

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043167**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.27

(21) Номер заявки
202100093

(22) Дата подачи заявки
2021.02.10

(51) Int. Cl. **A61K 35/742** (2015.01)
A61K 36/15 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A23K 10/30 (2016.01)

(54) ПРЕПАРАТ СИНБИОТИЧЕСКОГО ТИПА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

(43) **2022.08.31**

(96) **2021000017 (RU) 2021.02.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"СИНАПС" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Шаталов Денис Олегович, Панов
Алексей Валерьевич, Михайлова
Наталья Александровна, Айдакова
Анна Викторовна, Засыпкина
Нина Александровна, Ахмедова
Диана Александровна, Короткий
Василий Павлович, Лазарев Сергей
Александрович (RU)**

(74) Представитель:
Котлов Д.В. (RU)

(56) **АЙДАКОВА А.В. и др.** Разработка состава синбиотического препарата для применения в ветеринарии. Всероссийская научно-практическая студенческая конференция с международным участием "Медицинская весна - 2019" 27-28 февраля 2019 года. Сборник тезисов. Москва, Сеченовский Университет, 2019, с. 497
RU-C2-2543814

АЙДАКОВА А.В. и др. Перспективное направление разработки ветеринарного препарата синбиотического типа. Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием 29 ноября 2019 г. в 2 томах. Том 1. Орехово-Зуево, Редакционно-издательский отдел ГГТУ, 2019, с. 8-10

АЙДАКОВА А.В. и др. Разработка ветеринарного препарата синбиотического типа для применения в животноводстве. Сборник тезисов докладов научно-практической конференции ученых России и Хорватии. Москва, НИТУ "МИСиС", 2019, с. 42
RU-C2-2579494
RU-C2-2298032

(57) Изобретение относится к биотехнологии (кормопроизводству, сельскому хозяйству, ветеринарии), в частности к ветеринарным препаратам синбиотического типа, и может быть использовано для нормализации физиологических процессов в организме животных и птицы, повышения аппетита, улучшения роста, продуктивности, усиления общей резистентности организма. Для этого предлагается синбиотическая композиция, содержащая бактерии штамма *Bacillus subtilis* 1719 - 4-6 мас.%, хвойный экстракт древесной зелени сосны обыкновенной, экстрагированный глицерином - 85-90 мас.%, и воду. Композиции применяют перорально, в том числе в составе кормовых добавок.

043167 B1

043167 B1

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии (кормопроизводство, сельское хозяйство, ветеринария), в частности к ветеринарным препаратам синбиотического типа, и может быть использовано для нормализация физиологических процессов в организме животных, повышения аппетита, улучшения роста, продуктивности, усиления резистентности организма.

Предшествующий уровень техники

Известно, что для животноводческой отрасли сельского хозяйства очень важно обеспечивать животных и птице сбалансированное питание. Для соблюдения такого питания используют кормовые добавки, однако они не всегда оказываются эффективными, а порой даже ухудшают состояние животных, если в их составе присутствуют антибиотики.

Одними из наиболее перспективных добавок для достижения лучшего роста животных и повышения их производительности являются пробиотики - препараты живых микроорганизмов, которые при введении в организм оказывают положительное действие на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма-хозяина посредством оптимизации состава его кишечной микрофлоры. Особый интерес представляют пробиотики на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus*. Известно, что бактерии рода *Bacillus* подавляют рост и развитие патогенной и условно-патогенной микрофлоры кишечника животных и птиц. Некоторые штаммы рода *Bacillus* способны выдерживать высокие и низкие температуры, значения pH, продуцировать множество различных ферментов, антибиотиков, витаминов, белков, стабильны при хранении, технологичны в производстве и экологически безопасны. В ветеринарии, животноводстве и птицеводстве хорошо известны и широко используются различные штаммы бактерий рода *Bacillus* для улучшения показателей роста животных и птицы (см., например, RU 2184774, WO 2009007192, WO 2010033714 и др.).

Другим направлением для обеспечения полноценного сбалансированного кормления, при котором животные, наряду с основными элементами питания, получают ряд жизненно необходимых компонентов питания в соответствии с потребностью при определенной продуктивности и физиологическом состоянии, является введение в корма добавок, основанных на переработке растительной биомассы, в том числе биомассы леса (фитобактериальных). Это может быть древесная зелень, ветки и кора, отходы стволовой древесины. Среди преимуществ можно выделить экологическую чистоту производства таких добавок, безопасность в применении, дешевизну. В качестве примеров таких добавок можно привести препараты "Экостимул-1" и "Экостимул-2" (Россия), содержащие природный биофлавоноид дигидрокверцетин (1-2%), а в качестве носителя - разнородную древесную массу из комлевой части лиственницы даурской; препарат "Ларикарвит" (Россия), содержащий в качестве действующих веществ хлорофилл, бета-каротин и биофлавоноидный комплекс лиственницы; препарат "Глобатан Плюс" (Бельгия), в основе которого - гидролизующий танин из сладкого каштанового дерева - сухой экстракт полифенольных соединений.

В последнее время для повышения переваримости и усвояемости кормов, повышения продуктивности и улучшения здоровья животных все чаще применяются комбинированные препараты, основанные на комбинации пробиотиков с пребиотиками - углеводами, которые селективно ферментируются микрофлорой толстой кишки, вызывая активный рост полезных микроорганизмов. Такое сочетание обеспечивает более полноценное влияние на организм животных и птицы за счет более эффективной имплантации микроорганизмов, входящих в состав пробиотика, вводимых в желудочно-кишечный тракт, и стимуляции собственной микрофлоры кишечника (например, такие препараты как Румистарт, Кормомикс, Лактосубтил-Форте, Авилакт-Форте и др.).

При этом на современном рынке крайне мало представлено средств, кормовых добавок, представляющих собой пробиотические препараты, обогащенные фитокомпонентами. В то же время, такие комбинации, благодаря комплексному воздействию на организм, являются очень перспективными.

Раскрытие изобретения

Задачей изобретения является разработка ветеринарной композиции, обеспечивающей эффективную нормализацию физиологических процессов в организме животных и птицы, повышение аппетита, улучшение роста, продуктивности, усиление общей резистентности организма.

Поставленная задача достигается путем разработки новой синбиотической композиции для применения в ветеринарии, имеющей следующий состав:

биомасса живых и споровых форм бактерий штамма *Bacillus subtilis* 1719 - 4-6 мас.%,
хвойный экстракт древесной зелени сосны обыкновенной, экстрагированный глицерином при температуре 60-120°C в соотношении 1:6 - 85-90 мас.%,
вода - остальное.

Поставленная задача также достигается путем применения представленной синбиотической композиции для профилактики и/или коррекции нарушений микробиоценоза кишечника и/или повышения общей резистентности организма.

Кроме этого, поставленная задача достигается при осуществлении способа профилактики и/или коррекции нарушений микробиоценоза кишечника и/или повышения общей резистентности организма, включающего применение синбиотической композиции по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения синбиотическую композицию вводят перво-

рально перед кормлением или вместе с кормом или питьевой водой из расчета 0,5-2 мл на 10 кг массы животного или птицы.

В некоторых частных вариантах осуществления изобретения синбиотическую композицию вводят из расчета 1 мл на 10 кг массы животного или птицы.

В некоторых частных вариантах осуществления изобретения синбиотическую композицию добавляют в корм путем его орошения за 20-30 мин до кормления.

Поставленная задача также достигается путем разработки кормовых добавок, включающих предлагаемую синбиотическую композицию, для включения в комбикорма, концентраты, премиксы или любые другие сухие или жидкие корма.

В некоторых вариантах осуществления изобретения кормовая добавка дополнительно включает растительные, минеральные, технологические и/или балансирующие добавки.

В некоторых частных вариантах растительные добавки выбраны из группы, состоящей из эфирных масел, экстрактов растений, шрота, жмыха; минеральные добавки выбраны из группы, состоящей из карбоната кальция, мела кормового, монокальцийфосфата, костной муки, сера; технологические добавки выбраны из группы, состоящей из сорбата калия, бензоата натрия, пиросульфата натрия, уротропина; балансирующие добавки выбраны из группы, состоящей из белковой, белково-витаминной, белково-витаминно-минеральной добавок, карбамидного пищевого концентрата.

Количество синбиотической композиции в кормовой добавке рассчитывается так, чтобы обеспечить введение 0,5-2 мл синбиотической композиции на 10 кг массы животного или птицы.

Эффективное синергетическое взаимодействие компонентов синбиотической композиции обеспечивает достижение следующих технических результатов:

разработана новая синбиотическая композиция на основе хвойного экстракта, экстрагированного глицерином, и штамма микроорганизмов рода *Bacillus*, способная быстро и эффективно восстанавливать нарушения микрофлоры кишечника, повышать общую резистентность организма, обладающая следующими свойствами:

- нормализует энергетический баланс,
- оказывает ингибирующее действие по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, как бактериальной, так и грибковой природы, не подавляя при этом микрофлору кишечника,
- повышает барьерные функции организма,
- устойчива к большинству антибиотиков,
- повышает биодоступность кормов,
- активизирует работу кишечника,
- не содержит генетически модифицированных микроорганизмов, антибиотиков, пальмового масла, гормональных препаратов, что в конечном итоге положительно отражается на показателях получаемых продуктов животноводства (молока, мяса и др.),
- штамм микроорганизмов, входящий в препарат, нетоксичен, нетоксигенен, авирулентен, безвреден;
- предлагаемую синбиотическую композицию можно применять как индивидуально, так и групповым методом с комбикормом, концентратами, минеральными добавками, заменителями молока, питьем и др.

Подробное раскрытие изобретения

Определения и термины

Следующие термины и определения применяются в данном документе, если иное не указано явно. Ссылки на методики, используемые при описании данного изобретения, относятся к хорошо известным методам, включая изменения этих методов и замену их эквивалентными методами, известными специалистам.

В описании данного изобретения термины "включает" и "включающий" интерпретируются как означающие "включает, помимо всего прочего". Указанные термины не предназначены для того, чтобы их истолковывали как "состоит только из".

ХЭД - хвойный экстракт древесной зелени сосны обыкновенной, экстрагированный глицерином при температуре 60-120°C в соотношении 1:6.

Под "(терапевтически) эффективным количеством (терапевтической дозой)" подразумевается количество синбиотической композиции по изобретению (синбиотического препарата), вводимой или доставляемой животному (птице), при котором у него с наибольшей вероятностью проявится ожидаемый терапевтический или профилактический эффект. Точное требуемое количество может меняться от субъекта к субъекту в зависимости от вида животного (птицы), возраста, массы тела, общего состояния, тяжести заболевания, методики введения синбиотической композиции, комбинированного лечения с другими препаратами и т.п. Ведение синбиотической композиции (синбиотического препарата) по изобретению субъекту, нуждающемуся в лечении и/или профилактике заболевания или состояния, осуществляется в дозе, достаточной для достижения терапевтического эффекта. При проведении лечения и/или профилактики введение может осуществляться как разово, так и несколько раз в день, чаще в виде курсового введения на протяжении времени, достаточного для достижения терапевтического эффекта (от одной или нескольких недель до месяцев), при этом курсы введения синбиотической композиции могут проводиться повторно (на протяжении года, нескольких лет и др.).

Термин "кормовая добавка" означает ингредиент, премикс, добавку которые могут быть использованы для получения кормовых композиций (например, комбикормов).

Термин "животное" в описании данного изобретения относится к млекопитающим, преимущественно сельскохозяйственным животным, однако не ограничиваясь ими (включая, в том числе, крупный рогатый скот, свиней, лошадей, выючных животных, пушных зверей, домашних животных, диких животных, содержащихся в неволе).

Если не определено отдельно, технические и научные термины в данной заявке имеют стандартные значения, общепринятые в научной и технической литературе.

В состав разработанной синбиотической композиции по изобретению входит штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719, выбранный на основе изучения морфологических, физиолого-биохимических, генетических и других биологических свойств, хвойный экстракт древесной зелени сосны обыкновенной, экстрагированный глицерином при температуре 60-120°C в соотношении 1:6, и вода, при этом соотношение ингредиентов композиции выбрано таким образом, чтобы обеспечить максимальное проявление терапевтических свойств синбиотической композиции.

Штамм *B. subtilis* 1719, депонированный в ГИСК им. Л.А. Тарасевича под № 277, обладает пробиотическими свойствами, проявляющимися в элиминации условно-патогенных и патогенных микроорганизмов (проявляет антагонизм против условно-патогенных и патогенных микроорганизмов различных таксономических групп), с восстановлением количественного и качественного состава нормальной микрофлоры при экспериментальном дисбиозе, оказывает иммуномодулирующее действие на макроорганизм, обладает низкой адгезивной активностью, устойчив к гентамицину, полимиксину и эритромицину. Штамм *B. subtilis* 1719 абсолютно безопасен - обладает низкой токсичностью, токсигенностью и авирулентностью.

Хвойный экстракт древесной зелени сосны обыкновенной, экстрагированный глицерином (ХЭД), используется как дополнение к кормам и предназначен для восполнения недостатка энергии в рационе сельскохозяйственных животных и птицы. За счет включения добавки в рацион животных и птицы более полно происходит использование питательных веществ корма, и меньше остается недоокисленных продуктов распада. ХЭД насыщает организм животных и птиц водорастворимыми витаминами (С, В1, В6, РР и др.), жирорастворимыми витаминами (А, Е, Д и др.), углеводами (моносахаридами - глюкоза, фруктоза, галактоза, олигосахаридами - сахароза, мальтоза), макро-, микроэлементами (фосфор, кальций, железо, магний и др.), а также азотосодержащими веществами (аминокислоты - аргинин, метионин, лизин и др., белковые - глобулины, альбумины).

Благодаря комплексному действию эфирных масел хвои и естественных антиоксидантов ХЭД, при одновременно высокой антагонистической, ферментативной и иммуномодулирующей активности штамма *B. subtilis* 1719, который способствует нормализации состава и численности кишечной микрофлоры, а также элиминации условно патогенных микроорганизмов, предлагаемая композиция по изобретению, содержащая одновременно биомассу бактерий штамма *Bacillus subtilis* 1719 и ХЭД, обладает полифункциональным действием, максимально реализует эффективное действие ХЭД и штамма *B. subtilis* 1719 на повышение обменных процессов, иммунитета животных и птицы и нормализацию микрофлоры. Обеспечивает повышение резистентности, сохранности, роста и развития молодняка и взрослых особей, повышает продуктивность животноводства и птицеводства. Уменьшение количества ХЭД в композиции за счет включения воды (4-11 мас.%) способствует облегчению переваривания композиции, за счет чего воздействие композиции на организм животного или птицы происходит быстрее, что отражается на ускорении прироста массы тела и увеличения продуктивности. Использование ХЭД в составе композиции по изобретению в соотношении хвои/глицерина 1:6 вместо обычно используемого соотношения 1:5 позволяет, при сохранении положительного воздействия ХЭД на организм животных и птицы, улучшить эксплуатационные свойства композиции: поскольку глицерин обладает антисептическими свойствами, относительное увеличение количества глицерина в композиции по отношению к хвое обеспечивает сохранение потребительских качеств продукции в течение более продолжительного времени при простых условиях хранения. Проведенные исследования показали высокую выживаемость бактерий штамма *B. subtilis* 1719 в составе композиции по изобретению при длительном хранении.

Способ приготовления синбиотической композиции по изобретению

Технология получения синбиотической композиции по изобретению осуществляется в несколько стадий.

1. Получение биомассы бактерий *Bacillus subtilis* 1719.
2. Получение хвойного экстракта древесной зелени сосны обыкновенной.
3. Получение готового продукта.

1. Получение биомассы бактерий *Bacillus subtilis* 1719

Для максимального накопления биомассы наиболее эффективным субстратом для культивирования штамма является среда ВК-2 с добавлением глюкозы или сахарозы. Состав среды ВК-2 на один литр дистиллированной воды составляет: марганец хлористый - 0,01 г/л; кальций хлористый - 0,05 г/л; натрий хлористый - 5,0 г/л; натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный - 2,0 г/л; калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный - 2,0 г/л; глюкоза - 10,0 г/л; пептон сухой ферментативный для бактерио-

логических целей - 10,0 г/л.

Выращивание бактерий проводят при периодическом культивировании в течение 72 ч в условиях постоянной аэрации при температуре 37°C, pH среды 7,3+0,2.

Продукт на выходе - суспензия клеток, содержащая живые бактерии и их споры в среде культивирования в титре 10^9 КОЕ/мл.

2. Получение хвойного экстракта древесной зелени сосны обыкновенной (ХЭД)

Способ получения хвойного экстракта древесной зелени сосны обыкновенной, экстрагированного глицерином, хорошо известен из уровня техники (см., например, патенты RU 2579494 и RU 2543814). Получение хвойного экстракта осуществляют экстракцией древесной зелени глицерином с последующим выделением экстракта. Экстракцию проводят в одну стадию (в отличие от других существующих способов) при температуре 60-120°C в течение не менее 2-х часов (предпочтительно, 2-10 ч) при жидкостном модуле 1:6. При этом, в отличие от традиционных экстрагентов (органические растворители и вода), глицерин позволяет извлекать из древесной зелени как водорастворимые, так и липидорастворимые вещества. После экстракции глицерин не отгоняется от экстракта, а остается в продукте в качестве консерванта и биологически активного компонента, повышающего энергетическую ценность композиции.

3. Получение готового продукта

Для получения готовой синбиотической композиции, к хвойному экстракту экстрагированному глицерином, полученному на стадии 2, добавляют биомассу бактерий штамма *Bacillus subtilis* 1719, полученную на стадии 1, и воду так, чтобы обеспечить в конечной композиции следующее соотношение компонентов (мас.%): хвойный экстракт, экстрагированный глицерином - 85-90, биомасса бактерий - 4-6, вода - остальное. Получаемая композиция представляет собой вязкую субстанцию (суспензию) темно-зеленого цвета.

Предлагаемая синбиотическая композиция может применяться в составе кормовых добавок, предназначенных для введения в кормовые композиции (например, комбикорма, концентраты, премиксы или любые другие сухие или жидкие корма). В состав таких кормовых добавок могут включаться также дополнительные компоненты. Например, растительные, минеральные, технологические и/или балансирующие добавки, в количествах, предусмотренных рецептурой для конкретного вида животных или птиц. Количество синбиотической композиции в кормовой добавке, как и дополнительных компонентов, рассчитывается исходя из расчетных значений на килограмм массы тела животного или птицы.

Растительные добавки представляют собой части растений или их производные, в том числе травы, различные экстракты, эфирные масла, шрот, жмых. Такие добавки обычно улучшают вкус корма, положительно влияя на аппетит и плодотворность животных и птицы.

К минеральным добавкам относятся такие элементы как кальций, фосфор, магний, железо, цинк, йод; минеральные добавки могут быть выбраны, например, из группы, состоящей из карбоната кальция, мела кормового, монокальцийфосфата, костной муки, сера, но не ограничиваясь ими.

Технологические добавки предназначены, в первую очередь, для увеличения гигиены корма и улучшения его показателей, в том числе пищевых показателей - для улучшения здоровья и продуктивности животных и птицы, сенсорных - для улучшения кормопотребления, зоотехнических - для быстрого переваривания питательных элементов. К технологическим добавкам относятся, например, органические кислоты (муравьиная, молочная, кремниевая, пропионовая), сорбат калия, бензоат натрия, уротропин, пиросульфит натрия и другие.

Балансирующие добавки предназначены для того, чтобы сбалансировать корма, поступающие животным и птице. К балансирующим добавкам относятся белковые, белково-витаминные, белково-витаминно-минеральные и другие концентраты, например, карбамидный пищевконцентрат.

Наиболее удобной формой применения синбиотической композиции по изобретению является ее использование в составе кормовой или питьевой добавок, также она может применяться и самостоятельно, например, за 20-30 мин перед кормлением.

Как уже указывалось, точное требуемое количество синбиотической композиции для введения может меняться от субъекта к субъекту в зависимости от вида животного (птицы), возраста, массы тела, общего состояния, тяжести заболевания, методики введения композиции, комбинированного лечения с другими препаратами и т.п. Как правило, количество синбиотической композиции выбирают из расчета 0,5-2 мл на 10 кг массы животного или птицы, более предпочтительно, из расчета 1 мл на 10 кг массы животного или птицы.

Так, например, при применении в профилактических целях для крупного рогатого скота (КРС) и свиней синбиотическую композицию по изобретению используют в дозе 200 г на тонну корма, при поражении поголовья микотоксинами - от 400 г до 2,5 кг на тонну корма.

При применении в профилактических целях для птицы синбиотическую композицию по изобретению используют в дозе 1-1,5 кг на тонну корма. При повышенной контаминации корма микотоксинами - до 5 кг на 1 тонну корма.

Синбиотическую композицию по изобретению, иммобилизованную на угольном энтеросорбенте, можно, например, использовать отдельно для устранения эффекта отравления и пищевых интоксикаций (например, при кормовых интоксикациях, отравлениях алкалоидами, солями тяжелых металлов, метео-

ризме, остром расширении желудка) 2-3 раза в день (с водой или с пищей) в следующих дозах (на одно животное): крупный рогатый скот 50-200 г, овцы 10-50 г, свиньи 5-10 г, куры 0,2-1 г.

При применении синбиотической композиции по изобретению вне кормления, она может быть использована, например, в виде суспензии для перорального применения из расчета 0,5-2 мл суспензии на 10 кг животного (например, для КРС, овец, поросят, кур). Суспензию задают животному (птице) перорально перед кормлением. Такой синбиотический препарат также может применяться и вместе с кормом (орошение корма препаратом за 20-30 мин до кормления, чтобы бактерии успели "раскрыться") или питьевой водой (композицию (препарат) разводят в воде, предварительно взболтав флакон с композицией).

Приготовление препарата к употреблению проводят следующим образом: небольшое количество корма засыпается в мешалку, туда же вливается синбиотическая композиция по изобретению и перемешивается несколько минут.

Синбиотические композиции по изобретению могут применяться как в качестве монотерапии, так и вводиться субъекту, нуждающемуся в соответствующей терапии или профилактике, в комбинации с одним или более другим терапевтическим (профилактическим) средством. Например, наряду с воздействием на основное заболевание и повышением резистентности организма при коррекции дисбиотических нарушений, показано: нормализация моторной функции кишечника, применение энтеросорбентов, назначение антибактериальных препаратов, пре- и пробиотиков, синбиотиков. Синбиотические композиции по изобретению могут быть эффективно использованы как часть такой комплексной терапии. В некоторых неограничивающих вариантах с лечебной целью синбиотическую композицию применяют 1-2 раза в сутки утром и/или вечером в течение 1-3 месяцев. С профилактической целью - 1-2 раза в сутки утром и/или вечером в течение 14-30 дней.

Возможность объективного проявления технического результата при использовании изобретения подтверждена достоверными данными, приведенными в примерах, содержащих сведения экспериментального характера, полученные в процессе проведения исследований по методикам, принятым в данной области.

Следует понимать, что приведенные в материалах заявки примеры не являются ограничивающими и приведены только для иллюстрации настоящего изобретения.

Пример 1. Характеристика антагонистической активности.

Важнейшим критерием эффективности синбиотических композиций (СК) является антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам (УПМ), которая обеспечивает колонизационную ЖКТ. В результате проведенного исследования методом совместного культивирования была проведена сравнительная оценка антагонистической активности композиции, содержащей *B. subtilis* 1719 - 6%, ХЭД - 85% (в соотношении хвои/глицерина 1:6 соответственно) и воду - 9% (СК1), с композицией, содержащей *B. subtilis* 1719 - 6% и ХЭД - 94% (СК2) (в соотношении хвои/глицерина 1:5 соответственно).

В качестве объектов исследования для определения антагонистической активности были выбраны штаммы тест - культур из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ "НЦЭСМП": *Staphylococcus aureus* "Филиппов", *Shigella Sonnei* 170, *Proteus mirabilis* 237, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 9022, *Staphylococcus aureus* 29213.

Дизайн исследования.

Совместное культивирование опытных штаммов на твердой питательной среде осуществляли в соответствии с методом двухслойного агара. Для этого в агаризованную среду (3% мясо-пептонный агар (МПА)) вносили СК в соотношении 2:1 (например, в 100 мл расплавленной агаризованной среды, остуженной до 45°C, добавляли 50 мл СК), тщательно перемешивали до однородности. Подготовленную агаризованную среду с СК разливали в чашки Петри в количестве 20 мл, после застывания агара на поверхность наносили второй слой 1,5% МПА в количестве 5 мл, но без СК. Предварительно выращенные в течение ночи на мясо-пептонном агаре тест-штаммы УПМ суспендировали в физиологическом растворе до титра 10^8 КОЕ/мл. Титр устанавливали до значения 0,5 в единицах Мак-Фарланда (McFarland) с использованием денситометра Den-1, далее осуществляли серию разведений тест-штаммов УПМ и высевали в титре от 10^5 до 10^1 КОЕ на верхний слой агара. В качестве контроля использовали посеvy УПМ на МПА без СК в титре 10^2 и 10^1 КОЕ. Каждый опытный и контрольный вариант готовили в 4-5 повторах. Посевы инкубировали при температуре 37°C. Учет результатов проводили после 24, 30 и 48 ч инкубирования. Для каждого времени инкубации подготавливали отдельные опытные и контрольные чашки.

Учет результатов осуществляли по количеству колоний УПМ при наличии роста пробиотического штамма в нижнем слое питательной среды. В каждом опыте анализировали средние значения колоний на всех чашках и преобразовывали в десятичный логарифм. Эффективность СК1 и СК2 сравнивали по снижению титра жизнеспособных тест-штаммов клеток в сравнении с контролем без добавок.

Результаты.

При совместном культивировании на всех чашках с агаром отмечался видимый рост штамма *B. subtilis* 1719 в виде газона внутри пласта среды без выхода на поверхность.

Полученные данные результатов испытания представлены в табл. 1.

Таблица 1

Антагонистическая активность СК1 и СК2 в отношении УПМ

Тест – штамм УПМ	Задержка роста тест-культур, lg	
	СК1	СК2
контрольное время – 24 часа		
<i>S. aureus</i> 209P	3,00	-
<i>S. sonnei</i> 170	2,87	-
<i>P. mirabilis</i> 237	3,11	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,90	-
<i>P. aeruginosa</i> 9022	3,04	-
<i>S. aureus</i> 29213	3,11	-
контрольное время – 30 часов		
<i>S. aureus</i> 209P	2,95	2,95
<i>S. sonnei</i> 170	2,65	2,67
<i>P. mirabilis</i> 237	3,04	3,04
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,80	2,80
<i>P. aeruginosa</i> 9022	2,99	3,00
<i>S. aureus</i> 29213	3,04	3,08
контрольное время – 48 часов		
<i>S. aureus</i> 209P	нет роста	2,63
<i>S. sonnei</i> 170	0,60	2,39
<i>P. mirabilis</i> 237	2,90	2,91
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,49	2,50
<i>P. aeruginosa</i> 9022	2,92	2,93
<i>S. aureus</i> 29213	2,89	2,91

Как следует из приведенных данных, эффективность антагонистического воздействия пробиотического штамма *B. subtilis* 1719, входящего в состав синбиотических композиций (СК1 и СК2), по отношению к тест-штаммам УПМ, является вариабельным признаком, степень выраженности которого определяется не столько видом УПМ, сколько особенностями взаимодействия *B. subtilis* 1719 в составе композиции с конкретным тест-штаммом. Как видно из табл. 1, результаты антагонистического воздействия композиции СК1 сопоставимы с СК2, но в первом случае проявление антагонистического действия проявляется быстрее, что достигается за счет разбавления композиции КД1 водой и снижения тем самым содержания ХЭД до 85%. Данный факт обусловлен меньшим содержанием глицерина, что в свою очередь влияет на скорость высвобождения полезных веществ из активных компонентов кормовой добавки, т.е. при сопоставимой антагонистической активности, терапевтический эффект в случае СК достигается гораздо быстрее.

Пример 2. Изучение синбиотических свойств.

Изучение синбиотических свойств композиции по изобретению при пероральном введении проводили на белых мышах с начальной массой тела 17-19 г. В исследовании использовали животных, разброс по массе которых не превышал 10%. Лабораторных мышей делили на группы по 5 животных в каждой группе соответственно.

Объекты исследования.

Были исследованы композиции, содержащие бактерии штамма *Bacillus subtilis* 1719, хвойный экстракт древесной зелени сосны обыкновенной, экстрагированный глицерином, в соотношении 1:6 (ХЭД), и воду, в различных соотношениях. Соотношения компонентов исследованных композиций (ИК) представлены в табл. 1.

Таблица 2

Состав компонентов композиций (ИК)

№ состава ИК	<i>Bacillus subtilis</i> 1719, мас.%	ХЭД, мас%	Вода, мас.%
1	4	80	до 100
2		82,5	
3		85	
4		90	
5		94	
6	5	80	до 100
7		82,5	
8		85	
9		90	
10		94	
11	6	80	до 100
12		82,5	
13		85	
14		90	
15		94	

Дизайн исследования.

Дизайн исследования предполагает использование экспериментальных групп животных, получающих исследуемые композиции, а также группу контроля, которая не получала добавок.

Лабораторных мышей делили на группы по 5 животных в каждой группе соответственно. Введение исследуемых композиций в дозе 0,1 мл на мышь осуществляли перорально в течение 14 суток на фоне экспериментального дисбиоза. Экспериментальный дисбиоз вызывали введением опытным мышам антибиотика (доксциклина гидрохлорида) в количестве 0,01% от массы тела в течение 7 дней.

Таблица 3

Сравнительная оценка микрофлоры опытных мышей

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов, КОЕ/г фекалий		
	норма	мыши из питомника	мыши с дисбиозом
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁵ –10 ⁶	10 ⁶	10 ⁹
<i>Bifidobacterium spp.</i>	менее 10 ³	10 ³	не обнаружены
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹¹	10 ⁹	10 ²

Анализ просветной микрофлоры проводили по 3-м пробам асептически взятых фекальных масс от 5 мышей на 7 и 14 дней эксперимента. Бактериологические исследования проводили с использованием соответствующих стандартных дифференциально-диагностических сред (агар Клиглера, кровяной агар, среда Кларка и т.д.).

На протяжении всего эксперимента через каждые 7 дней осуществляли контроль массы тела опытных животных для определения влияния исследуемых композиций на прирост массы тела.

Таблица 4

Сравнительное влияние кормовой добавки различного состава на микрофлору мышей при экспериментальном дисбиозе

Микроорганизмы	Содержание микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий на фоне введения исследуемых композиций					
	Контроль	1	2	3	4	5
контрольное время – 7 суток						
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷
<i>Bifidobacterium spp.</i>	не обнаружены	не обнаружены	10 ¹	10 ³	10 ³	10 ²
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ⁵	10 ⁹	10 ¹⁰	10 ⁸
контрольное время – 14 суток						
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
<i>Bifidobacterium spp.</i>	не обнаружены	не обнаружены	менее 10 ²	менее 10 ³	менее 10 ³	менее 10 ²
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁸	10 ¹¹	10 ¹¹	10 ⁹

Микроорганизмы	Содержание микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий на фоне введения исследуемых композиций				
	6	7	8	9	10
контрольное время – 7 суток					
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁶
<i>Bifidobacterium spp.</i>	не обнаружены	10 ¹	менее 10 ³	менее 10 ³	10 ²
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ³	10 ⁵	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
контрольное время – 14 суток					
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
<i>Bifidobacterium spp.</i>	не обнаружены	менее 10 ²	менее 10 ³	менее 10 ³	менее 10 ²
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰
Микроорганизмы	Содержание микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий на фоне введения исследуемых композиций				
	11	12	13	14	15
контрольное время – 7 суток					
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
<i>Bifidobacterium spp.</i>	не обнаружены	10 ¹	10 ³	10 ³	10 ²
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ³	10 ⁵	10 ⁹	10 ¹⁰	10 ⁸
контрольное время – 14 суток					
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷
<i>Bifidobacterium spp.</i>	не обнаружены	менее 10 ²	менее 10 ³	менее 10 ³	менее 10 ²
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ⁵	10 ⁶	10 ¹¹	10 ¹¹	10 ¹⁰

Таблица 5

Динамика массы тела мышей

ИК	Масса тела, г				
	Исходная	7 дней	14 дней	21 день	28 дней
Контроль	17,1	17,3	17,8	18,2	18,6
1	17,3	17,9	18,5	19,3	20,1
2	17,5	18,3	19,0	19,9	20,8
3	17,2	18,8	19,5	20,3	21,8
4	18,1	19,2	20,4	21,3	23,1
5	18,1	19,4	20,6	21,8	22,5
6	17,8	18,4	19,4	20,8	21,5
7	18,3	19,1	20,0	20,9	21,9
8	18,5	19,4	21,0	22,2	23,8
9	17,7	18,9	20,1	21,6	22,8
10	17,8	18,7	19,8	21,0	22,1
11	18,5	19,0	19,9	20,7	21,9
12	17,9	18,6	19,8	20,5	21,3
13	17,6	18,8	19,9	21,3	22,9
14	18,0	19,2	20,3	22,7	23,4
15	17,7	18,6	19,4	21,3	22,2

Таблица 6

Прирост массы тела опытных животных	
ИК	Прирост массы тела за 28 дней, %
Контроль	8,8
1	16,2
2	18,9
3	26,7
4	27,6
5	24,3
6	20,8
7	19,7
8	28,7
9	28,8
10	24,2
11	18,6
12	19,0
13	30,1
14	30,0
15	25,4

По результатам исследований, у животных опытных и контрольной групп на протяжении всего периода наблюдения не заболело и не пало ни одной лабораторной мыши. В ходе испытаний не выявлено отклонений в их физиологическом и функциональном состоянии. Аппетит, водопотребление были сохранены.

Изучение нормальной микрофлоры интактных мышей, взятых из питомника, показало наличие *Escherichia coli* в количестве 10^6 , *Bifidobacterium spp.* в количестве 10^3 и *Lactobacillus spp.* в количестве 10^9 КОЕ/г фекалий. После введения антибиотика в течение 7 дней у мышей наблюдали гибель нормальной микрофлоры и контаминацию кишечника условно-патогенными микроорганизмами. Содержание в фекалиях *Escherichia coli* повысилось до 10^9 КОЕ/г, *Bifidobacterium spp.* не обнаруживали совсем, а количество *Lactobacillus spp.* снизилось до 10^2 КОЕ/г (табл. 3).

Результаты исследования микрофлоры мышей после коррекции экспериментального дисбиоза с помощью ИК представлены в табл. 4. Из приведенных данных видно, что экспериментальное введение исследуемых композиций, имеющих одинаковый качественный состав, но различающихся по количественному соотношению компонентов, привело к увеличению количества бифидобактерий и молочнокислых бактерий уже на 7 сутки после введения, на 14 сутки введения отличие от контроля для большинства экспериментальных групп было еще более выраженным, что свидетельствует об эффективном положительном влиянии исследуемых композиций на нарушения микробиоценоза кишечника. В то же время, в некоторых экспериментальных группах изучение микрофлоры показало отсутствие отличий или совсем незначительные отличия от контроля (ИК №№ 1, 6, 11). Наиболее существенная бифидогенная и лактогенная активность ИК выявлена для композиций, содержащих не менее 85 мас.% хвойного экстракта, экстрагированного глицерином, что свидетельствует о наиболее выраженном влиянии таких композиций на нарушения микробиоценоза кишечника.

Результаты анализа прироста массы тела (см. табл. 5 и 6) показали, что введение исследуемых композиций приводит к существенному (в 2 раза и более) увеличению массы тела подопытных животных по сравнению с контролем. При этом наиболее выраженный эффект был продемонстрирован для композиций №№ 3, 4, 8, 9, 13, 14, что свидетельствует об улучшении показателя эффективности для композиций, содержащих *Bacillus subtilis* 1719 в количестве 4-6 мас.% и хвойный экстракт, экстрагированный глицерином, в количестве 85-90 мас.%.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о выраженном положительном влиянии композиций по изобретению на нарушения микробиоценоза кишечника, а также их влиянии на увеличение прироста массы тела в короткие сроки, обусловленным повышением иммунитета, улучшением обмена веществ, лучшей усвояемостью необходимых организму витаминов.

ХЭД, вводимый в составе композиции, используется для синтеза глюкозы и непосредственной выработки энергии в организме животного и птицы - повышает содержание глюкозы в крови, нормализует энергетический баланс. В дополнение к свойствам ХЭД, пробиотический штамм *Bacillus subtilis* 1719 обладает протеолитической и липолитической активностью, что способствует лучшему перевариванию кормов и повышению их биодоступности; антагонистическое действие пробиотика *Bacillus subtilis* 1719 нормализует микрофлору, иммунитет животных. Синергетический эффект пребиотика и пробиотика позволяет назвать такую композицию представителем нового класса - синбиотиков, введение которой по-

вышает барьерные функции организма, активизирует работу кишечника, что делает ее эффективной для профилактики и коррекции нарушений микробиоценоза кишечника, а также повышения общей резистентности организма сельскохозяйственных животных и птицы.

Несмотря на то, что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные подробно описанные эксперименты приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Синбиотическая композиция для применения в ветеринарии, имеющая следующий состав:
биомасса живых и споровых форм бактерий штамма *Bacillus subtilis* 1719 - 4-6 мас.%,
хвойный экстракт древесной зелени сосны обыкновенной, экстрагированный глицерином при температуре 60-120°C в соотношении 1:6 - 85-90 мас.%,
вода - остальное.
2. Способ профилактики и/или коррекции нарушений микробиоценоза кишечника и/или повышения общей резистентности организма сельскохозяйственных животных и птицы, включающий применение синбиотической композиции по п.1.
3. Способ по п.2, в котором синбиотическую композицию вводят перорально перед кормлением или вместе с кормом или питьевой водой из расчета 0,5-2 мл на 10 кг массы животного или птицы.
4. Способ по п.3, в котором синбиотическую композицию вводят из расчета 1 мл на 10 кг массы животного или птицы.
5. Кормовая добавка, включающая синбиотическую композицию по п.1.
6. Кормовая добавка по п.5, дополнительно включающая растительные, минеральные, технологические и/или балансирующие добавки.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
