериновый агар. Для изготовления одного литра брали 500 мл мясного экстракта, 500 мл печеночного экстракта, 3 % агар-агара, пептона — 1 %, поваренной соли — 0,5 %. Устанавливали pH 7-7,6, кипятили 30 минут, после чего фильтровали, добавляли 2 % глицерина, 1 % глюкозы, разливали в матровые колбы и стерилизовали при 1 атм. 30 мин., pH после стерилизации 6,8-7,1. Накопление бруцелл хорошее, но эта среда очень дорогостоящая.

Обратоказеиновый агар, который готовили по следующей прописи: на 1 литр среды брали гидролизат в соотношении 1:1 из обрата и казеина столько, чтобы в зависимости от содержания в них аминного азота в готовой среде содержалось 110-120 мг% аминного азота, пептона — 5 г (0,5 %), поваренной соли — 5 г (0,5 %), глицерина — 20 мл (2 %), глюкозы — 10 г (1 %), агар-агара — 30 г

(3 %), дистиллированной или водопроводной воды — до одного литра.

Все компоненты питательной среды по прописи, кроме глюкозы и агар-агара, смешивали и кипятили. Когда среда закипит, ее подщелачивали 10 %-ным раствором едкого натра до pH 7,3-7,4, затем добавляли агар-агар согласно прописи и снова кипятили при помешивании до полного расплавления (15-20 мин.).

После расплавления агар-агара снова устанавливали pH 7,2-7,3 и измеряли объем среды; к среде добавляли недостающее количество горячей дистиллированной или водопроводной воды до первоначального уровня. Среде давали отстояться 15-20 минут, после чего фильтровали через ватно-марлевый фильтр. К фильтрату добавляли 1 % глюкозы, разливали в стерильные матровые колбы. После стерилизации pH 6,3-7,1.

Результаты исследований. По методу приготовления картофельного агара с переваром Хоттингера было изготовлено 3 серии питательных сред. Накопившиеся бруцеллы нас не удовлетворяли.

Рост вакцинного штамма 19 при использовании печеночно-мартеновского агара удовлетворительный, приготовили 2 серии антигена для РНГА.

При выращивании на питательной среде с обратоказеиновым агаром достигался лучший рост бруцелл штамма 19, большой выход бактериальной массы в 1 см³, а также высокие антигенные свойства.

Данная питательная среда намного дешевле, так как не используются высокоценные пищевые продукты — мясо и печень, нет необходимости добавления дефицитной и дорогостоящей сыворотки крови крупного рогатого скота.

Из бакмассы полученного штамма V.abortus 19 глубинным методом выращивания изготовили бруцеллезный эритроцитарный антиген для РНГА следующим образом: бакмассу осаждали путем центрифугирования при 14-15 тыс. об./мин. в течение 35-40 минут, затем из нее готовили 80-100 млрд микробных клеток 12 %-ным раствором хлорида натрия в 1 см³. После этого бакмассу бруцелл автоклавировали при 1 атм. (115°C) в течение 20-30 минут. После автоклавирования в остуженную до 45-50°C бакмассу добавили 2 % вторичного алкилсульфата натрия и внесли в водяную баню при температуре 45°C в течение 40 минут, периодически перемешивали. Затем бакмассу бруцелл центрифугировали при 14-15 тыс. об./мин. в течение 45 минут.

Полученный надосадочный экстракт бруцелл использовали для сенсibilизации формализованных эритроцитов барана.

Заключение. Таким образом, в наших условиях наиболее пригодной, дешевой, простой для выращивания штамма 19 является обратоказеиновая среда, из которой получают хорошее накопление бактериальной массы бруцелл.

Список литературы

1. Коротич, А.С. Питательные среды, ускоряющие рост бруцелл / А.С. Коротич. // ЖМЭ, 1960. — Вып. 3.

2. Объединенный Комитет экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу (1970) рекомендовал в качестве основной питательной среды сывороточно-декстрозный агар.

3. Питательная среда для выделения и культивирования бруцелл, сухая (эритрит агар), микро-

биологические питательные среды. Каталог, Махачкала, 2001. С-47.

4. Триленко П.А. Для выращивания бруцелл рекомендует плотный печеночно-глюкозо-глицериновый агар. Кн. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Ленинград «Колос», 1976. С. 250-253.

5. С успехом применяется разработанная Плоскировым Н.В. сухая среда «Д», основу которой составляют рыбный и дрожжевой гидролизаты для выращивания бруцелл. Книга Жованик П.Н., 1975, Издательство «Урожай». С. 19. Киев.

6. Шумилов К.В., Климанов А.И., Малахов Т.Н. Для изготовления единого бруцеллезного антигена для РА, РСК РДСК рекомендуют для выращивания штамма *B.abortus* 19 картофельный и мартовский агар с добавлением перевара Хоттингера. Справочник «Ветеринарные препараты», 1981 г., Москва, «Колос». С. 181-183.

Контактная информация:

Юсупов О.Ю.

тел. 8-8722682702

УДК 602:42:631

Д.А.ДЕВРИШОВ, В.В.ШВЕДОВ, Д.В.ШВЕДОВ, БЕДОЕВА З.М.
ООО «Агровет»

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РОСТОВЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ КУЛЬТУР БРУЦЕЛЛ НА РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Сравнительный анализ ростовых свойств различных питательных основ и сред, изученных в процессе проведения работы показал, что наиболее приемлемой и предпочтительной для культивирования бруцеллезного микроба производственных штаммов *B. abortus* 19 BA и *B. melitensis* Rev-1 является питательная среда, приготовленная на основе ферментативного гидролизата крови крупного рогатого скота. В результате проведенных исследований была разработана и оптимизирована пропись жидкой питательной среды на основе ферментативного гидролизата крови, которая полностью отвечает питательным потребностям бруцелл.

Ключевые слова: *бруцеллы, питательные среды, гидролизат, микрофлора, аминный азот, рост.*

D.A.DEVRISHOV, V.V.SHVEDOV, D.V.SHVEDOV
LLC «Agrovet»

COMPARATIVE EVALUATION OF GROWTH PROPERTIES OF INDUSTRIAL CULTURES OF BRUCELLA IN DIFFERENT CULTURE MEDIA

Comparative analysis of growth characteristics of different nutrient bases and environments studied in the course of work has shown that the most appropriate and advantageous for the cultivation of *Brucella* microbe production strains *B. abortus* 19 BA and *B. melitensis* Rev-1 is a nutrient medium, prepared on the basis of enzymatic hydrolyzate of blood cattle. The studies were designed and optimized recipe liquid medium on the basis of enzymatic hydrolyzate of blood that meets the nutritional needs of *Brucella*.

Keywords: *Brucella, culture media, hydrolyzate, microflora, amino nitrogen, growth*

Широкое разнообразие свойств микробов в пределах рода бруцелла, их требова-

тельность к составу питательных сред, высокая природная мобильность под воздей-

ствием внешних неблагоприятных факторов, одним из проявлений которых является диссоциация, сопровождающаяся изменением биологических свойств микробов, убедительно показывает, что задача по усовершенствованию технологии получения глубинных микробных культур вакцинных штаммов бруцелл на стадии производственного процесса приготовления профилактических иммунобиологических препаратов против бруцеллезной инфекции сельскохозяйственных животных должна решаться комплексно, начиная от исследования питательных потребностей бруцеллезных микробов и заканчивая выбором технологического оборудования, позволяющего осуществлять процесс приготовления нативных микробных культур в управляемых условиях. [1...7]. Бруцеллезные микробы весьма требовательны к питательным средам, которые помимо источников азота, углерода, минеральных веществ должны включать в себя и витамины группы В₁ и В₅. Подобные среды, легко контаминируются посторонней микрофлорой (ПМФ), что в свою очередь усложняет и удорожает процесс подготовки оборудования и сырья в производстве ветпрепаратов.

Анализ литературных источников, посвященных способу глубинного культивирования бруцелл, показывает, что бруцеллы отнесены к аминогетерогенным микроорганизмам, требующим для обеспечения роста наличия в среде свободных аминокислот в качестве источников азота. По мнению специалистов, аминокислоты для бруцеллезных микробов являются единственными источниками азота, а также могут являться и источниками углерода [8...11].

В настоящее время при производстве иммунобиологических препаратов предназначенных для иммунопрофилактики бруцеллеза используют сложные питательные среды на основе гидролизатов белков животного и растительного происхождения: мяса, рыбы, печени, селезенки, казеина, картофеля, сои [1, 4, 12, 13]. В качестве питательных основ чаще всего применялись гидролизаты белков животного происхождения, как наиболее богатые аминокислотами [4, 14, 15].

Такие питательные среды вариабельны по составу белковых компонентов, так и по содержанию балластных редуцирующих веществ [4,7,12,13,16]. По мнению некоторых ученых, бруцеллезные микробы могут расти в средах с единственным источником азота — глутаминовой или аспарагиновой кислотой, а также аммонийных солей щавелевой, уксус-

ной или лимонной кислоты [4]. Использование же в качестве источника азота солей неорганических кислот не дали положительных результатов [18, 19]. Вероятной причиной отрицательного результата по применению неорганических источников азота, могло быть отсутствие в среде факторов роста — азотистых оснований, пуринов, пиримидинов, аминокислот.

Рост и развитие микробов зависят от многих факторов, к которым относятся способы и методы культивирования (поверхностное, глубинное периодическое, непрерывное), состав и консистенция питательных сред, pH среды, тоничности, буферной емкости и т. д. При составлении и оптимизации питательных сред учитывают главным образом пищевую потребность микробов в питательных субстратах, но при этом не учитывается второстепенная роль факторов, оказывающая существенное влияние на урожай культуры. К таким факторам относятся:

1) тоничность (осмомолярность) среды, оптимальное значение которой у разных микробов варьирует в значительных пределах, в частности у бруцелл пределы оптимума 200...600кПа;

2) буферная емкость среды, т.е. ее способность удерживать pH в оптимальных пределах, для бруцелл 6,6...7,4, на протяжении всего цикла культивирования;

3) присутствие в среде факторов роста, витаминов, аминокислот, азотистых оснований, микроэлементов и др.;

4) границу лимитирующей зоны, поскольку для достижения максимального выхода конечного продукта, концентрация отдельных ингредиентов не должна опускаться ниже определенной величины.

Большинство питательных сред для культивирования микробов включают в себя белковые гидролизаты с различной степенью расщепления белков, концентрации которых превышают питательные потребности микроорганизмов именно благодаря второстепенной их роли: создания оптимальной осмомолярности среды, буферной емкости и наличия факторов роста. Так по данным [20] при глубинном культивировании бруцелл утилизировалось 20% белка. Остающиеся 80% белка, таким образом, являются балластом, значительно удорожающих питательные среды и последующую очистку при получении профилактических иммунобиологических препаратов.

Как правило, микроорганизмы, могут использовать не один какой либо тип источни-

ков углерода, азота и других ингредиентов, а разные. Если в среде будет содержаться смесь таких веществ, то микробные клетки, прежде всего, будут использовать более доступные, например аминокислоты, а не аммиак [21]. Это связано с тем, что микробы используют аминокислоты непосредственно в обмене веществ [21] и в клетках выключается процесс синтеза ферментов (репрессия), катализирующих реакции образования аминокислот из аммиака. Таким образом, при минимизации концентрации более доступных источников азота, можно подобрать состав среды и условия культивирования, при которых в метаболизм белков будут включены аммиак или соли аммония. При составлении таких сред рекомендованы следующие ориентировочные концентрации ингредиентов (г/л): доноров и акцепторов водорода ~ 2,0; источников азота ~ 1,0; источников углерода ~ 1,0...2,0; микроэлементов (сера, фосфор, магний) ~ 0,05 каждого; ультрамикроэлементов 0,0001...0,001 каждого; ростовых факторов ~ 0,0001...0,001; аминокислот, пиримидинов, пуринов и др. ~ 0,05 каждого [21].

Технологии с использованием таких сред основаны на механизме введения по определенной программе в биореакторы, лимитирующих рост и размножение клеток, питательных субстратов при выращивании микробных культур. Подобные технологии успешно реализованы сотрудниками ООО «Агровет» при разработке способа приготовления многокомпонентной вакцины против острых кишечных заболеваний сельскохозяйственных животных.

Целью данной работы является сравнительная оценка ростовых свойств производственных культур бруцелл на различных питательных сред.

Для достижения указанной цели были определены следующие направления исследований включающие:

- 1) проведение сравнительной оценки ростовых свойств жидких питательных сред, приготовленных на основе различных гидролизатов,
- 2) выбор наиболее эффективного по ростовым свойствам гидролизата и оптимизацию на его основе среды для глубинного культивирования бруцеллезных микробов;
- 3) изучение механизмов дискриминации в разных фазах роста бруцеллезных микробов;
- 4) оценка качества глубинных культур производственных вакцинных штаммов бруцеллезных микробов, полученных с использованием оптимизированной жидкой питательной среды и возможности их использования для приготовления профилактических иммунобиологических препаратов против бруцеллеза.

Материалы и методы

В работе были использованы штаммы бруцеллезного микроба приведенные в таблице 1.

Культуры штаммов используемые в работе были предварительно пропассированы через организм морских свинок. Субкультуры выращивали на плотной питательной среде (ППС) в матрацах (пропись 1), суспендировали в защитной среде (пропись 8), доводили до концентрации 100×10^9 по ОК, разливали по 3 см³ в пробирки, герметично укупоривали и помещали на хранение при температуре минус $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Питательные основы, среды, реактивы.

В работе использовали сырье, реактивы и материалы, прошедшие входной контроль и отвечающие требованиям ГОСТов, ОСТов, ТУ и статей Фармакопеи.

Таблица 1

Характеристика штаммов бруцеллезного микроба

Показатели	Наименование штамма	
	B.melitensis REV-1	B.abortus 19 VA
Место выделения (страна)	США	США
Дата выделения, год	1953	1923
Биотип	2	1
Патогенность	Слабовирулентный	Вакцинный
Вирулентность (ИД ₅₀) для белых мышей при подкожном заражении	$(1...10) \times 10^4$	$(1...10) \times 10^5$
Вирулентность (ИД ₅₀) для морских свинок при подкожном заражении	$(1...10) \times 10^4$	$(1...10) \times 10^5$

Для приготовления ППС использовали сухую коммерческую питательную среду для выращивания туляремийного микроба «FT-агар» согласно заводской инструкции (пропись 1). Жидкие питательные среды из разных гидролизатов готовили по прописям представленным в таблице 2.

Для приготовления ПК использовали защитную среду (пропись 6) следующего состава:

- сахароза, г/л 25;
- глицерин, мл/л 100;
- калия фосфат двузамещенный, г/л 2;
- вода дистиллированная, л до 1;

Для приготовления СК использовали защитную среду (пропись 7) следующего состава:

- сахароза, г/л 100;
- желатин, г/л 15;
- вода дистиллированная, л до 1;

Глюкозо- витаминную добавку (пропись 8) использовали следующего состава:

- глюкоза, г/л 500;
- никотиновая кислота, г/л 0,1;
- тиамин хлорид, г/л 0,01;
- вода дистиллированная, л до 1;

В качестве углеводного субстрата использовали 50 % раствор глюкозы (пропись 9):
 глюкоза, г/л 500;
 вода дистиллированная, л до 1;

Для разведения нативной культуры (НК) готовили разводящую жидкость (пропись 10):
 калий фосфорнокислый
 однозамещенный, г/л 3,54;
 калий фосфорнокислый
 двузамещенный, г/л 7,24;
 вода дистиллированная, л до 1;

Лабораторные животные.

Белые мыши аутбредные обоего пола, 8...10 — недельные, массой 16-20 г.

Морские свинки аутбредные обоего пола 2...3 — месячные, массой 300...350 г. использовались для изучения иммуногенности микробных культур. Для пассажа микробных культур через организм животных отбирали самцов морских свинок массой не менее 400 г.

Кролики аутбредные обоего пола, 4...6 — месячные, массой 2,0...2,5 кг.

Оборудование и аппаратура

Культивирование микробов проводили в конических колбах вместимостью 200 мл

Таблица 2

Прописи жидких питательных сред

Состав ЖПС, ед.измерения	Пропись 2	Пропись 3	Пропись 4	Пропись 5
Аминный азот, г/л	1,40±0,20	-	0...0,6	0,1...0,2
Аммиачный азот, г/л	-	1,75	1,75	1...2
Этилен диаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) двузамещенная натриевая соль дигидрат, г/л	-	-	0,394	-
Дрожжевой экстракт, г/л	-	1	0,5...2,5	2,0...3,0
Калий фосфорнокислый однозамещенный, г/л	-	-	1,13	1,13
Кальция хлорид, г/л	-	-	0,011	-
Железа сульфат, г/л	-	-	0,007	0,007
Марганца сульфат, г/л	-	-	0,002	0,002
Цинка сульфат, г/л	-	-	0,002	-
Меди сульфат, г/л	-	-	0,0004	-
Кобальта хлорид, г/л	-	-	0,0004	-
Магния сульфат, г/л	0,6	0,6	0,232	0,232
Натрий фосфорнокислый двузамещенный, г/л	2	2	-	-
Натрий хлористый, г/л	До 5	До 5	-	-
Глюкоза, г/л ¹⁾	10...25	10	22...28	22...28
Никотиновая кислота, г/л ¹⁾	0,002	0,002	0,002	0,002
Тиамин хлорид, г/л ¹⁾	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
Масло подсолнечное, мл/л	До 2	До 2	До 2	До 2

с коэффициентом заполнения 0,10...0,15, на шуттель-аппарате фирмы «New Brunswick» (США), оснащенный системой термостатирования. Кроме того, культивирование проводили в пятилитровых бутылках, в которые для аэрации и перемешивания подавали стерильный воздух. Также использовали лабораторные ферментеры МД-150 и МД-400, вместимостью 1,5 и 4,0 л соответственно, фирмы «Marubishi» (Япония) соответственно с коэффициентом заполнения 0,65. Все лабораторные ферментеры и аппараты -культиваторы оснащены системами термостатирования, рН- статирования и дробной подачи питательных субстратов.

Методы исследований

Морфологию микробов изучали путем микроскопии мазков окрашенных по Граму. Концентрацию живых микробов оценивали высевом серийных десятикратных разведений культур на чашки Петри с ППС с последующим подсчетом выросших колоний [22]. Общую концентрацию микробов в культурах определяли по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича на 10 ед. (ОСО 42-28-59-86П) с учетом коэффициента пересчета для бруцелл 1,7. Наличие признаков диссоциации в культурах бруцелл оценивали по данным пробы с трипафлавином, ее уровень в пробах Уайта Вильсона в соответствии с рекомендациями экспертов Комитета по бруцеллезу ФАО/ВОЗ.

Концентрацию водородных ионов и электрический потенциал в ПС, культурах и дополнительных растворах определяли на потенциометрах ЭВ-74, рН-673 и рН-150М; осмотическое давление — на автоматическом полумикроосмометре фирмы «Knauer». Для анализа аминокислотного состава ПС и КЖ использовали анализатор ЛЦ 5001 фирмы «Biotronic». Определение белков, пептидов

Методы планирования, математической и статистической обработки

Планирование факторных экспериментов осуществляли по методу Бокса-Уилсона. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали общепринятые математические методы. Результаты исследований приведены в виде средней арифметической и ее доверительного интервала, рассчитанного для вероятности 0,95.

Выбор питательной основы

При выборе питательной основы исходили из данных литературы, дающих достаточно обширные но противоречивые сведения и разнообразные по исходному сырью и способу приготовления гидролизатов. Поэтому первой задачей было изучение химических и физико- химических свойств традиционных и вновь созданных гидролизатов, используемых в ООО «Агровет». Сравнительная характеристика изучаемых гидролизатов приведена в таблице 3.

Таблица 3

Сравнительная характеристика гидролизатов, $\bar{X} \pm I_{95}$

Показатель, ед.изм.	Гидролизаты						
	ТГР КМ	СрКГ РКМ	ПГК	ФГБ ОКМ	СКГКд	ФГКр	СрКГКр
Общий азот, мг%	1454±246	1000±200	1208±80	1208±80	1203±68	875±60	992±280
Аминный азот мг%	672±93	600±100	992±280	992±280	992±280	992±280	992±280
Глубина расщепления белка, %	46	60	37	37	73	58	53
Продолжительность гидролиза, ч	120	2			2	48...72	2
Значение рН	7,33±0,28	3,5±1,0	7,7±0,1	7,7±0,1	2,66±0,44	7,34±0,18	7,09±0,24
Концентрация сульфат — иона,	-	1,1±0,5	-	-	-	-	1,1±0,5

Где:

ТГРКМ- триптический гидролизат рыбокостной муки

СрКГРКМ- сернокислотный гидролизат рыбокостной муки

ПГК — панкреотический гидролизат казеина

ФГБ ОКМ — ферментаативный гидролизат белков обезжиренного коровьего молока

СКГКд-солянокислотный гидролизат казеина деионизированный

ФГКр- ферментативный гидролизат крови

СрКГКр- сернокислотный гидролизат крови

Из данных, приведенных в таблице 3, видно, что белковые гидролизаты различаются практически по всем показателям. Наиболее значимые отличия задаются гидролизующими агентами. Кислотные гидролизаты имеют более высокую глубину расщепления (более 50%). Привлекательной стороной кислотных гидролизатов является возможность получения глубоких гидролизатов в короткие сроки (2ч), где одним положительным моментом является образование бактерицидных условий в ходе процесса (значение pH от 2,0 до 4,5), что предотвращает бактериальную контаминацию в ходе длительного хранения. Однако недостатком кислотного гидролиза может быть образование высоких концентраций солей при нейтрализации кислот, при сернокислотном гидролизе — хлоридов, при сернокислотном — сульфатов. Что требует дополнительных затрат на деионизацию. Кроме того, за счет соединений азота такие гидролизаты имеют большое количество зольности, чем также проигрывают в сравнении с ферментативными. В дополнение необходимо сказать, что ЖПС на основе недеинезированных сернокислотных гидролизатов обладают повышенной пенообразующей способностью, что требует при культивировании

микробов применения более эффективных пеногасителей чем обычно.

Ферментативные гидролизаты, как видно из таблицы, имеют среднюю глубину расщепления (37% для ПГК и ФГБ ОКМ, 46% для ТГРКМ). Только у ФГКр глубина расщепления более 55%. Отрицательной стороной ферментативного гидролиза является длительность процесса: от 48ч для ФГКр до 120ч для ТГРКМ. В дополнение к сказанному следует отметить, что при приготовлении ЖПС на основе ТГРКМ и ФГБ ОКМ, наблюдалась плохая фильтруемость питательной основы, что собственно и является ограничивающим фактором их широкого применения.

Следующий этап сравнительной оценки гидролизатов был связан с изучением их по целевому назначению — непосредственно ростовых свойств культивирования микробов. С этой целью из различных гидролизатов готовили жидкие ПС по прописи 2. Выращивание осуществляли в аэрируемых условиях по цепочке: пробирка-колба-аппарат.

Для посева в колбы использовали смывы с ППС (пропись 1) культуры. Культивирование проводили в колбах вместимостью 200 мл с 20 мл ЖПС, при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, частоте вращения платформы шуттель-аппарата

Таблица 4

Результаты культивирования *V.abortus* 19BA в колбах при использовании ЖПС из разных ПО, $\bar{X} \pm I_{95}$

Микробная культура штамма	Основа ПС	У(t)	Х(t)	pH	Доля диссоциированных клеток, процент
<i>V.abortus</i> 19 BA	ТГРКМ	24,6 \pm 1,2	22,6 \pm 4,1	7,7 \pm 0,2	менее 1
	СрКГРКМ	18,1 \pm 0,6	15,6 \pm 3,5	7,5 \pm 0,2	менее 1
	ПГК (глубина расщепления 36%)	20,1 \pm 1,3	21,6 \pm 1,8	6,9 \pm 0,3	менее 1
	ПГК (глубина расщепления 31%)	5,3 \pm 2,4	1,6 \pm 0,7	7,4 \pm 0,2	менее 1
	ФГБ ОКМ (глубина расщепления 31%)	11,1 \pm 0,7	10,5 \pm 0,7	6,9 \pm 0,2	менее 1
	СКГКд	8,4 \pm 0,4	7,9 \pm 0,3	7,5 \pm 0,2	менее 1
	ФГКр	18,9 \pm 0,9	21,4 \pm 3,6	7,6 \pm 0,3	менее 1
<i>V.melitensis</i> REV-1	СрКГКр	8,2 \pm 0,3	7,2 \pm 1,1	7,2 \pm 0,2	менее 1
	ТГРКМ	28,5 \pm 1,5	25,6 \pm 3,0	7,6 \pm 0,2	менее 1
	СрКГРКМ	19,5 \pm 0,9	18,5 \pm 2,5	7,5 \pm 0,2	менее 1
	ПГК (глубина расщепления 36%)	22,1 \pm 2,2	20,6 \pm 3,5	7,1 \pm 0,5	менее 1
	ПГК (глубина расщепления 31%)	15,3 \pm 3,0	11,6 \pm 2,5	7,5 \pm 0,2	менее 1
	ФГБ ОКМ (глубина расщепления 31%)	10,1 \pm 0,8	9,5 \pm 1,5	7,0 \pm 0,2	менее 1
	СКГКд	12,5 \pm 0,5	10,0 \pm 0,5	7,5 \pm 0,5	менее 1
ФГКр	22,5 \pm 1,0	20,4 \pm 5,6	7,6 \pm 0,3	менее 1	
СрКГКр	10,2 \pm 0,5	9,5 \pm 1,2	7,2 \pm 0,2	менее 1	

(240±20) мин⁻¹, в течение 48 часов. По истечении времени культивирования в пробах определяли рН, ОК, БК и долю диссоциированных клеток. Результаты культивирования в колбах, по данным пяти опытов, представлены в таблице 4., ОК и БК в таблице и далее нормированы к безразмерным величинам путем деления значений концентраций микробных клеток на определенный час роста на начальную концентрацию:

$$Y(t)=X(t) = \frac{M(t)}{N_0} \quad (1.1)$$

- где Y(t) — нормированное значение ОК в безразмерных единицах на час роста t;
 X(t) — нормированное значение БК в безразмерных единицах на час роста t;
 M(t) — концентрация мк.кл. x 10⁹ на час роста t;
 N₀ — начальная концентрация мк.кл. x 10⁹.

Результаты исследований.

Анализ результатов, представленных в таблице 4, показывает, что ЖПС на основе ферментативных гидролизатов в целом по накопительной способности микробных клеток превышают ЖПС из кислотных гидролизатов в 2...5 раз. ЖПС на основе ТГРКМ обладали наилучшими ростовыми свойствами. Среды на основе ПГК и ФГБ ОКМ с глубиной расщепления 31% непригодны для культивирования бруцеллезных микробов. Сравнительный анализ роста микробных культур различных производственных штаммов микроорганизмов показал, что штамм V.abortus 19ВА, отличается большей, по сравнению с другими штаммами бруцелл, требовательностью к питательным средам. Поэтому в дальнейшей работе в качестве тест-микроба использовали культуры штамма V.abortus 19ВА. Следующим этапом исследований было изучение особенностей выращивания штамма V.abortus 19ВА в бутылках. Целью эксперимента было оценка ростовых свойств питательных сред и определение фазы задержки накопления

Таблица 5

Результаты выращивания V.abortus 19ВА в бутылках при использовании ЖПС из разных ПО, $\bar{X} \pm_{95}$, n=5

Час роста	ПО	Y(t)	X (t)	pH	LN X	Доля диссоциированных клеток
0	ТГРКМ	1	1	7,21±0,24	0	-
	СрКГРКМ	1	1	7,21±0,247	0	
	СКГКд	1	1	21±0,24	0	
	ФГКр	1	1	7,21±0,24	0	
	СрКГКр	1	1	7,21±0,24	0	
12	ТГРКМ	4,5±0,2	0,96±0,21	7,40±0,03	-0,04	-
	СрКГРКМ	4,8±0,7	0,96±0,19	7,21±0,04	-0,04	
	СКГКд	4,9±1,1	0,93±0,37	7,18±0,01	-0,07	
	ФГКр	4,3±0,4	0,88±0,06	7,36±0,04	--0,13	
	СрКГКр	4,7±1,1	0,95±0,14	7,25±0,04	-0,05	
24	ТГРКМ	3,9±0,8	6,61±0,36	7,62±0,02	1,89	-
	СрКГРКМ	4,6±0,7	2,82±0,54	7,41±0,03	1,04	
	СКГКд	4,5±0,9	4,51±0,54	7,59±0,01	1,51	
	ФГКр	4,1±0,6	4,89±0,26	7,65±0,06	1,59	
	СрКГКр	5,4±1,2	2,27±0,07	7,55±0,01	0,82	
36	ТГРКМ	8,2±1,5	8,55±1,74	7,45±0,07	2,15	-
	СрКГРКМ	9,1±0,9	3,68±0,48	7,59±0,03	1,30	
	СКГКд	8,9±2,3	7,53±0,40	7,51±0,05	2,02	
	ФГКр	8,6±1,2	7,36±0,29	7,51±0,06	2,00	
	СрКГКр	9,2±1,8	3,61±0,63	7,67±0,05	1,28	
48	ТГРКМ	10,1±1,8	24,26±1,44	7,43±0,01	3,19	менее 1
	СрКГРКМ	9,4±1,9	11,13±2,32	7,57±0,11	2,41	менее 1
	СКГКд	10,8±2,2	16,77±1,43	7,59±0,21	2,82	менее 1
	ФГКр	10,5±2,3	18,33±0,89	7,39±0,19	2,91	менее 1
	СрКГКр	9,1±2,1	7,51±1,85	7,69±0,18	2,02	менее 1

Примечание. «-» — показатель не измерялся.

микробных клеток. Жидкие ПС готовили по прописи 2. В качестве посевного материала использовали смывы агаровых культур. Выращивание проводили в бутылках вместимостью 5л с 2,5л ЖПС, при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, уровне аэрации $(3,5 \pm 0,2)$ об.об.мин, в течение 48 часов. В процессе культивирования в пробах определяли рН, ОК ($Y(t)$), БК ($X(t)$) и долю диссоциированных клеток. Результаты культивирования бруцеллезных микробов в ЖПС из разных гидролизатов, представлены в таблице 5.

Анализ данных представленных в таблице, показывает, что среди испытываемых сред наибольшей накопительной способностью обладают среды на основе ТГРКМ и ФГКр.

При аэрации этих сред наблюдалось умеренное пенообразование, что позволило не менять параметров культивирования на

протяжении всего процесса. В то же время в средах на основе недеинезированных сернокислотных гидролизатов РКМ и крови с 3...6 часа роста наблюдалось сильное пенообразование. Это вынуждало снижать уровень аэрации в два и более раз. Указанное обстоятельство могло явиться причиной низких значений концентрации микробных клеток на 48 часов роста. По данным, представленным в таблице 5, построены кривые $Y(t)$ от t — рисунок 1, $X(t)$ от t — рисунок 2 и $\ln X$ от t , рисунок 3.

Нарастание ОК наблюдалось с самого начала, затем с 12 до 24 часов, перегиб характерный для диауксии и далее с 24 часа опять рост ОК.

Кривые роста представленные на рисунках 1 и 2, имеют характерную для накопления в ЖПС микробных клеток «S»-образную форму. На всех из них видны перегибы, свидетельствующие о диауксии, то есть последовательном потреблении субстратов. Нарастание ОК наблюдалось с самого начала, затем с 12 до 24 часов,

Кривые роста представленные на рисунках 1 и 2, имеют характерную для накопления в ЖПС микробных клеток «S»-образную форму. На всех из них видны перегибы, свидетельствующие о диауксии, то есть последовательном потреблении субстратов. Нарастание ОК наблюдалось с самого начала, затем с 12 до 24 часов, перегиб характерный для диауксии. По БК как правило, в начальный период времени происходит некоторое снижение концентрации микробных клеток БК, затем активное нарастание биомассы с 12 до 24 часов. С 24 часов на кривых наблюдается перегиб, характерный для диауксии и, затем с

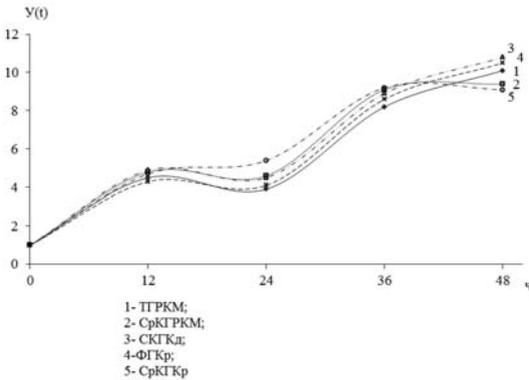


Рисунок 1. Кривые роста микробов штамма B.abortus 19VA по ОК в бутылках при использовании ЖПС из разных ПО

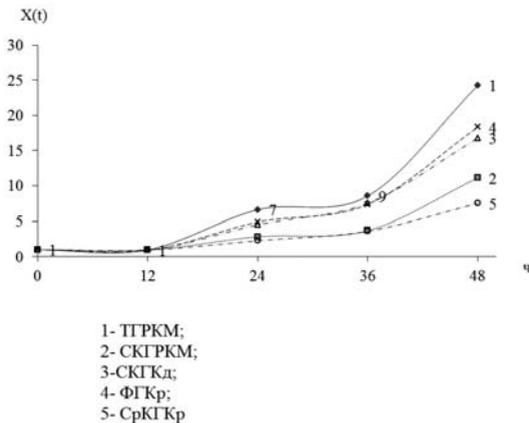


Рисунок 2. Кривые роста микробов штамма B.abortus 19VA по БК в бутылках при использовании ЖПС из разных ПО

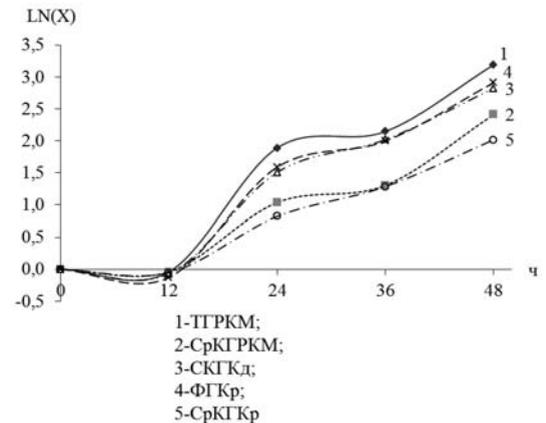


Рисунок 3. Графики кривых роста в полулогорифмических координатах

36 часов опять нарастание биомассы (рис.2). Таким образом кривая ОК смещена относительно кривой БК на 12 часов.

Отрезки с наибольшим углом наклона кривых роста в полулогарифмических координатах представлены на рисунке 3, на участке с 12 до 24 ч.

С 24 часов на кривых наблюдается перегиб, характерный для диауксии и, затем с 36 часов опять нарастание биомассы. Таким образом кривая ОК смещена относительно кривой БК на 12 часов.

Кривые роста в полулогарифмических координатах, представленные на рисунке 3, имеют наибольший угол наклона с 12 до 24 часов роста, что соответствует максимальной удельной скорости роста. Анализ этих отрезков, позволяет определить максимальную удельную скорость роста и продолжительность лаг- фазы — это отрезок отсекаемый на оси абсцис линиями с наибольшим углом наклона. Тангенс угла наклона этих линий, дает значение максимальных удельных скоростей роста. Соответственно расчетные показатели роста по расчетам уравнения регрессии представлены в таблице 6.

Продолжительность лаг- фазы, по таблице 6, во всех средах имеет незначительные отличия и в среднем составляет $(12,17 \pm 0,62)$ ч. Максимальные удельные скорости роста имеют существенные различия, наибольшее значение превышает наименьшее практически в два раза соответственно $0,16 \text{ ч}^{-1}$ для ЖПС на основе ТГРКМ и $0,07 \text{ ч}^{-1}$ для СрКГКр.

Практически равные значения продолжительности лаг-фазы и различие значений максимальных удельных скоростей роста, дают основание полагать, что индукционный период роста бруцеллезных микробов связан с адаптационными процессами в клетке, в первую очередь с синтезом необходимых ферментов, или ферментной системы.

Для подтверждения данного предположения был проведен дополнительный кинетический эксперимент при выращивании микробов штамма *V.abortus* 19ВА в ЖПС на основе ТГРКМ и СКГКд (по прописи 2), с разными концентрациями глюкозы, соответственно 1 г.л^{-1} и 10 г.л^{-1} . Результаты эксперимента по данным пяти опытов представлены в таблице 7.

Длительность лаг- фазы, определенная графоаналитическим способом, в ЖПС на основе ТГРКМ с концентрациями глюкозы 1 г.л^{-1} и 10 г.л^{-1} составила соответственно 14,0 и 12,9 ч, удельные скорости роста соответственно $0,097$ и $0,173 \text{ ч}^{-1}$. Для ЖПС на основе СКГКд с концентрациями глюкозы 1 г.л^{-1} и 10 г.л^{-1} длительность лаг- фазы составила соответственно 15,6 и 13,3 ч, удельные скорости роста соответственно $0,033$ и $0,140 \text{ ч}^{-1}$. Вариация значений продолжительности лаг- фазы, как при разных концентрациях глюкозы, так и при разных питательных основах, незначительна и находится в пределах $(13,95 \pm 1,17)$ ч. Различие удельных скоростей роста велико, значение которых в среде на основе ТГРКМ с концентрацией глюкозы 10 г.л^{-1} выше в

Таблица 6

Расчетные показатели роста микробов *V.abortus* 19ВА в ЖПС

Расчетные показатели роста, ед. изм.	ЖПС на основе...				
	ТГРКМ	ФГКр	СКГКд	СрКГРКМ	СрКГКр
Максимальная удельная скорость роста, $\text{м}_{\text{м}}, \text{ч}^{-1}$	0,16	0,12	0,13	0,09	0,07
Продолжительность лаг-фазы, ч	12,25	10,93	12,53	12,44	12,69

Таблица 7

Кинетика накопления микробных клеток *V.abortus* 19ВА в ЖПС на основе ... (по прописи 2), с концентрациями глюкозы....., $\bar{X} \pm 1_{95}$

Час роста, ч	ТГРКМ				СКГКд			
	1 г.л ⁻¹		10 г.л ⁻¹		1 г.л ⁻¹		10 г.л ⁻¹	
	X(t)	LN X	X(t)	LN X	X(t)	LN X	X(t)	LN X
0	1,0	0	1,0	0	1,0	0	1,0	0
14	1,0±0,3	0	1,2±0,2	0,18	0,9±0,3	-0,05	1,1±0,3	0,10
48	26,7±4,8	3,28	424,2±39,9	6,05	2,9±0,8	1,06	119,4±14,4	4,78

1,78 раза чем в среде с концентрацией глюкозы 1 г.л⁻¹. В ЖПС на основе СКГКд превышение равно 4,24 раза. Данный факт показывает индукционный период роста бруцеллезных микробов связан с адаптационными процессами в клетке, в первую очередь с синтезом необходимых ферментов, или ферментной системы.

Культивирование в бутылках с аэрацией показало, что среды на основе недеинезированных гидролизатов дают сильное пенообразование. В то же время, ЖПС на основе коммерческого сухого СРКГРКМ, отличается умеренным пенообразованием и соответственно вполне пригодно для глубинного культивирования бруцеллезных микробов.

Таким образом из рассмотренных гидролизатов практический интерес представляют СКГКд и ФГКр. ФГКр ранее не использовался при выращивании бруцеллезных микробов, поэтому был выбран в качестве объекта оптимизации.

Оптимизация прописи жидкой питательной среды

При оптимизации ЖПС на основе ФГКр, с целью выявления значимых факторов, на первом этапе проводили отсеивающий эксперимент.

Входными параметрами служили: концентрация аминного азота; осмотическое давление; концентрация витаминов. Крите-

рием оптимизации являлась концентрация микробных клеток. ЖПС на основе ТГРКМ использовали для контроля. Эксперимент проводили в колбах вместимостью 200 мл с 30 мл среды на термостатируемом шуттель-аппарате фирмы «Нью-Брюнсвик», при температуре (37±1)°С, частотой качания платформы (260±10) мин⁻¹, в течение 48 часов, в трех повторностях. План и результаты отсеивающего эксперимента представлены в таблице 8.

Анализ данных представленных в таблице 6, показывает, что рост и размножение микробных клеток не происходит в ЖПС без витаминов (вариант среды № 11) и при осмотическом давлении более 430 мосМ (вариант среды № 2). Использование витаминов: никотиновой кислоты и тиамин в концентрациях, соответственно, 2 и 0,2 мг.л⁻¹, обеспечивает достаточно высокий выход биомассы и повышение их концентраций не увеличивает его (варианты сред № 9 и № 10). Внесение в ЖПС дрожжевого экстракта (ДЭ) в качестве витаминного комплекса показало, что наибольший выход биомассы наблюдается при концентрации 60...80 мл.л⁻¹ (варианты сред № 3, 4,5). Наибольший эффект наблюдался при комбинированном введении витаминов и ДЭ (варианты сред № 11,12,13). Осмотическое давление в разных сериях ДЭ колебалось от 150 до 360мосМ, что, вероятно, связано с нестандартностью исходного сырья.

Таблица 8

План и результаты отсеивающего эксперимента в натуральных единицах

Номер варианта	ЖПС на основе ТГРКМ, г.л ⁻¹	ЖПС на основе ФГКр, г.л ⁻¹	Дрожжевой экстракт, мл.л ⁻¹	Тиамин хлорид, мг.л ⁻¹	Никотиновая кислота, мг.л ⁻¹	Осмотическое давление мосМ, $\bar{X} \pm I_{95}$	X (t), $\bar{X} \pm I_{95}$
1	-	0,6	-	0,2	2	292±13	9,3±0,8
2	-	1,8	-	0,2	2	454±18	менее 1
3	-	1,3	20	-	-	221±8	23,3±4,8
4	-	1,3	60	-	-	221±8	31,2±6,3
5	-	1,3	80	-	-	221±8	33,1±2,6
6	-	1,3	20	-	-	413±19	7,6±1,4
7	-	1,3	120	-	-	412±17	32,7±2,9
8	-	1,3	60	-	-	413±19	8,8±0,6
9	-	1,3	-	0,2	2	221±8	34,6±3,5
10	-	1,3	-	0,4	4	337±16	33,2±3,8
11	-	1,3	40	0,2	2	336±14	39,8±4,2
12	-	1,3	60	0,2	2	339±12	38,7±6,2
13	-	1,3	20	0,2	2	333±19	34,3±3,2
14	1,3	-	-	0,2	2	374±11	32,3±3,5
15	1,3	-	-	-	-	371±11	менее 1

Таким образом, значимыми показателями, влияющими на рост бруцеллезных микробов, являются осмотическое давление, концентрация дрожжевого экстракта и концентрация аминного азота. Осмотическое давление в ЖПС регулируется концентрацией хлорида натрия, поэтому в качестве факторов оптимизации были определены концентрации аминного азота (фактор X_1), концентрация дрожжевого экстракта (фактор X_2) и хлорида натрия (фактор X_3), критерием оптимизации, как и ранее, принято нормированное значение концентрации микробных клеток: Y_1 — результаты первого измерения, Y_2 — результаты второго измерения, Y_3 — результаты третьего измерения. Для облегчения последующих расчетов коэффициентов регрессии по результатам факторного эксперимента было проведено преобразование (кодирование) по следующей формуле :

$$X''_i = \frac{X_i - X_{i0}}{I_i} \quad (1.2)$$

- где X''_i — значение i -того фактора в кодированных переменных;
 X_i — значение i -того фактора на одном из уровней в натуральных единицах;
 X_{i0} — значение i -того фактора на основном уровне в натуральных единицах;
 I_i — единица варьирования i -того фактора в натуральных единицах.

План в кодированных единицах и результаты ПФЭ 2^3 представлены в таблице 10.

По результатам ПФЭ 2^3 с помощью встроенного пакета анализа в EXCEL- 97, включающей расчет коэффициентов регрессии и оценку их значимости по критерию Стьюдента (для $P=0,05$) было составлено уравнение регрессии:

$$Y = 10,93 + 1,91 * X_1 - 3,57 * X_3 - 2,81 * X_1 * X_3 \quad (1.3)$$

При доверительной вероятности равной 0,95, статистически значимыми коэффици-

Таблица 9

Уровни факторов и интервалы их варьирования

Наименование параметра	Числовые значения факторов, ед. изм.		
	X_1 , г.л ⁻¹	X_2 , мл.л ⁻¹	X_3 , г.л ⁻¹
Верхний уровень	1,7	120	5
Нижний уровень	0,7	40	1
Основной уровень	1,2	80	3
Единица варьирования	0,5	40	2

Таблица 10

План в кодированных единицах и результаты ПФЭ 2^3

Номер варианта	Кодированные значения факторов			Значение параметров оптимизации БК млрд.мк.кл.мл			
	X''_1	X''_2	X''_3	Y_1	Y_2	Y_3	\bar{Y}
1	-1	-1	-1	6	8	5	6
2	-1	-1	1	8	7	8	8
3	-1	1	-1	11	12	11	11
4	-1	1	1	9	12	11	11
5	1	-1	-1	18	19	17	18
6	1	-1	1	6	7	4	6
7	1	1	-1	21	24	22	22
8	1	1	1	4	5	7	5

Примечание. Y_1, Y_2, Y_3 — результаты первой второй и третьей повторностей опыта; \bar{Y} — средняя величина по трем повторностям.

ентами являются: 1,91- при концентрации аминного азота (фактор X_1), минус 3,57- при концентрации хлорида натрия (фактор X_2) и минус 2,81 комбинированного влияния концентрации аминного азота и концентрации хлорида натрия. Это позволили спланировать эксперимент по методу крутого восхождения, в соответствии с рекомендациями [76] представленного в таблице 11.

При оценке величины шага для параметра X_3 важно отметить что уже в седьмом опыте его пришлось бы исключить полностью. Поэтому в седьмом, восьмом и девятом опыте его концентрацию не снижали, а фиксировали на уровне 0,5 г.л⁻¹. Полученные результаты представлены в таблице 12.

Из данных, представленных в таблице 12 видно, что варианты, соответствующие 4,5 и 6 шагу оказались наилучшими. Таким образом, в результате проведенного опыта был установлен следующий состав ЖПС на основе ФГКр:

аминный азот, %..... 144...160
 хлорид натрия, г.л⁻¹.....1,5...0,5
 двузамещенный фосфат калия, г.л⁻¹..... 2,0;
 сульфат магния, г.л⁻¹..... 0,6;
 глюкоза, г.л⁻¹..... 10,0;
 дрожжевой экстракт, мл.л⁻¹.....80,0

тиамин хлорид, г.л⁻¹0,0002;
 никотиновая кислота, г.л⁻¹ 0,002;
 подсолнечное масло (пеногаситель),
 г.л⁻¹ 1,5.

Таким образом, в результате проведенных исследований была разработана и оптимизирована пропись ЖПС на основе ФГКр, которая отвечает питательным потребностям бруцелл.

Выращивание микробных культур вакцинных штаммов бруцелл в аппаратах

Следующим этапом работы оценивалась возможность получения микробных культур бруцеллезного микроба, пригодных для приготовления иммунобиологических препаратов против бруцеллезной инфекции сельскохозяйственных животных, с использованием жидкой питательной среды на основе ФГКр, приготовленной по оптимизированной прописи. Выращивание микробных культур вакцинных штаммов микроорганизмов *V.abortus* 19 VA и *V.melitensis* REV-1 для дальнейшего исследования кинетики накопления микробных клеток проводили в лабораторном ферментере С-30, фирмы «Нью Брюнсвик», оснащенном магнитной мешалкой, системой термостатирования и аэрации.

Таблица 11

План крутого восхождения

Величина	Числовые значения факторов	
	X_1 , г.л ⁻¹	X_3 , г.л ⁻¹
Основной уровень	1,20	3,0
Шаг крутого восхождения	0,08	-0,5

Таблица 12

Результаты реализации плана крутого восхождения

Номер варианта	Координаты точек крутого восхождения		Значение параметров оптимизации			
			БК млрд.мк.кл.мл			
	X_1	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	\bar{Y}
1	1,20	3,0	18,6	19,1	17,5	18,4
2	1,28	2,5	19,8	19,6	18,4	19,3
3	1,36	2,0	19,3	18,7	19,6	19,2
4	1,44	1,5	22,9	24,3	21,5	22,9
5	1,52	1,0	23,2	22,5	25,1	23,6
6	1,60	0,5	23,9	24,2	22,5	23,5
7	1,68	0,5	21,9	21,3	19,7	21,0
8	1,76	0,5	16,7	18,2	17,1	17,3
9	1,84	0,5	14,3	16,1	16,9	15,8

Контроль pH проводили с помощью проточной pH- ячейки. В процессе культивирования отбирали пробы, в которых определяли ОК, БК, pH, содержание аминокислот. Культивирование микробов штаммов *B. abortus* 19VA и *B. melitensis* Rev-1 проводили в ЖПС на основе ФГКр с концентрацией аминного азота 1,3 гл⁻¹. Кинетика накопления микробных клеток, представлена в таблице 13, потребления аминокислот в таблицах 14 и 15.

Анализ данных представленных в таблице 13, показывает, что рост и размножение микробных клеток штамма *B. abortus* 19VA происходит более динамично с максимальной удельной скоростью 0,231 ч⁻¹, чем штамма *B. melitensis* Rev-1 максимальная удельная скорость роста которого 0,231 ч⁻¹. Исследования кинетики накопления микробных клеток проводили в лабораторном ферментере МД-400, фирмы «Марубиси», оснащенном магнитной мешалкой, системой термостатирования, pH- статирования и аэрации.. В качестве посевного материала использовали 20 часовую культуру выращенную в бутылках в при аэрации (2,0±0,5)об.об⁻¹.мин⁻¹. Посевная доза в аппарате составляла 10% по объему. В процессе культивирования контролировали pH и eH, а также отбирали пробы, в которых определяли ОК, БК, концентрация глюкозы, содержание аминокислот. Концентрацию глюкозы поддерживали на уровне 4...6 гл⁻¹ до 26 часа роста. Культивирование микробов штаммов

B. abortus 19VA и *B. melitensis* Rev-1 проводили в ЖПС на основе ФГКр . Уровень потребления аминокислот в процессе развития и роста микробной популяции бруцеллезных микроорганизмов, представлены в таблицах 14 и 15. Кинетика накопления микробных клеток, и потребления углеводного субстрата. представлена в таблице 16 и 17. Оценка результатов представленных в таблицах 14,15 показывает, что уровень потребления аминокислот микробными клетками имеет существенные различия. Общее потребление аминокислот при культивировании микробов штамма *B. abortus* 19VA составило для данных условий 55%, для микробов штамма *B. melitensis* Rev-1 34,%. Общим для двух штаммов является динамика потребления прежде всего глутаминовой кислоты для штамма *B. abortus* 19VA- 93% и 86% для *B. melitensis* Rev-1; глицина, соответственно 75 и 54%; аланина 59 и 29%; тирозина 65 и 39%; гистидина 46 и 80%; аргинина 24 и 43%. В соответствии с данными представленными в таблицах 14 и 15 имеются отличия в характере потребления аминокислот: треонина, серина, пролина, валина, метионина, фенилаланина.

Накопление микробных клеток, по результатам представленным в таблицах, происходит в две фазы, с 0 до 22 часов роста и с 22 до 40 часов. В начальный период происходит снижение концентрации БК. Максимальная удельная скорость роста 0,1811ч⁻¹.

Таблица 13

Кинетика накопления микробных клеток штаммов..., в лабораторном ферментере С-30, X±I₉₅, n=5

Час роста, ч	<i>B. abortus</i> 19VA			<i>B. melitensis</i> Rev-1		
	pH	ОК	X(t)	pH	ОК	X(t)
0	7,20±0,10	1,0±0,1	1,0±0,1	7,20±0,10	1,0±0,1	1,0±0,1
6	7,35±0,04	5,6±1,7	1,4±0,3	7,32±0,08	5,2±1,4	1,1±0,1
9	7,42±0,08	11,6±3,7	2,8±1,1	7,41±0,11	8,3±2,6	1,3±0,2
12	7,56±0,18	16,5±4,9	6,0±2,1	7,48±0,12	8,9±2,3	2,5±0,6
15	7,54±0,12	17,9±4,3	11,9±3,9	7,55±0,18	9,8±1,9	4,3±1,0
18	7,52±0,21	18,8±2,5	14,6±1,9	7,55±0,22	10,1±1,6	4,9±1,1
24	7,66±0,23	21,7±2,6	17,6±2,2	7,57±0,19	11,2±0,9	5,9±1,4
27	7,72±0,19	27,6±3,7	20,9±2,4	7,61±0,13	12,5±0,7	7,0±1,6
33	7,81±0,22	33,3±1,3	39,4±5,9	7,70±0,18	16,5±0,6	14,7±3,4
36	7,82±0,25	34,2±2,1	44,8±4,3	7,71±0,22	19,1±0,8	19,7±4,6
39	7,78±0,22	44,3±3,9	47,6±2,3	7,67±0,24	21,1±1,9	23,9±3,5
42	7,73±0,27	48,5±4,8	52,9±2,9	7,63±0,17	27,8±2,3	29,5±2,8
44	7,69±0,23	50,6±5,2	55,4±2,8	7,70±0,17	35,2±2,2	45,2±2,9
48	7,80±0,25	55,6±5,2	61,4±2,8	7,70±0,20	40,2±2,2	47,2±2,9

Таблица 14

Кинетика потребления аминокислот при культивировании микробных клеток штамма *V. abortus* 19ВА, в лабораторном ферментере С-30, $\bar{X} \pm I_{95}$

Наименование аминокислот	Концентрация аминокислот, мг·л ⁻¹ , на час роста....						
	0	8	16	24	32	40	48
Аспарагиновая кислота	967±37	922±46	943±23	927±39	599±17	620±17	682±34
Треонин	1480±67	1432±59	1425±46	1382±58	918±32	991±49	1130±56
Серин	1250±61	1145±54	987±19	370±41	286±17	265±6	251±11
Глутаминовая кислота	2324±89	760±32	470±19	395±16	186±7	122±61	147±78
Глицин	1247±51	1070±38	956±37	820±33	400±41	340±37	310±67
Аланин	1690±78	1700±72	1730±49	1680±69	774±32	930±78	1190±97
Валин	2227±59	2230±110	2190±83	2200±103	1055±81	1230±62	1572±147
Метионин	592±25	585±17	480±13	407±18	254±31	275±47	404±51
Изолейцин	620±19	612±41	680±29	795±21	461±42	392±51	374±39
Лейцин	1900±95	1860±93	1990±49	2010±95	1046±48	980±111	1320±46
Тирозин	490±19	515±22	695±32	840±42	267±17	242±37	281±53
Фенилаланин	1488±17	1505±23	1680±84	1720±97	676±61	710±49	901±146
Гистидин	871±29	880±41	827±37	789±34	671±64	647±61	623±75
Триптофан	669±21	676±17	594±9	507±48	444±19	450±24	466±47
Лизин	615±16	630±27	720±35	782±42	521±16	607±24	733±51
Аргинин	612±22	636±29	630±18	622±29	532±14	539±46	558±52

Таблица 15

Кинетика потребления аминокислот при культивировании микробных клеток штамма *V. melitensis* Rev-1, в лабораторном ферментере С-30, $\bar{X} \pm I_{95}$

Наименование аминокислот	Концентрация аминокислот на час роста..., мг·л ⁻¹						
	0	8	16	24	32	40	48
Аспарагиновая кислота	852±30	833±26	845±23	627±39	599±15	520±12	492±25
Треонин	1680±67	1582±59	1500±66	1311±68	1888±45	1300±50	1380±56
Серин	1100±51	1005±54	988±20	278±45	166±17	95±60	31±25
Глутаминовая кислота	1324±89	760±38	170±80	95±16	86±71	22±65	37±78
Глицин	817±41	870±35	456±44	420±22	120±51	110±37	90±68
Пролин	1829±33	1260±42	667±51	638±43	450±29	280±15	256±14
Аланин	1490±88	1700±72	730±49	680±69	274±45	330±78	210±95
Валин	2127±59	2130±99	1790±85	1700±103	1055±86	830±32	1072±47
Цистин	15±30	13±15	55±19	53±22	74±50	77±34	94±55
Метионин	692±20	685±15	580±33	507±18	354±35	275±67	104±55
Изолейцин	580±29	592±41	600±30	585±11	411±45	355±55	314±39
Лейцин	1600±90	1760±95	1790±49	1110±95	1005±58	880±111	620±77
Тирозин	590±19	535±22	595±32	540±42	227±17	145±37	161±55
Фенилаланин	1408±17	1405±23	1550±84	1120±97	596±45	640±59	601±146
Гистидин	681±29	685±41	627±37	680±34	571±48	547±71	523±85
Триптофан	649±29	677±27	590±90	527±58	414±59	440±28	456±37
Лизин	622±16	600±30	620±35	782±62	520±36	607±44	735±21
Аргинин	592±22	616±29	610±28	610±29	539±34	545±45	550±42

Рост и размножение клеток прекращается при значении pH равной 7,7...8,0. Потребление глюкозы заканчивается на 22 часа роста. Характер потребления аминокислот, по данным представленным в таблице 14 и 15, имеет также двухфазный характер, до 22 часов и с 22 до 40 часов роста. До 22 часов роста используются практически на 100% серин и глутаминовая кислота. В разной степени утилизируются аспарагиновая кислота, пролин, изолейцин, тирозин и гистидин. Не потребляется треонин. С 22 часов роста происходит переключение питания на треонин, и возрастает скорость использования аспарагиновой кислоты. Кроме того снижается скорость утилизации пролина и прекращается потребление изолейцина, тирозина, гистидина. Глицин, аланин, метионин, лецин, фенилаланин утилизируются на протяжении всего цикла культивирования практически с равномерной скоростью. На протяжении всего цикла

культивирования происходит накопление цистина, что вероятнее всего связано с окислительно- восстановительными процессами происходящими в среде.

Двухфазный рост бруцелл вероятнее всего связан с характером потребления глюкозы. При ее полной утилизации на 24 часа роста происходит переключение питания бруцелл на углеводный скелет аминокислот. В результате дезаминирования аминокислот происходит выделение свободного аммиака в среду и, соответственно, защелачивание среды. В связи с данным фактом, напрашивается вывод о возможности регулирования процесса культивирования бруцелл за счет дозированного введения глюкозы.

Вторым важным моментом является то, что посевная культура во второй фазе роста, то есть, когда уже синтезирована ферментная система для утилизации углеводного скелета аминокислот, а также произошли значитель-

Таблица 16

Кинетика накопления микробов штамма *B. melitensis* Rev-1 в ЖПС на основе ФГКр, $\bar{X} \pm I_{95}$

Час роста	Значение pH	Значение eH	Осмотическое давление мОМ	Концентрация глюкозы, г.л ⁻¹	X(t)	LN (\bar{X})
0	7,2±0,1	26±2,2	253±10,9	8,24±0,35	1	0
3	7,4±0,1	18±1,5	219±9,4	8,14±0,24	0,6±0,1	0,51
14	7,7±0,2	-10±0,9	195±8,4	5,56±0,17	4,5±0,3	1,50
22	7,6±0,2	-33±2,8	182±7,8	0,61±0,23	5,2±0,3	1,65
40	7,9±0,3	-39±2,4	179±7,7	0	17,9±1,2	2,88
44	8,0±0,2	-33±3,2	-	-	6,2±0,1	1,83

Таблица 17

Кинетика накопления микробов штамма *B. abortus* 19 ВА в ЖПС на основе ФГКр, $\bar{X} \pm I_{95}$, n=5

Час роста	Значение pH	Значение eH	Суммарное потребление глюкозы, г.л ⁻¹	БК, x10 ⁹ мк.кл.	ОК, x10 ⁹ мк.кл.
0	7,0±0,2	33±9	0	0,36±0,01	3,45±0,5
3	7,4±0,1	-16±6	0	0,61±0,05	5,75±0,5
6	7,5±0,2	-112±19	0,61±0,61	5,50±0,44	6,9±0,6
9	7,5±0,2	-140±28	4,10±0,21	9,00±0,72	8,05±0,6
12	7,5±0,3	-147±24	7,80±0,39	13,30±1,06	10,3±0,8
15	7,3±0,2	-136±12	11,10±0,56	20,00±1,60	13,8±1,1
18	7,2±0,2	-114±8	14,50±0,73	30,00±2,40	17,25±1,4
21	7,0±0,2	-110±6	18,00±0,90	41,00±3,28	21,85±1,7
24	6,9±0,2	-108±7	21,00±1,05	54,00±4,32	27,6±2,2
27	6,9±0,2	-109±6	23,20±1,16	66,00±7,92	36,8±4,4
30	6,9±0,2	-119±8	24,80±1,74	77,00±9,24	42,6±5,1
33	6,9±0,2	-123±14	26,30±1,84	84,50±10,14	55,2±6,6
36	7,4±0,2	-123±17	27,20±1,92	88,00±10,56	57,5±6,9
39	7,8±0,2	-119±22	27,20±1,86	87,00±10,44	57,5±6,9

ные изменения химического состава среды, при введении в производственную питательную среду с исходным химическим составом и при наличии в ней глюкозы, перестраивает метаболизм на первую фазу, с чем вероятнее всего и связан длительный лаг- период, продолжительностью 12...14 часов. В связи с чем, для сокращения лаг- периода предлагается использовать посевной материал находящийся в первой фазе роста, то есть 20...24 часовую культуру.

Заключение

В настоящее время проблема совершенствования и стандартизации процесса приготовления глубинных культур бруцелл в технологии приготовления профилактических препаратов против бруцеллезной инфекции сельскохозяйственных животных является актуальной. Сравнительный анализ ростовых свойств различных питательных основ и сред, изученных в процессе проведения работы показал, что наиболее приемлемой и предпочтительной для культивирования бруцеллезного микроба производственных штаммов *B. abortus* 19 VA и *B. melitensis* Rev-1 является питательная среда, приготовленная на основе ферментативного гидролизата крови крупного рогатого скота. В результате проведенных исследований была разработана и оптимизирована пропись жидкой питательной среды на основе ФГКр, которая полностью отвечает питательным потребностям бруцелл.

Список литературы

1. Эффективность вакцинопрофилактики бруцеллеза животных в России / Гулюкин М.И., Альбертян М.П., Искандаров М.И., Федоров А.И., Боровой В.Н., Коломыцев С.А. // Ветеринария. 2008. — № 9. — С. 7-12
2. Шумилов, К.В. Вакцины против бруцеллеза крупного рогатого скота / Шумилов К.В., Альбертян А.А. и др. // Ветеринария. 1984. — № 12. — С.26-28.
3. Складов, О.Д. Разработка и совершенствование средств и методов диагностики бруцеллеза и кампилобактериоза животных: Дисс. докт.вет. наук: 16.00.03 / О.Д. Складов; ФГУ «ВГНКИ». М., 2006. — 245 с
4. Джалилов К.Д. Бруцеллез. — Ташкент, 1975.
5. Кортев А.И., Перекопская Т.И., Хитрина Н.П. Бруцеллез человека — Пермь, — 1976.
6. Биологические свойства вакцинного штамма *B.abortus* 104-M / Шумилов К.В., Альбертян М.П., Ключков А.А., Ромахов В.А. // Труды Всесоюзного

института экспериментальной ветеринарии. — 1983. — т. 57. — С.42-47.

7. Вершилова, П.А. Значение диссоциации для дифференциации группы *Brucella*. / Вершилова П.А. // Архив биологических наук. 1939. — Т.53. — ВыпЛ. — С. 48-56.
8. Бирюков В.В., Кантере В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. М. — Наука, 1985.,
9. Максимов Н.Н., Федоров В.Д. применение методов математического планирования экспериментов при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. — М. — изд. Московского университета, 1969.
10. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978., 332 с.
11. 38. Ферментация и технология ферментов: Пер. с англ. / Уонг Д., Кооней Ч., Демайн А. и др. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983, 336
12. Руднев Г.П. Бруцеллез, клиника, диагностика, лечение. — М., 1955.
13. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents / D.R.Franz, P.B.Jahrling, A.M.Friedlander et al. // JAMA. — 1997. Vol.278, № 5 — P.399-411.
14. Кортев А.И., Перекопская Т.И., Хитрина Н.П. Бруцеллез человека — Пермь, — 1976.
15. V.S. army activity u the V.S. biological wafare program. — Washington: Departament of the Army, 1977.
16. Локтева, Ф.П. Испытание противобруцеллезной формолквасцовой вакцины против бруцеллеза / Локтева Ф.П. // Ветеринария. 1946. — № 7. — С.20-21.
17. Гидролизаты крови для микробиологических питательных сред/ С.М.Смирнов, М.К.Тлеугабылов, М.Ф.Шмутер и др. // Журн. Лабораторное дело. — 1990. Вып.10. — С.68...71.
18. The *Brucella* vortex aeration cultur apparatus/ G.C. Drimmelen. — applied microbiology VGNI, 1953.
19. Molecular typing of *Brucella* with cloned DNA probes / F.Grimond, J.M.Varger, P.Cornels et al. // Rev. Microbiol. — 1992. — Vol.142. — P.55-65.
20. Вершилова, П.А. Бруцеллезная химическая вакцина пролонгированного защитного действия / Вершилова П.А., Драновская Е.А., Самойленко И.И. // Материалы 1-ой Всесоюзной конференции: Теоретическая и прикладная инфекционная иммунология. Москва, 1982. — С.58.
21. Лимитирование и ингибирование микробиологических процессов, Пушино, 80.
22. Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирования экспериментов. — Л. — 1975.
23. Руднев Г.П. Бруцеллез, клиника, диагностика, лечение. — М., 1955

*Контактная информация:
Шведов Д.В.
8-8335426320*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

BEDOEVA Z.M.
LLC "Agrovet"

COMPARATIVE EVALUATION OF ANTAGONISTIC ACTIVITY OF LACTOBACILLUS STRAINS PRODUCTION

Study on the antagonistic activity of *Lactobacillus* strains (*L. plantarum* strain number 2, *L. buchneri* strain number 3 and *L. plantarum* 8RA-3) is set high antimicrobial activity to test cultures of pathogenic bacteria strains of *L. Plantarum*, which has a higher adhesiveness expressed acidifying capacity and antagonistic action against the test strains of pathogenic bacteria in comparison with the strain number *L. buchneri* 3.

Keywords: *Lactobacillus*, antagonistic activity, adhesive products and lactic acid strain

Кишечные заболевания, возникающие в результате дисбактериозов, кишечных дисфункций регистрируются практически во всех странах мира и по экономическому ущербу занимают второе место. В зависимости от уровня ведения животноводства, птицеводства, потери от воспроизводства поголовья, вследствие распространения данных заболеваний, могут достигать от 10 до 50 процентов. Это обусловлено комплексом причин различного характера: ухудшением экологической ситуации, ростом иммунодефицитных состояний, повышением аллергизации, нарушением микробиоценоза в результате нерационального применения антибактериальных препаратов. Именно этот факт становится дополнительным в распространении условно-патогенной микрофлоры, обладающей устойчивостью к антибиотикам и химиопрепаратам, что влечет за собой целый спектр заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ, функционирования иммунной системы, синтезом витаминов и незаменимых аминокислот, их всасыванием, а также поступлением в организм микро- и макроэлементов.

Многолетние клинические наблюдения за лечебной и профилактической эффективностью пробиотиков на основе представителей микрофлоры кишечника показали, что они практически не обладают побочными эффектами при длительном их применении.

Представители нормальной кишечной микрофлоры выполняют и регулируют многочисленные функции организма. Физиологическая роль нормофлоры обусловлена за-

щитной и синтезирующей функциями, участием в конечном звене пищеварения. Бактерии и продукты их жизнедеятельности способствуют процессу высасывания и гидролиза жиров, улучшают белковый и минеральный обмен, обезжиривают углеводы, растворяют клетчатку, стимулируют перистальтику кишечника, способствуя нормальной эвакуации его содержимого.

Необходимость применения пробиотиков в качестве лечебно-профилактического средства при диарейных заболеваниях животных объясняется тем, что видовой состав и количество симбиотной микрофлоры у 1,4,8 и 12-дневных животных характеризуется предпосылками возникновения дисбактериоза и способствует заселению желудочно-кишечного тракта патогенной и условно-патогенной микрофлорой. Эти данные подтверждаются исследованиями больных поросят-сосунков с синдромом диареи и выделением у них эшерихий серотипов 08 и 026, цитробактера, диплострептококка, энтерококка типа «Д», патогенных для белых мышей.

Наиболее перспективным направлением, по мнению исследователей является создание нового поколения препаратов смешанного состава, состоящих из разных штаммов пробиотиков, а их действие основано на синергизме эффекта комбинации.

При создании группы препаратов необходимо учитывать следующие основные моменты:

1) Наличие существующих технологий приготовления аналогичных препаратов.

Таблица 1

Результаты изучения факторов пробиотической активности лактобацилл

Штаммы комбинации лактобактерий	Значения среднего показателя адгезии СПА, $X \pm I_{95}$	Величина ширины зоны задержки роста индикаторных микроорганизмов, мм. (M+g)							Значение предельного кислотообразования, $T_0 (X \pm I_{95})$, градус Тернера
		<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pr.vulgaris</i>	<i>Pr.mitrabilis</i>	<i>Sh.sonnei</i>	<i>Sh.flexneri</i>	<i>Ps.auruginosa</i>	
<i>L.plantarum</i> штамм № 2	8,20±1,14	10,2±0,3	9,6±0,3	9,6±0,2	9,4±0,4	9,9±0,2	9,5±0,4	9,6±0,3	245,6±15,0
<i>L.buchneri</i> штамм № 3	9,10±1,18	7,3±0,4	8,0±0,6	6,4±0,5	7,5±0,4	7,4±0,6	7,5±0,5	7,4±0,4	209,6±18,0
<i>L.plantarum</i> 8PA-3	5,34±0,59	9,0±0,4	8,4±0,3	7,9±0,2	7,9±0,2	9,5±0,3	8,4±0,4	8,8±0,3	214,3±14,0

Примечания:

1. В таблице приведены средние значения и доверительный интервал по результатам 10 опытов определений.
2. Выращивание культур лактобактерий проводили на жидкой питательной среде МРС.

2) Отсутствие взаимного негативного влияния компонентов создаваемого пробиотического препарата в процессе его приготовления и использования.

Целью настоящей работы является сравнительная оценка антагонистической активности *L.plantarum* штамм № 2, *L.buchneri* штамм № 3 и *L.plantarum* 8PA-3

При проведении предварительных исследований были изучены биологические и пробиотические свойства исследованных штаммов лактобактерий, характер их взаимодействия (антагонистическое, синергидное, индифферентное).

В результате проведенных исследований была высокая противомикробная активность к тест штаммам штаммов *L. Plantarum*, которые характеризовались высокой адгезивностью, выраженной кислотообразующей способностью и антагонистическим действием в отношении тест-штаммов патогенных микробов (таблица № 1).

Анализ результатов свидетельствует о том, что штаммы лактобактерий *L.plantarum* штамм № 2, *L.buchneri* штамм № 3 и *L.plantarum* 8PA-3 в целом имеют достаточную антимикробную активность в отношении тест штаммов патогенных и условнопатогенных бактерий. Более высокую антагонистическую активность проявляли штаммы *L.plantarum*.

Библиографический список:

1. Антипов В.А. Использование пробиотиков в животноводстве// Ветеринария, 1991. — № 4. — С.55-58
2. Малик Н.И. Пробиотики: теоретические и практические аспекты/ Н.И. Малик, А.Н. Панин// Птицефабрика, 2006. — С.20-26
3. Панин А.Н. Повышение эффективности пробиотикотерапии у поросят/ А.Н. Панин, Н.И. Серых//Ветеринария, 1996. — № 5. — С.12-13

Контактная информация:
Бедоева З.М.
тел.8 495 3776997

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОТИВОПАРАЗИТАРНОГО, БЫСТРО ДЕГРАДИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА ЛИПОМЕК

Проведены испытания новой липосомальной формы 0,2 % абамектин содержащего препарата липомек при экзо-и эндопаразитах, показано его низкая токсичность для теплокровных, быстрое преодоление гематоэнцефалического барьера и высокая эффективность по сравнению с авермонмек содержащий 1 % авермектинов.

Ключевые слова: эндо-, экзо- паразиты, животные, овцы, гельминтозы, псороптоз, вши, абамектин, авермектины, липомек, липосома.

DEVRIKHOV A.D.

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

EXPERIMENTAL TESTS BIOSYNTHETIC ANTIPARASITIC, THE DRUG IS RAPIDLY DEGRADED LIPOMEK

Tests of the new liposomal form 0.2 % abamectin containing drug lipomek at ecto and endo-parasites, shows its low toxicity to warm-blooded, fast overcoming the blood brain barrier and high efficiency compared to avermonmek containing 1 % avermectins.

Keywords: endo-, exo-parasites, animals, sheep, helminth infections, common scab, lice, abamectin, avermectin, lipomek liposome.

Одной из серьезных проблем отечественного животноводства является борьба с эндо- и экзопаразитами продуктивных животных. Она заключается в том, что имеющиеся средства борьбы (как правило, продукты химического и микробиологического синтеза) не являются абсолютно безопасными для самих теплокровных. В этой связи, основной задачей разработок рациональных лекарственных форм является минимизация токсического воздействия на организм животного при достижении требуемой эффективности.

Задача эта обусловлена еще и тем, что при проведении профилактической или лечебной обработки даже в установленных терапевтических дозах животное испытывает существенное недомогание и дискомфорт, что неизбежно сказывается на его продуктивности. Кроме того, существуют жесткие параметры нормирования, устанавливающие максимально допустимые концентрации инсектоакарицидов в продуктах животноводства, что также накладывает серьезные ограничения на порядок и частоту применения препаратов.

Возможность и целесообразность разработки рациональных рецептурных форм ин-

сектоакарицидов для ветеринарии была изучена на примере разработки нанодисперсного липосомального препарата липомек, действующим началом которого является смесь авермектинов (субстанция абамектина). Выбор именно этого действующего вещества был сделан исходя из его высокой токсичности к широкому спектру эндо- и экзопаразитов, приемлемой токсичности для теплокровных (в частности, для продуктивных животных), показанной ранее возможности моделирования токсозффектов на мелких лабораторных животных и невысокими показателями персистенции этого препарата в окружающей среде. Уникальность механизма действия авермектинов на широкий круг гельминтов, насекомых и клещей. состоит в том, что у гельминтов они подавляют (блокируют) передачу нервного импульса от брюшного шнура к двигательным нейронам, т.е. между нейронами. Авермектин и ивермектин во-первых, стимулируют предсинаптическое выделение гаммааминомасляной кислоты (ГАМК), которая является стимулятором торможения, во-вторых, усиливают постсинаптическое связывание ГАМК с рецепторами, в ре-

зультате чего теряется способность к управлению мышцами. У членистоногих (иксодовые и чесоточные клещи, вши, насекомые, личинки гиподерматоза, гастрофилеза, эдемагеноза, эстроза, цепаноматоза, риноэстероза, цефалопиноза, носовые оводы и др.) они аналогично блокируют передачу сигнала между нерво-мышечными блоками, усиливая связывание ГАМК с ГАМК-рецепторами [153].

В качестве препарата сравнения был взят разработанный ранее препарат авермонмек, успешно применявшийся при обработке крупного и мелкого рогатого скота при пастбищном содержании, представляющий собой 1 % раствор авермектина в пропиленгликоле с добавлением 0,01 % Твин-80.

Разработка лабораторной прописи препарата липомек.

В качестве основных исходных данных, взятых за основу при проведении разработки макетного образца, были приняты следующие:

- препарат должен обеспечивать эффективность, не меньшую, чем аналог, при концентрации действующего вещества (ДВ) в 2-3 раза более низкой по сравнению с аналогом;
- форма препарата должна сохранять стабильность (дисперсной системы) в течение не менее одного года;
- форма препарата должна обеспечивать более низкую токсичность по сравнению

с аналогом в пересчете на действующее вещество;

- токсичность препарата не должна повышаться в процессе хранения.

В основу разработки макетного образца была положена опытно-промышленная технология, применявшаяся ранее для производства липосомального сырья для получения косметических препаратов [].

Поскольку сама субстанция действующего вещества (Абаментин) проявляет существенную поверхностную активность, на первом этапе исследований была проведена оценка возможности максимального введения абаментина в состав липосомального препарата. В ходе этой группы экспериментов было показано, что препарат сохраняет требуемую стабильность дисперсной системы в течение необходимого времени (по тестам ускоренного хранения) при концентрации ДВ менее 0,2 %.

Проведенные исследования данной прописи препарата по тестам ускоренного хранения показали, что препарат способен сохранять физическую стабильность в течение 18 мес..

Острая токсичность. Токсичность оценивали на белых беспородных мышах, получавших различную дозу препаратов. Как показывают данные, представленные в табл. 1, доза препаратов по ДВ ниже 15 мг/кг мало токсична для мышей, а при введении препарата в дозе 90 мг/кг наблюдается 100%-ная гибель животных. Среднесмертельная доза,

Таблица 2

Токсичность препаратов липомек и авермонмек для белых мышей

Липомек						
Группа животных	Кол-во животных	Кол-во ДВ, мг/кг	Кол-во ДВ, мкг/гол	Выжило, голов	Пало, голов	% Летальности
1	6	15	300	6	0	0 %
2	6	35	600	5	1	16,6 %
3	6	45	900	4	2	33,3 %
4	6	55	1100	3	3	50,0 %
5	6	90	1800	0	6	100 %
6	6	Контроль	0	6		0 %
Авермонмек						
Группа животных	Кол-во животных	Кол-во ДВ, мг/кг	Кол-во ДВ, мкг/гол	Выжило, голов	Пало, голов	% Летальности
1	6	15	300	6	0	0 %
2	6	25	500	5	1	16,6 %
3	6	40	800	3	3	50,0 %
4	6	60	1200	2	4	66,6 %
5	6	90	1800	0	6	100 %
6	6	Контроль	0	6	0	0 %

рассчитанная Керберу- Ашмарину, по ДВ для препаратов липомек и Авермонмек составляет, соответственно, 56,8 и 45,8 мг/кг массы животных (табл.2).

Интоксикация у мышей проявлялась признаками угнетенного состояния, мышечного тремора, судорог, что характерно для отравления авермектинами из-за их нейротоксического действия.

Из полученных результатов следует, что оба лекарственных средства — липомек и авермонмек — можно считать малотоксичными веществами IV класса опасности, и что токсичность действующего вещества в составе липосомального препарата выражена в значительно меньшей степени.

Оценка хронической токсичности. Изучение хронической токсичности препаратов проводилось на беспородных белых крысах массой 110-120 гр. Первой опытной группе из 6 животных вводили подкожно препарат авермонмек с интервалом 14 дней в дозе 40 мг/кг в течение 3-х месяцев. Другой группе из 6 животных вводили подкожно с интервалом 14 дней 6 раз по 20 мг/кг по ДВ, что соответствует примерно 1/1075 от LD50.

Второй опытной группе из 6 животных вводили подкожно препарат липомек с интервалом 14 дней в течение 3-х месяцев в дозе 60 мг/кг по ДВ. Другой группе из 6 животных вводили подкожно этот препарат с интервалом 14 дней в течение 3-х месяцев по 30 мг/кг по ДВ, что соответствует примерно 1/1075 от LD50.

Контрольные животные обрабатывались препаратами без ДВ по аналогичной схеме. В течение 3-х месяцев наблюдений не было отмечено негативного воздействия обоих препаратов на физиологическое состояние животных. По внешним признакам и по массе тела опытные и контрольные животные также существенно не отличались. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что препарат липомек при длительном применении не вызывает интоксикации у животных и не обладает кумулятивными свойствами.

Общая и местная реактивность организма животных на введение липомек. Местное раздражающее и кожно-резорбтивное действие препарата липомек изучали в опытах с использованием 6 кроликов и 6 морских свинок методом накожных аппликаций и втирании однократном и многократном нанесении препарата в виде липосомальной эмульсии. Препарат наносили на участки кожи бхбсм в дозе 2 мл.

Установлено, что препарат липомек не вызывает гиперемии, отека, зуда на месте ап-

пликации, у животных не выявлено признаков токсикоза. Общее состояние животных оставалось без изменений. При втирании в кожу липосомальной эмульсии липомека а также липосом без ДВ гиперемии не наблюдалось. Препарат достаточно быстро всасывался в кожу животного, не вызывая внешних признаков токсикоза и дискомфорта.

Таким образом, препарат липомек, обладая достаточно выраженными кожно-резорбтивными свойствами, не вызывает признаков токсического поражения животных и кожно-аллергических реакций при многократном нанесении на кожу. Полученные данные позволяют сделать вывод о возможности эффективного применения препарата не только путем парентеральной, но и трансдермальной аппликации.

Результаты токсикологических исследований и изучения реактивности организма животных позволили приступить к дальнейшей оценке эффективности макетного образца препарата Липомек на продуктивных животных в условиях производственного эксперимента.

Изучение противопаразитарной эффективности липомек при лечении паразитозов овец. Для проверки противопаразитарной эффективности препарата Липомек были проведены предварительные производственные испытания на 401 овцах, спонтанно зараженных гельминтами, вшами и чесоточными клещами (Таб. 3).

Перед обработкой животных препаратом в лабораторных условиях проводились копроскопические и микроскопические исследования отобранных проб. При этом экспериментально было выявлено, что подопытные животные (овцы) в основном поражены нематодами (*Ostertagia*, *Cooperia*, *Nematodermella*, *Triostrogylus*, *Haemonchus*, *Nematodirus*, *Chabertia*, *Bunostomum* и др.), вшами (*L. pedalis*, *L. ovis*), псороптозом (*P. ovis*, *P. bovis*).

Препарат липомек подкожно вводили животным согласно разработанному наставлению в дозе 1,0 ем3 на 50кг живой массы. Противопаразитарную эффективность препарата оценивали спустя 20 суток после его применения на основе паразитологических исследований, а также внешнего осмотра животных.

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что препарат липомек обладает высокой антипаразитарной активностью. Количество овец, полностью освободившихся от паразитов после применения препарата липомек высокое т.е. эффективность липомека находится в пределах 99,8-100%.

Эффективность липомек при лечении паразитозов овец

Группа животных	Всего обработано животных (n)		Выздоровели/%		Сравнительная эффективность %
	липомек	авермонмек	липомек	авермонмек	
Овцы, пораженные псороптозом, опыт	80	20	80/100	15/75	125
Овцы, пораженные вшами, опыт	60	60	60/100	49/81,6	118,4
Овцы, пораженные гельминтами, однократная обработка	281	200	278/99	172/86	114
Овцы, поражены вшами и гельминтами, двукратная обработка	40	40	40/100	34/85/	115
Овцы, поражены вшами и гельминтами, (чистый контроль)	20	20	0	0	0

В исследованных 281 пробе фекалий, обработанных препаратом липомек овец яиц гельминтов не обнаружено. При этом в 20 пробах фекалий взятых у овец контрольной группы содержались яйца гельминтов, т.е. инвазированность составляла 100%.

Эффективность препарата против эктопаразитов, а именно, против вшей и псороптоза, также достаточно высокая — 100%. После однократного применения препарата липомек из 281 подопытных овец полностью освободились от паразитов 278 голов, а после

двукратной обработки выздоровели все животные. При этом у всех 20 овец контрольной группы были выявлены вши и псороптоз, т.е. инвазированность составляла 100%.

Таким образом, результаты производственного эксперимента показали, что разработанный опытный образец нанодисперсного липосомального препарата липомек малотоксичен и обладает высокой противопаразитарной эффективностью.

Контактная информация:
8 495 6385274

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 632.95

В.М. БАКУЛИН, Е.М. ГОРДЕЕВА,
Н.С. КОНДРАТЬЕВА, М.К. БАКУЛИН
ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров

Ю.С. ОВСЯНИКОВ
ФГБОУ ВПО «Вятская государственная
сельскохозяйственная академия», Киров

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЛИФОСАТУСТОЙЧИВЫХ ИЗОЛЯТОВ ПРОТЕОБАКТЕРИЙ PROTEUS VULGARIS И PSEUDOMONAS ALCALIGENES В БИОТЕХНОЛОГИИ ДЕГРАДАЦИИ ГЛИФОСАТА, ЗАГРЯЗНЯЮЩЕГО ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ

В работе представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о перспективности использования культур глифосатустойчивых изолятов протеобактерий *Proteus vulgaris* и *Pseudomonas alcaligenes*, выделенных из загрязненной глифосатом почвы, в биотехнологических процессах глубинного культивирования и деградации этого ксенобиотика, загрязняющего окружающую среду.

Ключевые слова: бактерии, биodeградация, глифосат, глубинное культивирование.

V.M. BAKULIN, E.M. GORDEEVA, N.S. KONDRATIEVA, M.K. BAKULIN

Vyatka state university, Kirov

YU.S. OVSYANNICOV

Vyatka state agricultural academy, Kirov

ISOLATION AND USE OF THE GLYPHOSATE RESISTANT ISOLATES PROTEOBACTERIA PROTEUS VULGARIS AND PSEUDOMONAS ALCALIGENES IN BIOTECHNOLOGY DEGRADATION GLYPHOSATE CONTAMINATING THE ENVIRONMENT

In the work presented the experiment data of the perspectives of using glyphosateresistant isolates of the proteobacteria *Proteus vulgaris* and *Pseudomonas alcaligenes*, from soil polluted with glyphosate, in biotechnological processes of deep cultivating and degradation that xenobiotics, contaminating the environment.

Key words: bacteria, biodegradation, glyphosate, deep cultivating.

Синтетические фосфонаты являются основой многих ксенобиотиков и широко распространены среди химических веществ антропогенного происхождения, среди которых отравляющие вещества, создаваемые в качестве химического оружия — VX, зарин и зоман; гербицид глифосат (фосфонометилглицин); производные этил- и фенилфосфонатов, используемые как инсектициды; алафосфалин и фосфономицин (бисфосфонаты) — антибиотики; циклические эфиры ароматических бисфосфонатов — полимерные добавки; фирол-76 — пламягаситель, полиаминополифосфоновые кислоты ингибиторы коррозии [1-3].

Однако наиболее широко используемым в мире фосфонатом является гербицид системного действия глифосат, который служит основой более трех десятков препаратов, выпускаемых под разными фирменными названиями и потребляемых в больших количествах (только в США ежегодно применяется около 22 000 тонн этого гербицида, производимого известными фирмами «Монсанто», «Дау Агро Сайэнс» и др., в Украине — 1500 тонн) [цит. по 4]. Использование биологических методов утилизации токсичных фосфонатов, к которым относится и глифосат, отходов их производства и продуктов разложения, рассматривается российскими и зарубежными специалистами в качестве главной альтернативы физическим и химическим методам защиты окружающей среды от токсикантов этого типа [1, 2].

В этом плане актуальными являются исследования, проводимые вятскими биотехнологами и микробиологами (ВятГУ и ВятГСА), по созданию биологических консорциумов на основе штаммов-биодеструкторов, разработке новых биотехнологических под-

ходов комплексного использования их для уничтожения ксенобиотиков, в том числе фосфонатов в природных и искусственных средах [5-7].

Практический интерес представляет использование глифосатустойчивых изолятов протеобактерий, выделенных из почвы в местах мест интенсивного использования глифосата, в биотехнологии деградации фосфонометилглицина.

Целью настоящей работы являлась сравнительная оценка эффективности разложения глифосата почвенными изолятами протеобактерий.

Материалы и методы исследования. Для тестирования чувствительности псевдомонад к глифосату использовали препарат Раундап («Монсанто», США), содержащий 36% глифосата.

Штаммы микроорганизмов. В работе использованы вновь выделенные изоляты протеобактерий *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas alcaligenes* и ранее выделенный изолят *P. fluorescens* с типичными родовыми и видовыми свойствами, в качестве контроля — ранее описанные штаммы из коллекции биодеструкторов ВятГУ [5, 6].

Питательные среды. Для выращивания микроорганизмов использовали плотную питательную среду, содержащую: картофельный крахмал — 1,0%; соевую муку — 3,0%; $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ — 0,6%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,4%; CaCO_3 — 0,8%; K_2HPO_4 — 0,01%; глюкозы — 2,0%; агара — 2%, воды водопроводной — до 100% и жидкую среду того же состава — без агара «соевая среда».

Микробиологические методы. Количественный анализ содержания глифосата в почве проводили хроматографическим методом групповой принадлежности поч-

венных микроорганизмов, получение накопительных и выделение чистых микробных культур проводили микробиологическими методами [8-12].

В качестве посевного материала использовали двухсуточные культуры бактерий, выращенные на плотной среде при температуре 24-28°C. Культуры, выросшие на плотной среде, смывали физиологическим раствором и разводили до концентрации $1,5 \cdot 10^9$ бактерий в см^3 .

В колбы Эрленмейера объемом 500 вносили по 62,5; 250,0 и 1000,0 мкл препарата Раундап (22,5; 90,0 и 360,0 мг глифосата), затем готовой жидкой средой доводили объем рабочей смеси в колбах до 140 см^3 и вносили по $10,0 \text{ см}^3$ исследуемых посевных культур. Конечная концентрация бактерий в среде при посеве составляла $1,0 \cdot 10^8$ протеобактерий в см^3 , глифосата — 150 и 600 $\text{мкг} \cdot \text{см}^{-3}$. Выращивание вели при температуре 24-28°C на шуттеле со скоростью вращения платформы 250 об./мин. Через 24 ч культивирования проводили определение количества живых бактерий в средах путем высева серийных разведений на плотные среды. Родовую и видовую принадлежность выделяемых получаемых микробных культур проводили с использованием идентификационных тест-систем (наборов) МИКРО-ЛА-ТЕСТ, производства PLIVA — Lachema (Чехия) и прилагаемых к ним Code book [12].

Результаты исследования. Культуры протеобактерий *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas alcaligenes* были выделены и идентифицированы при исследовании микробной обсеменности проб почвы, отобранных на участках сельхозугодий в Оричевском и Новоятском районах Кировской области, которые многократно подвергались воздействию глифосата. При каждой обработке методом распыления расход на 100 м^2 поля, предназначенного под посев овощных культур и картофеля, в среднем составлял 5 литров водного раствора, содержащего 65-70 мл 36%-ного глифосата.

В августе 2013 г. было отобрано четыре группы образцов почвы по 5 проб в каждой: 1 группа — образцы почвы, не обрабатываемой ранее гербицидами (контроль почвы перед обработкой глифосатом); 2 группа — образцы почвы, обработанной однократно в июле 2013 г., с последней обработки до взятия пробы прошел один месяц; 3 группа — образцы почвы, обработанной 11 раз в предшествующие пять лет (2008–2012 гг.) в весенне-летний период, при этом с последней обработки прошел год; 4 группа — пробы

почвы, обработанной 11 раз в предшествующие пять лет (2008–2012 гг.) в весенне-летний период и дополнительно однократно в июле 2013 г., с последней обработки до взятия проб прошел один месяц.

Результаты анализов свидетельствовали, что общее количество микроорганизмов менялось в зависимости от количества обработок гербицидом, так в 1 группе (контрольной) образцов почвы средняя концентрация микроорганизмов составляла $8 \cdot 10^5$ КОЕ/г, в 2-4 группах — $5 \cdot 10^2$; $9 \cdot 10^4$; $2 \cdot 10^4$ соответственно (рис. 1).

Полученные результаты свидетельствуют, что обработка гербицидом почвы приводит к резкому снижению концентрации микроорганизмов в ней. Через месяц после однократной обработки глифосатом количество микроорганизмов в исследуемых образцах почвы было меньше в 1600 раз в сравнении с контрольными. Через год после многократной (11 раз в течение 5 лет) обработки гербицидом концентрация микроорганизмов в почве в значительной степени восстановилась, но была ниже, чем в контроле примерно в 8,9 раза. В этом случае, по-видимому, сказывалось накопление глифосата и продуктов его разложения в почве. Результаты определения концентрации микроорганизмов в четвертой группе проб показали, что микрофлора почвы, регулярно подвергавшейся обработке глифосатом, стала устойчива к по-

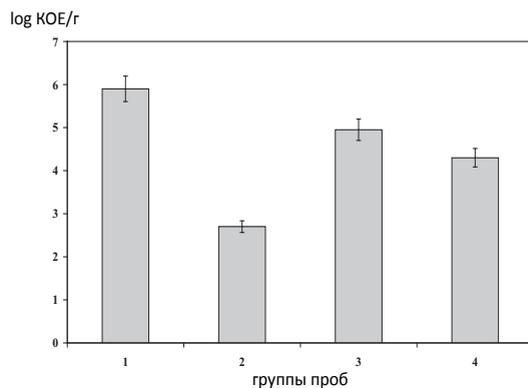


Рис. 1. Содержание общего количества микроорганизмов (log колониобразующих единиц — log КОЕ) в 1 г проб почвы:

1 — не подвергавшейся воздействию глифосата (контроль до воздействия гербицидом); 2 — обработанной однократно в июле 2013 г. за месяц до отбора и анализа проб; 3 — подвергавшейся воздействию глифосата 11 раз в течение предшествующих пяти лет (2008–2012 гг.); 4 — подвергавшейся воздействию фосфометилглицина 11 раз в течение предшествующих пяти лет (2008–2012 гг.) и 1 раз в 2013 г., за месяц до отбора и анализа проб

Распределение изолятов бактерий по уровням устойчивости к глифосату

Видовая принадлежность культур бактерий	Количество изолятов (из числа выделенных), способных к росту в жидкой питательной среде с глифосатом в концентрации ..., мкг/см ³			
	0,006	0,025	0,1	0,4
<i>P. alcaligenes</i>	-	1	3	2
<i>Pr. vulgaris</i>	-	2	1	1
<i>P. fluorescens</i> *	-	-	5	2
<i>P. alcaligenes</i> 214**	1	-	-	-
<i>Pr. vulgaris</i> MC 12**	1	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> 1457**	1	-	-	-

Примечание:

* культуры изолятов, выделенные ранее [5];

** культуры изолятов, ранее не контактировавшие с гербицидом

вторным воздействиям гербицида и быстрее восстанавливалась. Об этом свидетельствуют результаты сравнительного анализа через месяц после обработки глифосатом образцов проб почвы, многократно подвергавшейся воздействию глифосата в предшествующие годы и первично обработанной глифосатом, среднее содержание микроорганизмов в образцах проб почвы группы 4 было в 50 раз выше, чем в образцах почвы группы 2.

В ходе исследований образцов почвы многократно обработанных глифосатом (12 раз в течение 6 лет) были выделены и идентифицированы по 6 изолятов бактерий видов *Pseudomonas alcaligenes* и 4 изолята *Proteus vulgaris*, которые наряду с ранее выделенными [5] изолятами *P. fluorescens* обладали повышенной устойчивостью к токсическому действию глифосата в сравнении с контрольными лабораторными штаммами, не контактировавшими с гербицидом (табл. 1).

При этом 3 из вновь выделенных 10 изолятов *P. alcaligenes* и *Pr.vulgaris* (30%) были способны к росту в жидкой среде, содержащей 0,4 мкг/см³ глифосата, 4 изолята (40%) и 3 изолята (30%) бактерий были способны к росту в жидкой среде, содержащей соответственно 0,1 и 0,025 мкг/см³ фосфонометилглицина.

На основе первичных изолятов, устойчивых к 0,4 мкг·см⁻³ глифосата, в результате восьми пересевов культур в жидкой соевой среде с возрастающими концентрациями глифосата и отбора наиболее устойчивых клонов, были выделены клоновые культуры *Pr. vulgaris* 3/8, *P. alcaligenes* 5/8 и *P. fluorescens* 047/8 с резистентностью к 50, 110 и 250 мкг·см⁻³ глифосата соответственно (рис. 2).

Как видно из данных, представленных на рис. 2, при равной исходной чувствительно-

сти к глифосату нарастание устойчивости к нему у изолята псевдомонад вида *fluorescens* происходило более интенсивно, чем у изолята вида *alcaligenes* и вульгарного протей. В результате 8 пассажей на средах с возрастающими концентрациями глифосата культура *P. fluorescens* 047/8 повысила уровень устойчивости первичного изолята в 625 раз, в то время как культура *P. alcaligenes* 5/8 — в 275 раз, культура *Pr. vulgaris* 3/8 — в 125 раз.

На следующем этапе исследований представлялось целесообразным оценить возможность использования глубинных культур полученных вариантов в процессах деструкции глифосата в лабораторных условиях глубинного культивирования и при их интродукции в контаминированную данным гербицидом почву.

При глубинном культивировании всех трех исследуемых культур в «соевой среде»

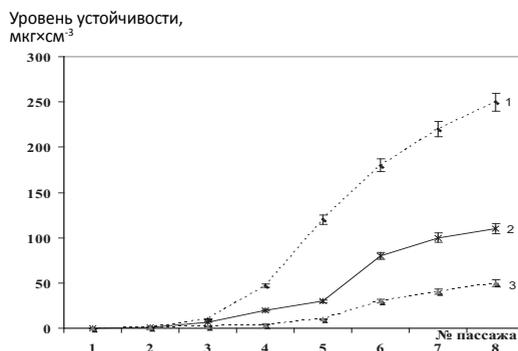


Рис. 2. Изменение уровней устойчивости бактерий в процессе восьми пассажей культур изолятов на среде с возрастающими концентрациями глифосата: 1 — *P. fluorescens* 047/8; 2 — *P. alcaligenes* 5/8; 3 — *Pr. vulgaris* 3/8

Инактивация глифосата в жидкой «соевой среде» при глубинном культивировании псевдомонад

Микроорганизм	Концентрация глифосата в жидкой среде, мкг·см ⁻³		Содержание живых бактерий в среде через 24 ч, КОЕ·см ⁻³
	исходная	после культивирования (% от исходной)	
<i>P. fluorescens</i> 047/8	0	0	6,2·10 ⁹
	150	15 (10,0)	3,8·10 ⁹
	600	200 (33,3)	0
<i>P. alcaligenes</i> 5/8	0	0	4,9·10 ⁹
	150	75 (50,0)	0,4·10 ⁸
	600	450 (75)	0
<i>Pr. vulgaris</i> 3/8	0	0	5,7·10 ⁹
	150	110 (73,3)	0,3·10 ⁶
	600	510 (85,0)	0
Контроль (инактивация гербицида в среде без бактериальных культур)	150	140 (93,3)	-
	600	560 (93,3)	-

без гербицида при посевной концентрации 1,0·10⁸ КОЕ·см⁻³ через сутки биомасса составляла (4,9–6,2)·10⁹ КОЕ·см⁻³ (табл. 1). Внесение в среду 150 мкг·см⁻³ глифосата сопровождалось снижением исходной концентрации бактерий после засева в случае культур вариантов *Pr. vulgaris* 3/8 и *P. alcaligenes* 5/8 до 0,3·10⁶ и 0,4·10⁸ КОЕ·см⁻³, при этом концентрация глифосата в среде снижалась на 26,7–50,0%. Культура *P. fluorescens* 047/8 была способна расти на среде, содержащей 150 мкг·см⁻³ гербицида, при этом она способствовала инактивации за сутки 90% гербицида, хотя концентрация бактерий повысилась за сутки только до 3,8·10⁹ КОЕ·см⁻³, что в 1,6 раза ниже, чем в среде без глифосата. Следует отметить, что 6,7% глифосата в контрольных средах инактивировалось без участия бактерий (табл. 2).

Далее был поставлен эксперимент по контаминации образцов стерильной черноземной почвы (рН 6,7) глифосатом из расчета 2400 мкг·см⁻³ с последующей инокуляцией в нее глубинной культуры *P. alcaligenes* 5/8, выращенной в «соевой среде» с 150 мкг·см⁻³ глифосата, до конечной концентрации в почве 1,0·10⁸ КОЕ·см⁻³. В качестве контроля была использована та же почва без инокуляции микробной культуры. Уже через 5 часов после инокуляции глифосат в почве с внесенной в нее культурой *P. alcaligenes* 5/8 глифосат не определялся, в то время как в контрольных образцах его содержание в этот период снизилось за счет связывания с частицами почвы, действия почвенных солей и других факторов только до 1200–1400 мкг·см⁻³. Следует отме-

тить, что период нормального полураспада глифосата в почве в зависимости от типа почв, как было установлено специалистами US EPA, находится в диапазоне от 3 до 130 дней [13].

Выводы.

1. В результате 8 пассажей на средах с возрастающими концентрациями глифосата получены варианты *Pr. vulgaris* 3/8, *P. alcaligenes* 5/8 и *P. fluorescens* 047/8 с резистентностью к 50, 110 и 250 мкг·см⁻³ глифосата, что превышает уровни устойчивости первичных изолятов (исходных культур) в 125; 275 и 625 раз соответственно.

2. Инокуляция культуры варианта *P. alcaligenes* 5/8 в концентрации 1,0·10⁸ КОЕ·см⁻³ в стерильные образцы черноземной почвы, содержащей 2400 мкг·см⁻³ глифосата, привела к тому, что гербицид в почве не определялся уже через 5 часов, что свидетельствует о возможности создания с использованием данной глифосатрезистентной культуры специальных препаратов для ремедиации загрязненных этим ксенобиотиком почв.

Список литературы

1. Кононова, С.В. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами / С.В. Кононова, М.А. Несмеянова // Биохимия, 2002. — Т. 67, Вып. 2, № 6. — С. 220-233.
 2. Ефременко, Е.Н. Экологически безопасная биодegradация реакционных масс, образующихся при уничтожении фосфорорганических отравляющих веществ / Е.Н. Ефременко, Н.В. Завьялова, Д.А. Гудков, И.В. Лягин и др. // Рос. хим. об-во им. Д.И. Менделеева, 2010. — Т. 54, № 4. — С. 19-24.

3. Кузнецова, Е.М. Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков / Е.М. Кузнецова, В.Д. Чмиль // Современные проблемы токсикологии, 2010, № 1. — С. 87-95.

4. Жариков, М.Г. Изучение влияния глифосатсодержащих гербицидов на агроценоз / М.Г. Жариков, Ю.Я. Спиридонов // Агрехимия, 2008, № 8. — С. 81-89.

5. Бакулин, В.М. Выделение бактерий рода *Pseudomonas* из почвы, загрязненной ксенобиотиком фосфометилглицином / В.М. Бакулин, Е.А. Мартинсон, М.К. Бакулин, Н.С. Мячина, Ю.С. Овсянников // Ветеринарная медицина, 2012, № 1. — С. 9-11.

6. Бакулин, М.К. Интенсификация биодegradации нефти и нефтепродуктов под влиянием перфтордекалина / М.К. Бакулин // Прикл. биохимия и микробиология, 2004. — Т. 40, № 3. — С. 317-322.

7. Бакулин, М.К. Влияние перфтордекалина и карбогала на рост микроорганизмов-нефтедеструкторов в ассоциации с азотобактером на жидкой синтетической среде с нефтью / М.К. Бакулин,

А.Ю. Плетнева, А.С. Грудцына, Л.В. Бакулина // Биотехнология, 2006, № 6. — С. 44-50.

8. Evans, C.G.T. Methods in Microbiology / C.G.T. Evans, D. Herbert, D. Tempest // 1970. — P. 277-327.

9. Клисенко, М.А. Методы определения микрочисленности пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде : Справочник. — В 2 тт. / М.А. Клисенко, А.А. Калинина, Г.А. Холькова. — М.: Колос, 1992. — Т 1, 567 с.

10. Виноградский, С.Н. Микробиология почвы / С.Н. Виноградский, — М.: Изд-во АН СССР, 1952, 370 с.

11. Звягинцев, Д.Г. Биология почв / Д.Г. Звягинцев, И.П. Бабьева, Г.М. Зенова. — М.: Изд-во МГУ, 2005, 445 с.

12. ЛАХЕМА, Брно, Чешская Республика: diagnostics@lachema.cz, http://www.lachema.cz.

13. Pesticide Fact Handbook : US EPA. Noyes Data Corporation. Park Ridge, New Jersey, 1990. — Vol. 2. — P. 301-312.

Контактная информация:
Бакулин В.М.
vladbakulin@rambler.ru

УДК: 615.453.2.

ДЕВРИШОВ Д.А., БРЫЛИНА В.Е.
ФГБОУ ВПО МГАВМиБ

ШВЕДОВ Д.В.
ООО «Агровет»

КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ МИКРОБНОЙ МАССЫ БРУЦЕЛЛЕЗНОЙ ВАКЦИНЫ ИЗ ШТАММА *B. MELITENSIS* REV-1

Разработаны технические параметры концентрирования микробной культуры бруцелл из штамма *B. melitensis* Rev-1 на фильтрационной установке «Сартакон-2» с использованием модулей с размером пор 0.2 мкм., что позволило повысить концентрацию микробных клеток с 2.3×10^9 до 16.6×10^{10} без изменения биологических и протективных свойств вакцинного препарата.

Ключевые слова: бруцеллез, штамм Rev-1, концентрирование, микрофилтрация.

DEVRIKSHOV D.A., BRYLINA V.E.
MGAVMB

SWEDOV D.V.
LLC «Agrovet»

CONCENTRATION OF MICROBIAL MASS BRUCellosis VACCINE STRAIN OF *B. MELITENSIS* REV-1

Developed technical parameters of concentration of the microbial culture of *Brucella* strain *B. melitensis* Rev-1 on the filtration plant "Sartakon 2" using modules with a pore size of 0.2 microns, resulting in increased concentration of microbial cells to 2.3×10^9 16.6×10^{10} without altering the biological and protective properties vaccine preparation.

Keywords: brucellosis, strain Rev-1, concentration, microfiltration.

Бруцеллез широко распространен во многих странах мира, особенно в странах

Средиземноморского бассейна, Африки, Центральной и Южной Америки и Азии. Бо-

лезнь регистрируется в ряде европейских стран и Закавказье. В России также имеет распространение в ряде регионах: Северный Кавказ, Ставропольский край, Ростовская и Самарская области, Забайкалье. Распространению бруцеллеза способствует и условия ведения животноводства в ряде стационарно неблагополучных регионах: отгонное овцеводство, круглогодичное пастбищное содержание животных, а также наличие в дикой фауне больных животных или бактерионосителей (зайцы, сайгаки, лисицы, грызуны, дикие кабаны).

Важное значение в организации противоэпизоотических мероприятий имеет обеспечение противобруцеллезными вакцинами. В обеспечении качественными вакцинами немаловажное значение имеет технологический процесс эффективного производства.

Глубинный метод культивирования бруцеллезных микробов в этом отношении является наиболее технологичным, позволяющим регулировать и контролировать все стадии получения микробной массы. Сдерживающим фактором использования глубинного метода культивирования до настоящего времени является высокая предрасположенность производственных штаммов бруцелл к диссоциации, сопровождающаяся изменением биологических и иммуногенных свойств микробов, их требовательность к составу питательных сред и низкая концентрация биомассы.

Данные литературы свидетельствуют о том, что предлагаемые для выращивания питательные среды основаны на использовании гидролизатов мяса и рыбокостной

муки. Такие питательные среды переменны как по составу белковых компонентов, так и по содержанию балластных редуцирующих веществ. В тоже время, по мнению ряда ученых, возбудитель бруцеллеза может расти в средах с единственным источником азота в виде глутаминовой или аспарагиновой кислоты, а также аммонийных солей щавелевой, уксусной или лимонной кислоты. Также ряд авторов показывает возможность реализации процесса микробиологического синтеза с использованием сред, где в качестве источника азота является аммиак или соли аммония. Технология с использованием таких сред относительно просто реализуется и основана на выращивании микробных культур при добавлении в биореакторы, по определенной программе, лимитирующих рост и размножение клеток, питательных субстратов.

Однако, учитывая небольшие выходы биомассы при глубинном выращивании в биореакторах, актуальным является разработка способа повышения концентрации микробных клеток в полуфабрикаты вакцины используемого для последующего высушивания.

Целью настоящих исследований являлось изучение возможности концентрирования микробной биомассы возбудителя бруцеллеза через полимерные фильтры для ультра- и микрофльтрации.

Методы и материалы.

Микробные культуры, которые использовались в качестве рабочих материалов были получены в результате глубинного культивирования в аппаратах-культиваторах типа БИОР-0,1 и 0,25.

Таблица 1

Основные параметры полимерного фильтра.

Наименование показателей	Показатели
Сырье	Ацетат целлюлоза
Внешний вид	Пленка белого цвета, поверхность гладкая без трещин, наплывов, складок и разрывов, с ровными краями.
Толщина сред, мкм	120
Рабочий диапазон pH	в пределах 4-8
Реакция на воду	Гидрофильная
Термическая прочность, °C	до 180 °C
Адсорбтивная способность	Низкая
Давление разрыва, бар	0.4
Производительность по дистиллированной воде при P 1 бар, мл/мин см ²	0.20 мкм = 18-26

Концентрирование микробной массы проводилось методами самоосаждения, осаждением с добавлением карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) в 2% концентрации из расчета 0,2% сухого вещества к объему микробной взвеси. и концентрирование антигена из штамма *B. melitensis* Rev-1 на фильтровальной установке для ультра- и микрофльтрации типа «САРТАКОН-2» (*«Владисарт» г. Владимир).

В таблице 1 приведены основные параметры полимерного фильтра для ультра- и микро фльтрации.

На рисунке 1 представлен внешний вид полимерного фильтра и используемой установки «САРТАКОН-2».

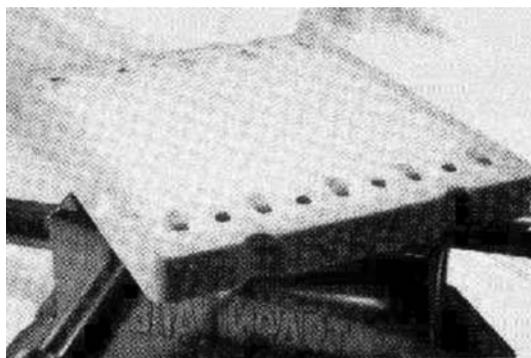
Результаты исследований. Концентрирование микробной массы бруцеллезной вакцины методом самоосаждения показал, что этот процесс занимает много времени 3 — 5 сут., происходит при температуре от 2 — 8°C и недостаточен для получения высокой концентрации микробных клеток.

Концентрирование вакцины осаждением с добавлением КМЦ показал, что этот метод по времени менее продолжителен, чем метод самоосаждения, но вызывают негативное воздействие на микробные клетки бруцелл и в дальнейшем в процессе лиофилизации отмечается снижение выживаемости, тем самым приводит к существенным потерям (30% и более).

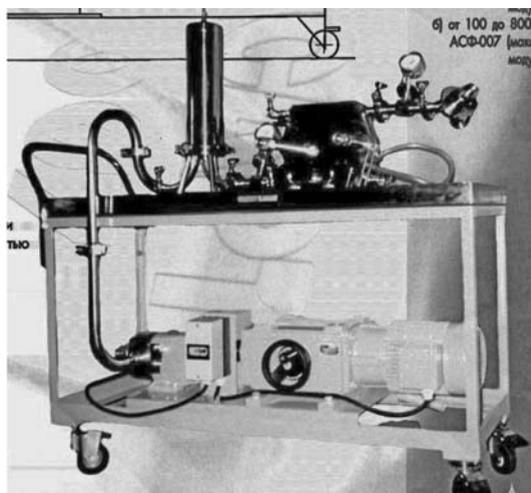
Концентрирование культуры вакцинного штамма *B. melitensis* Rev-1 на установках для ультра- и микрофльтрации показал, что этот метод является оптимальным для получения высоких концентраций микробной массы, не трудоемкий и технологичным.

Экспериментальные исследования показали, что при концентрировании микробной нативной культуры бруцелл на установке САРТАКОН-2 с использованием модулей с размером пор 0,2 мкм, можно получать концентрированную суспензии микробных клеток, с концентрацией в 6-8 раз больше, чем в исходной нативной культуре. Данный способ концентрирования не влияет на выживаемость в процессе высушивания.

Концентрирование микробной массы на модулях с более большим размером пор 0,4 и 0,6 мкм показал, что происходит потеря микробной массы через фильтр в фугат. Концентрирование через модуль с меньшим размером пор — 0,1 мкм сопровождалось заполнением пор микробными клетками, в результате чего фильтр переставал функционировать.



А



В

Рис 1. А - полимерный фильтр квадратной формы; Б — установка «САРТАКОН-2».

Таким образом, усовершенствованный способ приготовления полуфабриката вакцины из штамма *B. melitensis* Rev-1 основанный на глубинном культивировании и концентрирования на фильтровальной установке для ультра- и микрофльтрации типа «САРТАКОН-2», позволяет увеличить концентрацию бактериальной массы, используемую для приготовления сухой живой вакцины из штамма *B. melitensis* Rev-1., которая сохраняет свои биологические и протективные свойства.

Предлагаемая технология получения концентрата полуфабриката живой бруцеллезной вакцины может быть внедрена в промышленное.

*Контактная информация:
Шведов Д.В.
тел. 8 8335426320*

Д.А. ДЕВРИШОВ

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина», Москва

В.А. ОБОРИН

ФГБОУ ВПО «Вятский государственный гуманитарный университет», Киров

А.Г. ИВОНИН, Е.В. ПИМЕНОВ, С.Н. КОПЫЛОВ

ФГБОУ ВПО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия», Киров

РОЛЬ ЭРИТРОЦИТОВ В ТРАНСПОРТЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

В обзоре рассматриваются различные методические приемы, обеспечивающие адресную доставку лекарственных препаратов. Сделан вывод о том, что перспективными носителями лекарств при осуществлении направленного транспорта в ветеринарии могут быть аутоклетки крови.

Ключевые слова: *кровь, клетки, эритроциты, доставка, рецептор, лекарство*

D.A. DEVRISHOV

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named K.I.Skryabin

V.A. OBORIN

Vyatka state humanitarian university, Kirov

A.G. IVONIN, E.V. PIMENOV, S.N. KOPYLOV

Vyatka state agricultural academy, Kirov

ROLE OF TRANSPORT IN ERYTHROCYTES DRUGS

In the review the various methodical receptions providing address delivery of drugs are considered. The conclusion that perspective drug carriers at realization of the directed transport in veterinary can be autological blood cells is drawn.

Key words: *blood cells, erythrocytes, delivery, receptor, drug*

В современной фармакотерапии для повышения эффективности лекарственных средств и снижения их побочного действия на организм перспективным является использование систем адресной доставки [1-3].

Технологии целенаправленной доставки лекарств предполагают применение различных методических приемов. Примером таковых служит регионарное введение препаратов в кровеносные сосуды, питающие патологический очаг [4]. Однако данный подход не является универсальным и требует наличия сложной аппаратуры контроля.

С середины XX в. изучается возможность создания систем доставки лекарств непосредственно к очагу поражения путем их связывания с молекулами (векторами), обладающими тропностью к определенным клет-

кам макроорганизма, а также путем заключения лекарств в «биоактивные» капсулы на основе полупроницаемых искусственных или естественных мембран [2, 4, 5]. В то же время технологии получения векторов, избирательно взаимодействующих с рецепторами клеток организма, и создания их конъюгатов с молекулами лекарств являются весьма трудоемкими. В качестве «биоактивных» капсул в медицине и ветеринарии используются липосомы [2, 6, 7]. Однако липосомальные формы лекарственных препаратов имеют ряд недостатков, таких как быстрая дегградация в кровеносном русле, доступность для клеток ретикулоэндотелиальной системы, а также малое количество транспортируемого вещества [8]. Помимо липосом в качестве искусственных контейнеров для направленного

транспорта лекарств предложены микрокапсулы из нейлона, магнитные микросферы, капсулы из человеческого альбумина. Тем не менее, подобные носители имеют ограничения по диапазону и количеству лекарств, а также обладают побочными эффектами (нарушение микроциркуляции, иммуногенность, токсичность), в связи с чем не получили распространения [9].

Отдельным направлением в области направленного транспорта лекарств является использование аутогенных клеток крови как естественных микроконтейнеров для фармакологических средств [1, 2]. Клеточные носители лекарств (фармакоциты) полностью биосовместимы и способны к биологическому разложению без образования токсических продуктов [3, 10].

На сегодня показана возможность загрузки форменных элементов крови широким спектром лекарственных средств. В работе [11] установлено, что такие препараты, как фторхинолоны, рифампицин, клиндамицин, тетрациклины и хлорамфеникол, обладают способностью концентрироваться внутри клеток крови. Для улучшения связывания антибиотика с форменными элементами крови предложено дополнительно инкубировать полученную цитовзвесь с АТФ, что приводит к более выраженному насыщению клеток антибиотиками.

Выявлена высокая эффективность реинфузии аутогенной клеточной массы крови, предварительно обработанной ампициллином, при лечении пневмонии у детей. При этом купирование воспалительного процесса происходило в более короткие сроки при снижении дозы антибиотика в 6-8 раз по сравнению с традиционной схемой [12]. Установлено, что при реинфузии клеточной массы крови с антибиотиками (цефалоспорины, фторхинолоны) и даларгином у больных панкреонекрозом наблюдается повышение концентрации препаратов в очаге поражения, снижение эндогенной интоксикации, положительные сдвиги клеточного и гуморального иммунитета, уменьшение побочных воздействий лекарственных средств на организм [13].

В качестве фармакоцитов широко используются изолированные эритроциты [1-3]. Достоинствами эритроцита как носителя лекарств являются высокая степень биосовместимости, длительность циркуляции в кровеносном русле, простота получения из крови в количестве, необходимом для загрузки терапевтической дозы препарата [14].

Лечебный эффект препарата, заключенного в эритроцит, связывают с его постепенным медленным высвобождением в процессе циркуляции и непосредственно направленным транспортом к клеткам ретикулоэндотелиальной системы в основном печени, селезенки и легких [3, 15].

Для включения фармакологический средств в эритроциты предложен ряд методов, самым распространенным из которых является метод гипоосмотического шока. Нагруженные подобным способом эритроциты способны длительно циркулировать в кровотоке, что пролонгирует действие препарата. Доказана возможность загрузки эритроцитов лекарственными средствами методом электропорации. Ряд биологических веществ может быть включен в эритроциты при индукции эндоцитоза. Кроме того, многие препараты способны включаться внутрь эритроцитов и по обычным транспортным механизмам. Выход таких лекарств из носителей, введенных в кровеносное русло, может быть задержан на часы, сутки и даже недели, что обеспечивает длительность действия препарата [9]. В настоящее время показана клиническая эффективность эритроцитарных носителей при инфекционных заболеваниях печени и желчных путей, патологиях органов кроветворной системы и онкологических заболеваниях [1, 3, 9].

Самостоятельным направлением в адресной доставке лекарств является использование аутолейкоцитов. Лейкоциты, насыщенные лекарственными веществами и возвращенные в кровоток, мигрируют за счет хемотаксиса в очаг воспаления, где путем стимулированного экзоцитоза или после своего разрушения высвобождают пиноцитированный во время инкубации лекарственный препарат [13]. Из-за замедленного выделения препарата из лейкоцитов в сосудистом русле значительно удлиняется, по сравнению с обычным введением, период сохранения в крови эффективных терапевтических концентраций.

Показано, что применение адресной доставки антибиотиков в аутологичных лейкоцитах при комплексной терапии людей, больных острыми воспалительными заболеваниями почек, позволяет значительно уменьшить частоту гнойно-септических осложнений, сократить длительность стационарного лечения [16]. Имеют данные об успешном использовании лейкоцитов в качестве естественного носителя при проведении направленного транспорта антибио-

тика цефтазидима при комплексном лечении пациентов с тяжелыми формами пневмонии [17]. Включение указанной методики в комплексную терапию сопровождалось достоверным снижением сроков госпитализации и летальности, а также более редким развитием осложнений пневмонии.

Заключение. На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что методы адресной доставки, основанные на использовании аутоклеток крови в качестве носителей лекарственных средств, являются наиболее привлекательными для использования в клинической практике ввиду безопасности, технической простоты, низкой себестоимости проводимых процедур и быстрого достижения клинических результатов. При этом эритроцитарные носители наиболее целесообразно применять при патологических процессах в органах, богатых эритрофагоцитирующими клетками, в первую очередь — печени и селезенки. Лейкоцитарные носители, по-видимому, могут быть использованы для доставки лекарств в очаги воспаления различной локализации.

Однако разработанные на сегодняшний день системы направленного транспорта лекарств на основе аутоклеток крови предназначаются для применения в медицине. В доступной литературе практически отсутствуют сведения об использовании клеточных носителей фармакологических средств в ветеринарной практике. Основываясь на результатах многочисленных экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*, проведенных на клетках лабораторных животных и человека, можно сделать вывод о перспективности применения технологий направленного транспорта лекарств в естественных контейнерах на основе собственных клеток крови (эритроцитов, лейкоцитов) при лечении патологий у домашних и сельскохозяйственных животных. Исследования в данной области имеют огромный практический интерес и представляются весьма актуальными.

Список литературы

1. Цой, О.Г. Клетки крови как транспортные системы целенаправленной доставки лекарственных препаратов / О.Г. Цой, Е.А. Тайгулов, Ю.Ш. Иманбаева // Астана медициналык журналы, 2011. — Т. 66, № 4. — С. 7-12.
 2. Бегдуллаев, А.К. Проблема направленного транспорта лекарственных веществ в клинической практике / А.К. Бегдуллаев, А.Т. Маншарипова, А.К. Джусипов [и др.] // Терапевтический вестник, 2008. — Т. 17, № 1. — С. 32-36.

3. Провоторов, В.М. Роль и место эритроцитов в системе направленного транспорта различных фармакологических средств / В.М. Провоторов, Г.А. Иванова // Клиническая медицина, 2009, № 9. — С. 4-8.

4. Чазов, Е.И. Направленный транспорт лекарств: проблемы и перспективы / Е.И. Чазов, В.Н. Смирнов, В.П. Торчилин // Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева, 1987. — Т. 32, № 5. — С. 485-487.

5. Деев, С.М. Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения / С.М. Деев, Е.Н. Лебеденко // Acta Naturae, 2009, № 1. — С. 32-50.

6. Толчева, Е.В. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул / Е.В. Толчева, Н. Оборотова // Российский биотерапевтический журнал, 2006. — Т. 5, № 1. — С. 54-61.

7. Ситников, Н.М. Разработка и применение липосомальных форм антибиотиков для лечения бронхопневмоний : Дисс. ... канд. биол. наук. — Волгоград: Волгоградский НИИПЧИ, 1999, 112 с.

8. Стрекалова, О.С. Фосфолипидные наночастицы: получение, характеристика, использование для транспорта лекарств в организме : Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — М.: ИБМХ РАМН, 2010, 24 с.

9. Генинг, Т.П. Эритроцитарные носители в направленном транспорте лекарств в гепатологии / Т.П. Генинг, Л.А. Белозерова. — Ульяновск: УлГУ, 2006, 79 с.

10. Костюченко, А.Л. Эфферентная терапия / Костюченко А.Л. — СПб: Фолиант, 2000, 432 с.

11. Лохвицкий, С.В. Клиническая фармакокинетика антибиотиков при введении их в клеточной массе во время плазмафереза / С.В. Лохвицкий, А.Е. Гуляев, Н.В. Зубцов [и др.] // Здравоохран. Казахстана, 1992, № 8. — С. 22-24.

12. Протопопова, Г.М. Реинфузия клеточной массы крови после ее инкубации с антибиотиком в лечении неосложненной пневмонии у детей / Г.М. Протопопова, С.В. Власов, В.М. Крейнс // Эфферентная терапия, 1998. — Т. 4, № 4. — С. 47-50.

13. Сагитова, Д.С. Направленный транспорт лекарственно модифицированных элементов крови в профилактике и лечении гнойных осложнений острого панкреатита : Дисс. ... канд. мед. наук. — СПб: С-Пб медицинская академия последипломного образования, 2008, 118 с.

14. Самохин, Г.П. Направленный транспорт лекарств с помощью эритроцитов / Г.П. Самохин, С.П. Домогатский // Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева, 1987. — Т. 32, № 5. — С. 527-533.

15. Минаева, О.В. Оптимизация метода направленного транспорта эритромицина и цефтриаксона при тяжелой внегоспитальной пневмонии : Дисс. ... канд. мед. наук. — Саранск: Мордовский гос. ун-т, 2008, 143 с.

16. Абу Идда, А.Ш. Лечение больных с гнойно-воспалительными заболеваниями почек путем применения направленного транспорта антибак-

териальных препаратов в аутологичных лейкоцитах / А.Ш. Абу Идда, С.И.Горелов, О.Ф. Каган // Медицинский научный и учебно-методический журнал, 2006, № 31. — С. 116-124.

17. Ершов, А.Л. Опыт применения модифицированной методики направленного транспорта антибиотиков при тяжелом течении внебольнич-

ной пневмонии / А.Л. Ершов, И.А. Карпушина // Эффективная терапия, 2006. — Т. 12, № 3. — С. 39-44.

Контактная информация:

Девришов Д.А.

Тел.: (495)377-69-97.

E-mail: davud@agrovvet.ru

УДК 636.4.087

ДЕВРИШОВ Д.А., ЖАРОВА Т.П., ПЕЧНИКОВА Г.Н.

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина»

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ЛАБОРАТОРНЫХ МОДЕЛЕЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ МИКРОБНЫХ КУЛЬТУР *L.PLANTARUM* И *L.BUCHNERI*

Изучена острая, хроническая токсичности и морфофункциональные показатели лабораторных животных на фоне применения пробиотика «Лактостат», содержащий молочнокислые культуры штаммов *L.plantarum* и *L.buchneri*. По результатам проведенных исследований, не выявлено негативного влияния на организм и нормальное функционирование органов и систем при введении завышенных в 5 и 10 раз доз.

Ключевые слова: острая и хроническая токсичность, реактогенность, пробиотик, лактобактерии, биохимические, морфологические, патологоанатомические тесты.

DEVRIŠOV D.A.

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named K.I. Skryabin

MORPHOLOGICAL CHANGES IN LABORATORY MODELS OF THE APPLICATION OF PROBIOTICS BASED ON MICROBIAL CULTURES AND *L.PLANTARUM* *L.BUCHNERI*

Explore the island, chronic toxicity and morphofunctional parameters of laboratory animals during treatment with probiotic «Laktostat» containing lactic acid culture strains *L.plantarum* and *L.buchneri*. The results of the studies revealed no adverse effects on the body and the normal functioning of organs and systems with the introduction of excessive 5 and 10 times the dose.

Key words: acute and chronic toxicity, reactivity, lactobacilli, biochemical, morphological, post-mortem tests.

Термин “пробиотик” был предложен в 1965 г. Lilly D.M. и Stilvell R.H., он означал “вещества, продуцируемые одними микроорганизмами для стимуляции роста других”, однако сейчас используется более точное определение: “пробиотики — живые микроорганизмы, которые при назначении в адекватных количествах оказывают благотворное влияние на здоровье макроорганизма путем изменения свойств нормальной микрофлоры” (9, 13).

Кроме термина “пробиотики” достаточно часто употребляются еще два: “пребиотики”

и “симбиотики”. Пребиотики — неперевариваемые ингредиенты пищи, которые способствуют улучшению здоровья за счет избирательной стимуляции роста и/или метаболической активности одной или нескольких групп бактерий, обитающих в толстом кишечнике (7). Симбиотики являются объединяющим понятием (пробиотики + пребиотики) и рассматриваются как вещества, улучшающие выживаемость и приживаемость в кишечнике пробиотиков, а также избирательность стимулирующие рост и жизнестойкость индигенных лакто- и бифидобактерий (7, 9).

Список пробиотических микроорганизмов, которые могут оказывать полезное действие, достаточно обширен (13) (табл.1). Основные пробиотики — это микроорганизмы: продуценты молочной кислоты (бифидобактерий и лактобактерии), относящиеся к наиболее типичным представителям нормальной микрофлоры человека и животных (10). Лактобактерии являются факультативными анаэробами (т. е. могут переносить небольшое количество кислорода во внешней среде, но лучше растут без кислорода), бифидобактерий — облигатными анаэробами (вообще не переносят кислорода). *Vacillus subtilis* и *Vacillus cereus* — сапрофитные спорообразующие анаэробы, пробиотическая активность при применении спор которых точно не установлена (13).

Нами для разработки нового пробиотика были взяты штаммы *L.plantarum* и *L.buchneri*.

Внедрение нового препарата в ветеринарную практику невозможно без оценки его безвредности, которая определяется при изучении острой и хронической токсичности, реактогенности в опытах на лабораторных моделях. В этих экспериментах выявляется возможное негативное влияние оцениваемого препарата на нормальное функционирование органов и систем микроорганизма,

которое проявляется повышением температуры за счет антигенов микробных клеток, нарушением деятельности наиболее подверженных токсическому воздействию систем кроветворения и обмена веществ. Проявлением этих изменений является изменения клеточного состава периферической крови, обмена липидов, углеводов и белков. Все вышеизложенное определило направление дальнейших исследований.

Острая токсичность пробиотика «Лактостат» была изучена на белых мышах массой 22-24 г и белых крысах массой 130-150 г методом пробит-анализа по Литчфилду-Уилкоксоу. С этой целью животным однократно перорально вводили препарат в количестве, соответствующем 2,5 и 10 лечебно-профилактическим дозам, рекомендованным для препарата лактобактерин для телят. Наблюдение за поведением и состоянием животных осуществляли на протяжении 21 суток. Для оценки токсического действия на 7-е, 15-е и 21-е сутки проводили определение их массы тела.

Результаты изучения острой токсичности препарата «Лактостат» на белых мышамсамцах и крысах-самках при однократном пероральном введении представлены в таблице 2.

Таблица 1

Основные микроорганизмы-пробиотики

Штаммы <i>Lactobacillus</i>	Штаммы <i>Bifidobacterium</i>	Другие микроорганизмы
<i>L.acidophilus</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.crispatum</i> , <i>L.delbrueckii</i> подтип <i>bulgaricus</i> , <i>L.fermentum</i> , <i>L.gasseri</i> , <i>L.Johnsonii</i> , <i>L.paracasei</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>L.lactis</i> , <i>L.reuteri</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>L.salivarius</i> , <i>L.buchneri</i> <i>L.fermetum</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescentis</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle, <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> .

Таблица 2

Динамика изменения массы тела различных групп белых крыс и мышей

№№ групп	Кол-во ж-х в группе	Вид животных	Кол-во доз препарата	Масса тела, г			
				Фон	7 сут.	14 сут.	21сут.
1	5	Крысы	2	131,3±11	136,5±13	147,9±14	156,3±17
2	5	—"	5	133,1±50	138,3±15	150,1±16	158,5±16
3	5	—"	10	132,6±15	138,7±11	148,7±12	157,5±14
4	5	—"	контроль	131,9±14	137,8±12	156,9±16	156,9±16
5	5	Мыши	2	21,0±1,2	22,3±1,5	24,6±1,1	25,4±1,2
6	5		5	22,0±1,3	23,5±1,4	26,3±1,3	26,9±1,7
7	5		10	21,0±1,5	23,4±1,1	25,4±1,5	26,2±1,8
8	5		контроль	22,0±1,3	22,7±1,7	26,0±1,8	26,6±1,7

Примечание — Доза вводимого препарата соответствовала 2,5,10 лечебно-профилактическим дозам, рекомендованным для телят (1 доза содержит 4*10⁹ лактобактерий).

Полученные результаты свидетельствуют, об отсутствии у подопытных животных каких-либо существенных проявлений интоксикации. В динамике изменения массы тела у всех групп белых крыс и мышей не выявлено значимых отклонений от показателей животных контрольной группы.

Хроническую токсичность определяли на 20 белых крысах-самцах массой 300-320 г и 10 крысах-самках массой 230-250 г. Экспериментальные модели были разделены на 2 группы по 5 особей в каждой, которые формировали методом случайной выборки с использованием в качестве ведущего признака массу тела. При наблюдении за животными перед проведением экспериментов шерсть их была гладкой, блестящей, кожные покровы — эластичными, слизистые — чистыми с бледно-розовым цветом.

Животных опытной и контрольной групп кормили брикетированными и натуральными кормами в соответствии с утвержденными нормами. В опытной группе крысам давали лактобактерии содержащий препарат давали с кормом в течение 30 суток в двукратной дозе.

Хроническую токсичность оценивали по клиническому состоянию, поведенческим реакциям и по результатам биохимических, патологоанатомических, гематологических исследований. Основным интегральным показателем являлся прирост массы тела.

Изучение общетоксического действия включало набор тестов для оценки функционального состояния печени. Углеводный обмен исследовали по уровню глюкозы в сыворотке крови ортотолуидиновым методом, липидный — по содержанию общих липидов и холестерина сыворотки крови.

Состояние белок — синтезирующей функции печени характеризовали по содержанию

общего белка в сыворотке крови, определяемого при проведении биуретовой реакции.

Состояние периферической крови оценивали по количеству эритроцитов и лейкоцитов на гематометре ГЦМК-3, тромбоцитов, ретикулоцитов, гемоглобина на гемоглобинометре ГМ-1.

По окончании эксперимента часть животных подвергали принудительному забою. После декапитации проводили их вскрытие, визуальное обследование состояния органов и определение их относительной массы.

Результаты определения массы тела белых крыс при многократном пероральном введении препарата «Лактостат» представлены в таблице 3.

Анализ представленных результатов экспериментов позволяет сделать заключение об отсутствии негативного влияния многократного использования пробиотика на массу тела у животных опытных групп в сравнении с крысами контрольной. Нам протяжении всего срока наблюдений не отмечали каких-либо отклонений в поведенческой реакции.

Проявление хронического токсического действия препарата «Лактостат» были продолжены в экспериментах по изучению функционального состояния печени при многократном введении пробиотика.

Углеводный обмен оценивали по показателю содержания глюкозы в крови животных. Белоксинтезирующую функцию печени оценивали по содержанию общего белка в сыворотке крови. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 4.

Полученные данные не позволяют сделать заключение о значимом изменении уровня глюкозы, содержания общего белка в крови после многократного применения пробиотика «Лактостат», их содержание

Таблица 3

Динамика изменения массы тела белых крыс

№№ групп	Кол-во ж-х в группе	Пол животных	Кол-во доз препарата	Масса тела, г	
				Фон	30 дней
1	5	самцы	2	305±5	348±5
2	5	—"	5	310±5	351±6
3	5	—"	10	314±5	353±5
4	5	—"	контроль	320±6	353±7
5	5	самки	10	231±2	255±3
6	5	—"	контроль	242±3	256±3

Примечание — однократно вводимое количество препарата соответствовало 2, 5,10 лечебно-профилактическим дозам для телят.

было практически одинаковым как у белых крыс контрольной, так и опытных групп.

Состояние липидного обмена оценивали на основании количественного определения общих липидов и холестерина. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 5

Результаты проведенных исследований позволяют сделать заключение об отсутствии нарушений липидного обмена, так как не выявлено достоверных различий содержания холестерина и общих липидов в сыворотке крови белых крыс опытных и контрольной групп перед началом введения препарата и по завершению его использования.

Одним из проявлений токсического действия различных веществ является их

ингибирующее влияние на систему кроветворения, что проявляется в изменении клеточного состава периферической крови. С этой целью на следующем этапе оценки хронической токсичности препарата «Лактостат» были изучены количественные показатели содержания различных клеточных элементов крови у белых крыс на фоне ежедневного перорального введения пробиотика на протяжении 30 суток в количестве 2,5,10 доз, рекомендованных для человека.

Результат проведенных исследований представлены в таблицах 6,7.

Анализ результатов исследований свидетельствует об отсутствии негативного токсического действия препарата «Лактостат» на систему кроветворения, что подтверждается

Таблица 4

Влияние пробиотика «Лактостат» на углеводный обмен и белок — синтезирующую функцию печени крыс (M±m)

№№ групп	Кол-во ж-х в группе	Пол Ж-х	Кол-во доз препарата	Глюкоза крови в ммоль/л		Общий белок сыворотки крови (г/л)	
				Фон	14 дней	ФОН	14 дней
1	5	самцы	2	5,86±0,84	5,51±0,21	82,1±5,0	73,5±2,3
2	5	—"	5	5,90±0,45	4,96±0,17	78,5±2,5	75,1±2,1
3	5	—"	10	6,00±0,34	5,04±0,22	80,3±5,0	73,7±2,1
4	5	—"	контроль	5,69±0,37	5,03±0,17	82,3±2,8	71,6±2,1
5	5	самки	10	5,38±0,11	5,30±0,19	76,2±2,5	71,9±1,9
6	5	—"	контроль	5,06±0,23	5,01±0,20	81,1±3,6	75,9±1,9

Примечания:

1. Однократно вводимое количество препарата соответствовало 2, 5,10 лечебно-профилактическим дозам, рекомендованным для человека.
2. Пероральное введение препарата осуществляли в течение 30 суток.

Таблица 5

Влияние пробиотика «Лактостат» на показатели липидного обмена у белых крыс (M±m)

№№ групп	Кол-во ж-х в группе	Пол Ж-х	Кол-во доз препарата	Общие липиды, г/л		Общий холестерин, ммоль/л	
				Фон	30 дней	Фон	30 дней
1	5	самцы	2	2,29±0,17	1,44±0,06	2,36±0,18	2,28±0,13
2	5	—"	5	2,15±0,24	1,43±0,09	2,35±0,25	2,25±0,08
3	5	—"	10	2,32±0,16	1,41±0,16	2,62±0,14	2,61±0,13
4	5	—"	контроль	2,40±0,24	1,37±0,09	2,21±0,25	2,26±0,08
5	5	самки	10	1,46±0,07	1,39±0,06	1,81±0,08	2,10±0,11
6	5	—"	контроль	1,52±0,09	1,24±0,06	1,85±0,08	2,02±0,11

Примечания:

1. Однократно вводимое количество препарата соответствовало 2, 5,10 лечебно-профилактическим дозам, рекомендованным для человека.
2. Пероральное введение препарата осуществляли в течение 30 суток.

Таблица 6

Характеристика показателей периферической крови белых крыс до применения пробиотика «Лактостат» ($M \pm m$, $n=5$).

№№ групп	Пол животных	Кол-во доз препарата	Гемоглобин, ед	Эритроциты, млн/мкл	Цветной показатель, ед	Ретикулоциты, %	Лейкоциты, тыс/мкл	Лейкограмма				
								Нейтрофилы, %		эозинофилы	моноциты	лимфоциты
								п\я	с\я			
1	самцы	2	105,3±2,8	5,3±0,4	1,04±0,08	31,3±1,95	12,6±0,5	0,042±0,002	1,06±0,3	0,39±0,07	0,7±0,2	10,4±0,5
2	—	5	101,3±5,4	5,3±0,3	0,96±0,06	31,4±2,1	14,04±0,9	0,037±0,04	1,2±0,3	0,2±0,05	1,04±0,2	10,6±0,8
3	—	10	95,9±4,2	5,0±0,5	0,996±0,08	32,3±2,1	13,1±0,8	0,036±0,01	1,1±0,2	0,31±0,07	0,9±0,2	10,8±1,1
4	—	контроль	112,9±3,4	5,1±0,3	1,12±0,07	31,4±1,5	13,3±1,0	0,065±0,01	2,01±0,3	0,6±0,1	0,6±0,1	9,2±1,0
5	самки	10	107,95±4,3	5,9±0,4	0,9±0,08	20,2±1,08	12,5±0,8	0	1,0±0,4	0,28±0,06	0,9±0,2	8,8±0,76
6	—	контроль	114,0±2,8	5,9±0,3	0,99±0,04	20,9±1,3	11,5±0,5	0,046±0,04	0,85±0,1	0,14±0,01	0,69±0,2	9,8±0,6

Примечание:

1. Однократно вводимое количество препарата соответствовало 2, 5, 10 лечебно-профилактическим дозам, рекомендованным для человека.
2. Пероральное введение препарата осуществляли в течение 30 суток.

Таблица 7

Характеристика показателей периферической крови крыс через 30 дней применения пробиотика «Лактостат» ($M \pm m$, $n=10$).

№№ группы	Пол животных	Кол-во доз препарата	Гемоглобин, Ед.	Эритроциты, Млн/мкл	Цветной показатель ед	Ретикулоциты, %	Тромбоциты, /мкл	Лейкоциты, Тыс/мкл	Лейкограмма, г\л				
									нейтрофилы%		эознофилы	моноциты	лифоциты
									п\я	с\я			
1	самцы	2	86,4±6,4	5,7±0,3	0,76±0,03	22,8±1,5	264,1±29,8	15,3±1,7	0,16±0,03	2,50±0,30	0,30±0,09	0,80±0,30	11,70±1,70
2	—	5	87,4±6,4	6,2±0,4	0,71±0,03	23,7±1,6	279,0±15,6	14,1±1,4	0,11±0,01	2,0±0,30	0,60±0,20	0,80±0,20	10,50±1,0
3	—	10	82,1±9,8	5,8±0,4	0,71±0,07	23,2±1,7	325,9±32,8	14,7±1,8	0,23±0,05	2,40±0,30	0,50±0,09	0,60±0,20	10,90±1,40
4	—	контроль	101,5±3,4	6,1±0,4	0,85±0,06	24,9±1,8	351,4±25,1	13,0±1,9	0,16±0,06	1,50±0,30	0,20±0,04	0,30±0,05	7,60±0,80
5	самки	10	109,3±2,5	6,8±0,3	0,82±0,05	20,8±0,97	379,4±47,7	11,2±1,1	0,04±0,001	1,40±0,20	0,38±0,05	0,40±0,07	7,03±0,8
6	—	контроль	118,6±3,2	6,1±0,5	1,02±0,09	20,3±1,5	347,3±48,4	10,4±0,8	0,24±0,11	1,73±0,23	0,21±0,07	0,54±0,14	7,76±1,05

результатами изучения клеточного состава периферической крови у опытных и контрольных экспериментальных моделей.

Для патоморфологического изучения органов подопытных и контрольных животных после применения пробиотика, часть подопытных крыс на 30-е сутки была подвергнута принудительному забою. При внешнем осмотре все животные имели нормальный внешний вид, естественные отверстия оставались чистыми.

При определении относительной массы органов подопытных белых крыс (в %) к массе тела каких-либо значимых отличий по данному показателю от контроля не установлено. Органа мишени не найдено.

В желудке животных обеих групп изменений в донной части желез не обнаружено. Атрофия желез не зарегистрировано ни в одном случае.

Печень, почки, сердце у исследуемых контрольных крыс контрольной и всех подопытных группах были в пределах нормы.

Реактогенность препарата «Лактостат» оценивали по наличию общей реакции организма (изменению температуры тела), после орального применения препарата. Препарат животным давали индивидуально, с кормом однократно в течение 7 дней в 5-ти кратной дозе, рекомендованных для телят массой 45 кг.

Термометрию животных проводили 1 раз в сутки на протяжении 7 суток. Количество животных в опытной группе составило 5 крыс массой 310-320 грамм, в контрольной — такое же количество, массой 310-340 грамм. Контрольная группа животных препарат не получала. Измерение температуры тела проводили медицинским термометром, ректально, в течение 2-х минут на зафиксированном животном.

Результаты исследований показали, что температура тела опытных животных на протяжении всего цикла исследований не отличалась от температуры контрольных животных и составляла в среднем $38,4 \pm 0,2^\circ\text{C}$, что свидетельствует об отсутствии реактогенности у исследуемого препарата «Лактостат».

Таким образом, проведение экспериментального изучения острой, хронической токсичности и реактогенности препарата «Лак-

тостат» не выявили негативного влияния на нормальное функционирование органов и систем макроорганизма при введении заведомо завышенных в 5 и 10 раз дозах.

Литература

1. Бабаян Э.А., Лепехин В.К. и др. Руководящие методические материалы по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств. Издание официальное, часть 6. М., 1986, с. 51-56.
2. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP). РД 64-126-91. М., МЗ России, ФК, 1992, 45 с.
3. Проблемы нормы в токсикологии (Под ред. проф. И.М. Трахтенберга). М., Медицина, 1991, 203 с.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., МЗ РФ, Ремедиум, 2000, 398 с.
5. Требования к доклиническому изучению общетоксического действия новых фармакологических веществ (временные методически рекомендации). М., МЗ СССР, ФК, 1985, 19
6. Drug registration requirements in Japan (5-th edition). Japan, Tokyo, Yakuji Nippo LTD, 1993, 306 p.
7. Hoelzl CF, Altwein JE. The probiotic approach: an alternative treatment option in urology. Eur Urol 2005;47:288-96.
8. Hoyos AB. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium infantis to neonates in an intensive care unit. Int J Infect Dis 1999;3(4):197-202.
9. Isolauri E. Dietary modification of atopic disease:
10. Lilly DM, Stilwell RH. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. Science 1965;147:747-48.
11. Nonclinical laboratory studies. — GLP Federal Registered. 43, 247, December 22, 1978, p. 59986-60024.
12. The rules governing medical products in the European Community. Volume III. Guidelines on the quality, safety and efficiency of medical products for human use. Luxemburg, Office for official publications of the European Community, 1989, 272 p.
13. Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. Pediatrics 2005;115(1):5-9.

Контактная информация:

Жарова Т.П.

тел.8 4953775459