

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043409**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.05.23**

(21) Номер заявки  
**202000310**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.09.28**

(51) Int. Cl. **A61K 35/742** (2015.01)  
**A61K 47/06** (2006.01)  
**A61P 1/14** (2006.01)

**(54) ВЕТЕРИНАРНОЕ ПРОБИОТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО**

(43) **2022.03.31**

(96) **2020000093 (RU) 2020.09.28**

(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, Ахмедова Диана  
Александровна (RU)**

(74) Представитель:  
**Котлов Д.В., Яшмолкина М.Л. (RU)**

(56) **ШАРИПОВА А.Ф.** Биологические особенности и мясные качества цыплят-бройлеров при использовании пробиотической кормовой добавки "Ветоспорин-актив", автореферат диссертации, Уфа, 2015, с. 6, абзацы 3, 6, с. 19, "Выводы"

**RU-C1-2130316  
RU-C2-2298032  
RU-C1-2388813  
RU-C1-2569002  
US-A1-2004101525**

(57) Изобретение относится к биотехнологии (кормопроизводству, сельскому хозяйству, ветеринарии), в частности к ветеринарным препаратам пробиотического типа, и может быть использовано для лечения и профилактики заболеваний у животных и птицы, в том числе бактериальных и грибковых инфекций. Для этого предлагается пробиотическая композиция, включающая смесь биомассы живых и споровых форм бактерий штаммов *Bacillus subtilis* 1719 в титре  $1-1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл и *Bacillus subtilis* 3Н в титре  $1-1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Такая композиция может применяться как в виде лекарственного препарата, так и профилактически в виде кормовой добавки. Введение композиции позволяет быстро и эффективно восстановить микрофлору кишечника при повреждениях, а также повысить ее устойчивость к негативным микробиологическим воздействиям.

**B1****043409****043409****B1**

### Область техники

Изобретение относится к биотехнологии (кормопроизводство, сельское хозяйство, ветеринария), в частности к ветеринарным препаратам пробиотического типа, и может быть использовано для лечения и профилактики заболеваний у животных и птицы, в том числе бактериальных и грибковых инфекций.

### Предшествующий уровень техники

Пробиотики - препараты живых микроорганизмов, которые при введении в организм человека или животного оказывают положительное действие на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма-хозяина посредством оптимизации состава его кишечной микрофлоры. Пробиотики находят все более широкое применение в ветеринарии в качестве кормовых добавок.

В качестве ветеринарных биопрепаратов получили распространение пробиотики, состоящие из бактерий, продуцирующих молочную и пропионовую кислоты (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*), непатогенных бактерий рода *Escherichia*, спорообразующих бактерий (*Bacillus*, *Clostridium*), дрожжей (*Saccharomyces*), термофильных стрептококков (*Streptococcus*).

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. Микроорганизмы рода *Bacillus* обладают целым рядом ценных свойств: продуцируют множество различных ферментов, аминокислот, белков, витаминов, антибиотиков, нуклеотидов. Представители этого рода характеризуются высокой приспособляемостью к условиям внешней среды и способностью образовывать споры. В связи с этим различные штаммы бактерий рода *Bacillus* широко используют в качестве пробиотических препаратов, как в виде монопрепаратов, содержащих только один штамм рода *Bacillus*, так и в виде комбинированных препаратов, сочетающих несколько штаммов бактерий рода *Bacillus* или бактерии разных родов в различных комбинациях.

Так, из уровня техники известен препарат, включающий смесь биомассы бактерий рода *Bacillus* следующих штаммов: *Bacillus subtilis* ВКПМ В-7048, *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-7038 и рекомбинантный штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ В-7092 в равных соотношениях в споровой форме с титром не менее  $3 \times 10^{10}$  спор/г (RU 2142287, 10.12.1999). Препарат обладает широким спектром антивирусной и антибактериальной активности, однако наличие в его составе генномодифицированных компонентов накладывает ограничения на его применение.

Известен препарат для профилактики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний и диспепсий у животных (RU 2172175, 20.08.2001). Биопрепарат включает биомассу *Bacillus subtilis* 12 В-ДЕП и наполнитель при следующем соотношении компонентов, мас. %: биомасса *B. subtilis* 12 В-ДЕП - живых микробных клеток -  $(1-2) \times 10^9$  в 1 мл растворителя 92-95 мас. %, наполнитель 5-8 мас. %. Биопрепарат подавляет развитие ветеринарных штаммов болезнетворных микроорганизмов родов: *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Shigella*, *Hexaera*, обладает широкой устойчивостью к антибиотикам и эффективностью при лечении.

Известно пробиотическое лекарственное средство для сельскохозяйственных животных и птицы, которое содержит смесь суспензий штаммов бактерий и защитную среду (RU 2326692, 20.06.2008). В качестве защитной среды средство содержит сахарозо-желатиновую смесь при следующем соотношении компонентов, мас. %: сахароза - 15; желатин - 5; 9%-ный раствор хлорида натрия - 80. В качестве смеси суспензий штаммов средство содержит суспензии следующих штаммов, мас. %: *Azomonas agilis* В-2586 - 8; *Azotobacter chroococcum* В-3162 - 7; *Azotobacter vinelandii* В-2587 - 7; *Bacillus subtilis* В-5225 - 7; *Bacillus subtilis* В-4828 - 9; *Bifidum bacterium globosum* В-2584 - 10; *Escherichia coli* В-4412 - 8; *Enterococcus faecium* В-2898 - 7; *Lactobacillus acidophilus* В-3488 - 7; *Lactobacillus acidophilus* В-2585 - 7; *Propionibacterium freudenreichii* В-6561 - 7; *Pseudomonas sp.* В-3908 - 7; *Pseudomonas sp.* В-2589 - 7; *Saccharomyces cerevisiae* Y-365 - 2. Средство позволяет нормализовать микробиоценоз кишечника здоровых животных и птицы, сократить заболеваемость гнойно-воспалительного и диспепсического характера, снизить падеж и повысить прирост массы тела у молодняка.

Препарат Ветоспорин-актив представляет собой сыпучий порошок активированного угля с сорбированными клетками живых бактерий пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* 11В и *Bacillus subtilis* 12В черного цвета без запаха. Применяют для профилактики и лечения при отравлениях, диарее, аллергии, незаменим при недоброкачественных кормах, необходим после приема антибиотиков и антигельминтных препаратов, при стрессах, переохлаждениях и перегреваниях.

Энзимспорин - инновационная кормовая пробиотическая добавка для оптимизации процессов пищеварения, повышения продуктивности и сохранности свиней, крупного рогатого скота и сельскохозяйственной птицы. Предназначен для снижения уровня колонизации кишечника условно патогенными микроорганизмами. Энзимспорин содержит три штамма спорообразующих бактерий рода *Bacillus* в равных соотношениях, а именно: *Bacillus subtilis* ВКМ В-2998D (ВКПМ В-314), *Bacillus licheniformis* ВКМ В-2999D (ВКПМ В-8054), *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057D (ВКПМ В-12079). Наполнители - сухая молочная сыворотка, мальтодекстрин, кукурузная мука.

Несмотря на то что на рынке представлено множество пробиотических препаратов, широкомасштабное применение антибиотиков в качестве стимуляторов роста в животноводстве и птицеводстве

привело к возникновению проблемы формирования резистентной микрофлоры. Поэтому важным направлением исследований является поиск альтернативных стимуляторов роста и создание новых, более эффективных пробиотических препаратов для промышленного животноводства и птицеводства.

#### Раскрытие изобретения

Задачей изобретения является создание пробиотической композиции, способной быстро и эффективно восстанавливать микрофлору кишечника при повреждениях, а также повышать ее устойчивость к негативным микробиологическим воздействиям.

Поставленная задача достигается путем разработки новой пробиотической композиции для применения в ветеринарии на основе культур микроорганизмов рода *Bacillus*, включающей смесь биомассы живых и споровых форм бактерий штаммов *Bacillus subtilis* 1719 в титре  $1-1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл и *Bacillus subtilis* 3Н в титре  $1-1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пробиотическая композиция дополнительно включает фармакологически приемлемый носитель, растворитель или наполнитель.

В некоторых частных вариантах осуществления изобретения пробиотическая композиция имеет форму суспензии для перорального применения.

В некоторых частных вариантах осуществления изобретения пробиотическая композиция имеет форму лиофилизата.

В некоторых частных вариантах осуществления изобретения бактерии *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3Н иммобилизованы на угольном энтеросорбенте.

Поставленная задача также достигается путем применения представленной пробиотической композиции для профилактики и/или лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Кроме этого, поставленная задача достигается при осуществлении способа профилактики и/или лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта в животноводстве, птицеводстве или звероводстве, включающего применение пробиотического препарата по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пробиотическую 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.

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

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

Поставленная задача также достигается путем разработки кормовых добавок, включающих предлагаемую пробиотическую 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 белковый, белково-витаминной, белково-витаминно-минеральной добавок, карбамидного пищевого концентрата.

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

Эффективное синергетическое взаимодействие штаммов *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3Н обеспечивает достижение следующих технических результатов:

разработана новая пробиотическая композиция на основе культур микроорганизмов рода *Bacillus*, способная быстро и эффективно восстанавливать микрофлору кишечника при повреждениях, а также повышать ее устойчивость к негативным микробиологическим воздействиям, обладающая следующими важными свойствами:

- 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,
- микроорганизмы, входящие в препарат, не патогенны, не токсичны для теплокровных;
- предлагаемую пробиотическую 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".

Термин "пробиотическая композиция" в данном описании подразумевает композицию, полученную из суспензий клеток *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3Н, концентрация каждого из которых доведена до  $1-1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл.

Под "(терапевтически) эффективным количеством (терапевтической дозой)" подразумевается количество пробиотической композиции (пробиотического препарата), вводимой или доставляемой животному (птице), при котором у него с наибольшей вероятностью проявится ожидаемый терапевтический 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 пробиотической композиции, комбинированного лечения с другими препаратами и т.п. Введение пробиотической композиции (пробиотического 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 до нескольких недель до месяцев), при этом курсы введения пробиотической 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 пробиотической композиции на основе культур микроорганизмов рода *Bacillus* входят штаммы бактерий *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3Н, отобранные на основе изучения морфологических, физиолого-биохимических, генетических и других биологических свойств и неожиданно проявившие синергетический эффект.

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* 3Н, депонированный в ГКПМ под № 248, обладает антагонистической активностью, подавляя рост патогенных и условно-патогенных бактерий: стафилококков, протей, клебсиелл, кишечной палочки, стрептококков, синегнойной палочки и дрожжевых грибов, устойчив к римфацилину. Благодаря продуцированию ферментов, он способствует расщеплению белков, жиров, углеводов и клетчатки, улучшая переваривание и усвоение пищи. Штаммы *B. subtilis* 1719 и *B. subtilis* 3Н абсолютно безопасны - обладают низкой токсичностью, токсигенностью и вирулентностью.

В некоторых вариантах изобретения пробиотическая композиция содержит также защитную среду для обеспечения сохранности бактерий в процессе технологической переработки, получения конечной рецептурной формы и последующего хранения. В качестве защитной среды композиция может содержать, например сахарозо-желатиновую среду, сухое молоко, желатозу, лактозу, сахарозу и т.п.

Пробиотическая композиция по изобретению может дополнительно содержать растворитель. В качестве растворителя может быть использована, например, дистиллированная вода, физиологический раствор и т.п.

Пробиотическая композиция по изобретению может дополнительно также содержать наполнитель, обычно применяемый при изготовлении различных рецептурных форм. При формировании таблетированных форм она может содержать, например, декстраны, полиглюкин, крахмал, поливинилпирролидон, сахарозу, лактозу, стеарат кальция, глюкозу, гидрокарбонат натрия, гидроокись алюминия, метилцеллюлозу, тальк и т.п.

В некоторых вариантах изобретения пробиотическая композиция может быть представлена в форме

лиофилизата. Такие лиофильно высушенные пробиотические препараты также могут дополнительно содержать наполнитель и/или диспергатор. В качестве наполнителя используют, например, лактозу, сахарозу, обезжиренное сухое молоко, в качестве диспергатора, например Твин-80. Диспергатор в состав композиции вводят с целью равномерного распределения композиции (кормовой добавки) в основном рационе. Диспергатор также необходим для регулирования седиментационных характеристик водного раствора пробиотической композиции. Наличие диспергатора способствует однородности водного раствора композиции, что очень важно при применении пробиотической кормовой добавки путем выпаивания.

Пробиотический препарат также может быть представлен в виде суспензии, содержащей пробиотическую композицию в виде суспензии в 7%-ном растворе натрия хлорида. Такой препарат также может содержать эксципиенты, такие как например крахмал, твин, диспергирующие агенты, ацесульфам и/или сахарин.

Пробиотический препарат может быть инкапсулирован или иммобилизован на различных типах носителей или сорбентах, например, на аэросиле, целлюлозе, активированном угле, карбоксиметилцеллюлозе, гидроксипропилцеллюлозе, хитозане и т.п. Сорбированные формы пробиотиков ускоряют дезинтоксикацию и репаративные процессы в организме. В частных вариантах изобретения в качестве сорбента используют угольный энтеросорбент, например, активированный уголь марки БАУ-А, БАУ или ОУ-ВК.

"Фармацевтически приемлемый носитель, растворитель и/или наполнитель" подразумевает, что применяемые носитель, растворитель и наполнитель не являются токсичными или вредными для субъекта при применении в пробиотических композициях по данному изобретению, включая пероральное применение способами, представленными в данном документе.

Способ приготовления пробиотической композиции по изобретению.

Технология получения ветеринарного средства на основе штаммов *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3Н осуществляется в несколько стадий:

- 1) получение биомассы бактерий *Bacillus subtilis* 3Н;
- 2) получение биомассы бактерий *Bacillus subtilis* 1719;
- 3) получение готового продукта.

#### 1. Получение биомассы бактерий *Bacillus subtilis* 3Н.

Для максимального накопления биомассы наиболее эффективным субстратом для культивирования штамма является модифицированная среда № 9 следующего состава: сульфат железа - 0,01 г/л; сульфат магния - 0,1 г/л; хлорид марганца - 0,01 г/л; хлорид кальция - 0,08 г/л; триптон - 5 г/л; гидроортофосфат калия - 0,3 г/л; цитрат аммония - 2,0 г/л; дрожжевой экстракт - 3,0 г/л; лактоза - 10,0 г/л; агар микробиологический - 3,0 г/л; pH 7,3±0,2.

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.

#### 2. 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 бактериологических 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.

#### 3. Получение готового продукта.

Полученные суспензии клеток *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3Н доводят водой до концентрации  $1-1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл каждого из штаммов и затем их смешивают, получая пробиотическую композицию.

Для получения пробиотического препарата в форме суспензии для перорального применения полученную пробиотическую композицию разводят в 7%-ном растворе NaCl.

Для получения пробиотического препарата в форме лиофилизата полученную пробиотическую композицию смешивают с криопротектором (например, сахарозо-желатиновой защитной средой), затем стабилизированную микробную суспензию разливают в ампулы по 1-3 см<sup>3</sup>, замораживают при -40°C в течение 24 ч и лиофилизируют в течение 36 ч до остаточной влажности 3-4%.

Для получения пробиотического препарата в форме иммобилизата на угольном энтеросорбенте порошковидный активированный уголь, состоящий из частиц размером до 30 мкм, смешивают с пробиотической композицией в соотношении 0,1 г угля на 1 мл суспензии. Полученную смесь выдерживают при

4°C в течение 40-60 мин при постоянном перемешивании до полной иммобилизации бактериальных клеток на энтеросорбенте. Далее продукт однократно промывают в изотоническом растворе NaCl, переносят в емкости, в которых полученный биопрепарат подвергают лиофильной сушке, замораживают при -40°C в течение 24 ч и лиофилизируют в течение 36 ч до остаточной влажности 3-4%.

Предлагаемая пробиотическая композиция может применяться в виде 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.

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 пищевые показатели - для улучшения здоровья и продуктивности животных и птицы, сенсорные - для улучшения кормопотребления, зоотехнические - 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 концентрат.

Разработанные пробиотические композиции могут быть использованы для профилактики и/или лечения пищевых расстройств, профилактики и/или лечения различных заболеваний (в том числе заболеваний желудочно-кишечного тракта), патогенез которых связан с воздействием инфекционных агентов, в том числе одновременно с применением антибиотиков, в животноводстве, птицеводстве и звероводстве.

В результате проведенных исследований было неожиданно установлено, что комбинация штаммов *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3Н обладает высокой эффективностью при подавлении активности патогенных микроорганизмов в организме животного (птицы), проявляя более выраженный эффект, чем при воздействии указанных штаммов, взятых по отдельности.

Проведенные исследования показали, что входящие в состав пробиотической композиции штаммы бактерий *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3Н не конкурируют друг с другом, а вступают в синергидные отношения, комплексно воздействуя на макроорганизм:

проявляют антагонистическую активность против патогенных и условно-патогенных микроорганизмов за счет образования антибиотиков, бактериоцинов, лизоцима, а также вследствие конкуренции за места обитания и питательные вещества;

продуцируют аминокислоты, витамины и другие биологически активные вещества, потребляемые макроорганизмом;

оказывают иммуномодулирующее действие; осуществляют деструкцию токсинов, аллергенов.

Угнетая рост нежелательных микроорганизмов, пробиотическая композиция по изобретению создает условия для развития нормальной микрофлоры кишечника, которая играет чрезвычайно важную и многофункциональную роль в жизнедеятельности организма-хозяина: обеспечивает колонизационную резистентность и активизирует работу кишечника, участвуя в пищеварительной, синтетической, иммуномодулирующей, детоксикационной функциях. Все это позволяет достичь повышения неспецифической резистентности макроорганизма. Синтезируемые штаммами *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3Н протеолитические ферменты (включая липазы, лизоцим, амилазы и другие) способствуют расщеплению жиров, белков, клетчатки, углеводов, улучшают переваривание и усвоение пищи, что повышает биодоступность кормов и положительно отражается на приросте массы тела животных и птиц.

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

Как уже указывалось, точное требуемое количество пробиотической 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 пробиотической 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 пробиотическую 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 пробиотическую 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.

Пробиотическую композицию по изобретению, иммобилизованную на угольном энтеросорбенте, можно, например, использовать как отдельный лекарственный препарат для лечения отравлений и пищевых интоксикаций (например, при кормовых интоксикациях, отравлениях алкалоидами, солями тяжелых металлов, метеоризме, остром расширении желудка) 2-3 раза в день (с водой или в виде таблеток) 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 отравлении для промывания желудка можно, например, использовать 10-15% взвесь смеси в воде, состоящей из пробиотической композиции по изобретению, иммобилизованной на угольном энтеросорбенте (2 части), танина и магния окиси (по 1 части).

При применении пробиотической 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 пробиотический препарат также может применяться и вместе с кормом (орошение корма препаратом за 20-30 мин до кормления, чтобы бактерии успели "раскрыться") или питьевой водой (препарат разводят в воде, предварительно взболтав флакон с препаратом).

В некоторых вариантах изобретения применение пробиотической композиции осуществляют в виде лиофилизированной микробной массы в дозе по 0,5-2 мл на 10 кг веса животного. Приготовление препарата к употреблению проводят следующим образом: небольшое количество корма засыпается в мешалку, туда же вливается предварительно разведенный в воде пробиотический препарат по изобретению и перемешивается несколько минут.

В некоторых других вариантах изобретения применение пробиотической композиции осуществляют в виде иммобилизата на угольном энтеросорбенте в дозе по 0,5-2 мг на 10 кг веса животного. Приготовление препарата к употреблению проводят следующим образом: небольшое количество корма засыпается в мешалку, туда же вливается предварительно разведенный в воде пробиотический препарат по изобретению и перемешивается несколько минут.

Пробиотические 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 других терапевтических средств. 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. Пробиотические композиции по изобретению могут быть эффективно использованы как часть такой комплексной терапии. В некоторых неограничивающих вариантах с лечебной целью пробиотическую композицию предполагается применять два раза в сутки утром и вечером в течение 10-14 дней. С профилактической целью - один раз в день в течение 7-10 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. Изучение пробиотических свойств.

Проведена предварительная оценка перспективности пробиотической композиции (ПК) по изобретению. Изучение пробиотических свойств ПК при пероральном введении проводили на белых мышах с начальной массой тела 16-18 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 исследований.

Пробиотическая композиция штаммов *B. subtilis* 1719 и *B. subtilis* 3Н в виде суспензии.

Пробиотическая композиция штаммов *B. subtilis* 1719 и *B. subtilis* 3Н в виде лиофилизата.

Штаммы *B. subtilis* 1719 и *B. subtilis* 3Н иммобилизованные на угольном энтеросорбенте.

Количество каждого из штаммов в ПК при проведении исследования  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл.

В качестве объектов сравнения при анализе воздействия ПК на микрофлору мышей использовались индивидуальные добавки: штаммы *B. subtilis* 1719 и *B. subtilis* 3Н, которые вводились в дозе  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл каждого из штаммов.

Дизайн исследования.

Дизайн исследования предполагает использование экспериментальных групп животных, получающих пробиотические препараты, а также группу контроля, которая не получала пробиотических добавок.

Лабораторных мышей делили на группы по 5 животных в каждой группе соответственно. Введение

соответствующих доз кормовых добавок осуществляли перорально в течение 14 суток на фоне экспериментального дисбиоза. Экспериментальный дисбиоз вызывали введением опытным мышам антибиотика (доксидиклина гидрохлорида) в количестве 0,01% от массы тела в течение 7 дней.

Таблица 1

Сравнительная оценка микрофлоры опытных мышей

| Микроорганизмы                | Количество микроорганизмов, КОЕ/г фекалий |                       |
|-------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|
|                               | до дисбиоза                               | мыши с дисбиозом      |
| <i>E.coli lac<sup>+</sup></i> | 10 <sup>5</sup> –10 <sup>6</sup>          | 10 <sup>9</sup>       |
| <i>Bifidobacterium spp.</i>   | менее 10 <sup>3</sup>                     | не обнаружены         |
| <i>Lactobacillus spp.</i>     | 10 <sup>11</sup>                          | менее 10 <sup>3</sup> |

Анализ просветной микрофлоры проводили по 3-м пробам асептически взятых фекальных масс от 5 мышей через 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 подтверждения положительного влияния ПК на прирост массы тела.

Таблица 2

Сравнительное влияние ПК и индивидуальных добавок на микрофлору мышей на фоне экспериментального дисбиоза

| Микроорганизмы                | Содержание микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий на фоне экспериментальных препаратов |                         |                       |                       |                  |                  |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|------------------|
|                               | Контроль                                                                                | <i>B. subtilis</i> 1719 | <i>B. subtilis</i> 3Н | Суспензия             | Лиофилизат       | Энтеросорбент    |
| контрольное время – 7 суток   |                                                                                         |                         |                       |                       |                  |                  |
| <i>E.coli lac<sup>+</sup></i> | 10 <sup>9</sup>                                                                         | 10 <sup>7</sup>         | 10 <sup>9</sup>       | 10 <sup>6</sup>       | 10 <sup>6</sup>  | 10 <sup>6</sup>  |
| <i>Bifidobacterium spp.</i>   | менее 10 <sup>3</sup>                                                                   | менее 10 <sup>3</sup>   | не обнаружены         | менее 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>3</sup>  | 10 <sup>4</sup>  |
| <i>Lactobacillus spp.</i>     | менее 10 <sup>3</sup>                                                                   | 10 <sup>5</sup>         | 10 <sup>3</sup>       | 10 <sup>11</sup>      | 10 <sup>11</sup> | 10 <sup>10</sup> |
| контрольное время – 14 суток  |                                                                                         |                         |                       |                       |                  |                  |
| <i>E.coli lac<sup>+</sup></i> | 10 <sup>9</sup>                                                                         | 10 <sup>7</sup>         | 10 <sup>8</sup>       | 10 <sup>5</sup>       | 10 <sup>5</sup>  | 10 <sup>4</sup>  |
| <i>Bifidobacterium spp.</i>   | менее 10 <sup>3</sup>                                                                   | менее 10 <sup>3</sup>   | не обнаружены         | 10 <sup>4</sup>       | 10 <sup>5</sup>  | 10 <sup>6</sup>  |
| <i>Lactobacillus spp.</i>     | менее 10 <sup>3</sup>                                                                   | 10 <sup>8</sup>         | 10 <sup>6</sup>       | 10 <sup>11</sup>      | 10 <sup>11</sup> | 10 <sup>10</sup> |

Таблица 3

Динамика массы тела мышей в период введения экспериментальных добавок

| Кормовая добавка              | Масса тела, г |        |         |         |         |
|-------------------------------|---------------|--------|---------|---------|---------|
|                               | Исходная      | 7 дней | 14 дней | 21 день | 28 дней |
| Контроль                      | 16,8          | 17,3   | 17,8    | 18,2    | 18,6    |
| <i>Bacillus subtilis</i> 1719 | 16,5          | 17,4   | 18,3    | 19,1    | 20,0    |
| <i>Bacillus subtilis</i> 3Н   | 17,1          | 17,8   | 18,3    | 18,9    | 19,5    |
| ПК (суспензия)                | 16,9          | 17,5   | 18,7    | 19,9    | 21,3    |
| ПК (лиофилизат)               | 16,9          | 17,6   | 18,2    | 19,3    | 21,2    |
| ПК (угольный энтеросорбент)   | 16,7          | 17,4   | 18,3    | 19,5    | 21,3    |

Таблица 4

Прирост массы тела опытных животных

| Кормовая добавка              | Прирост массы тела<br>за 28 дней, % |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| Контроль                      | 10,8                                |
| <i>Bacillus subtilis</i> 1719 | 21,2                                |
| <i>Bacillus subtilis</i> 3Н   | 14,0                                |
| ПП (суспензия)                | 26,0                                |
| ПП (лиофилизат)               | 26,6                                |
| ПП (угольный энтеросорбент)   | 27,5                                |

Исследования показали, что у животных опытных и контрольных групп на протяжении всего периода наблюдения не заболело и не пало ни одной лабораторной мыши. Кроме того, не выявлено отклонений в их физиологическом и функциональном состоянии. Аппетит, водопотребление были сохранены.

Изучение нормальной микрофлоры интактных мышей показало наличие *Escherichia coli*, *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus acidophilus* в количестве  $10^5$ - $10^6$  КОЕ/см<sup>3</sup>, менее  $10^3$  и  $10^{11}$  КОЕ/см<sup>3</sup> соответственно. После введения антибиотика в течение 7 дней у мышей наблюдали гибель нормальной микрофлоры и контаминацию кишечника условно-патогенными микроорганизмами. Содержание в фекалиях *E.coli* повысилось до  $10^9$  КОЕ/см<sup>3</sup>, *B. bifidum* не обнаруживали совсем, а количество *L. acidophilus* снизилось до  $10^2$  КОЕ/см<sup>3</sup> г (табл. 1).

Результаты исследования микрофлоры мышей после коррекции экспериментального дисбиоза с помощью ПК и препаратов сравнения представлены в табл. 2. Применение ПК во всех испытанных формах приводило к увеличению количества бифидобактерий и молочнокислых бактерий уже на 7 сутки после введения, в то время как предложенные для сравнения индивидуальные компоненты не показывали такого действия. Таким образом, выявлены существенная бифидогенная и лактогенная активности ПК. Введение пробиотической композиции по изобретению в условиях индуцированного дисбиоза, способствующее увеличению количества бифидо- и лактобактерий, свидетельствует о ее выраженном пробиотическом действии.

В связи с тем, что при использовании пробиотической композиции по изобретению получен результат, по численным показателям превышающий результаты (табл. 3 и 4), полученные при испытании штаммов *B. subtilis* 1719 и *B. subtilis* 3Н по отдельности, это свидетельствует о наличии синергетического эффекта, за счет которого достигается наиболее высокая бифидогенная и лактогенная активности, что способствует повышению иммунитета, улучшению обмена веществ, лучшей усвояемости необходимых организму витаминов и, как следствие, увеличению прироста массы тела в короткие сроки.

Пример 2. Определение эффективной дозы пробиотической композиции.

Изучение эффективной дозы на основе штаммов *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3Н при пероральном введении проводили на белых мышах с начальной массой тела 18-20 г. В исследовании использовали животных, разброс по массе которых не превышал 10%. Лабораторных мышей делили на группы по 5 животных в каждой группе соответственно.

Дизайн исследования.

Использовались экспериментальные группы животных, получавших пробиотические композиции в различных концентрациях, вводимых перорально, а также группа контроля. В эксперименте использовали один вид животных: белые беспородные мыши. Мыши опытных групп получали пробиотическую композицию в виде суспензии, содержащую указанное количество каждого из штаммов 1 раз день 0,01 мл/100 г массы животного в следующих дозах:  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1,5 \times 10^8$  и  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл. Для удобства введения необходимое количество композиции доводили до объема 0,5 мл физиологическим раствором. Мыши контрольной группы не получали никаких препаратов.

Введение пробиотической композиции осуществляли после 24-часовой голодной выдержки перорально в течение 14 суток на фоне экспериментального дисбиоза, вызванного введением опытным мышам доксициклина гидрохлорида в количестве 0,01% от массы тела в течение 7 дней.

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

Результаты исследования.

Установлено, что после введения антибиотика в течение 7 дней у мышей наблюдалась антибиотикоассоциированная диарея. Анализ просветной микрофлоры фекальных масс показал ухудшение состояния нормальной микрофлоры животных и контаминацию кишечника условно-патогенными микроорганизмами. Данные анализа микрофлоры представлены в табл. 5.

Таблица 5

Сравнительная оценка микрофлоры опытных мышей

| Микроорганизмы                | Количество микроорганизмов, КОЕ/г фекалий |                  |
|-------------------------------|-------------------------------------------|------------------|
|                               | до дисбиоза                               | мыши с дисбиозом |
| <i>E.coli lac<sup>+</sup></i> | $10^5$ – $10^6$                           | $10^9$           |
| <i>Bifidobacterium spp.</i>   | менее $10^3$                              | не обнаружены    |
| <i>Lactobacillus spp.</i>     | $10^{10}$                                 | $10^3$           |

Результаты исследования микрофлоры мышей после коррекции экспериментального дисбиоза представлены в табл. 6. Применение пробиотической композиции во всех испытанных дозах приводило к увеличению количества бифидобактерий и молочнокислых бактерий уже на 7 сутки после введения. Результаты при введении препаратов с содержанием микроорганизмов  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл не удовлетворяют показателям нормы, при содержании микроорганизмов  $1,5 \times 10^8$  и  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл данные сопоставимы с  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл. При сравнении предлагаемых дозировок можно сделать вывод о том, что оптимальным количеством для проявления должного эффекта пробиотической композиции необходимым и достаточным является содержание микроорганизмов  $1-1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл.

Таблица 6

Сравнительное влияние различных дозировок пробиотической композиции на микрофлору мышей при экспериментальном дисбиозе

| Микроорганизмы                | Содержание микроорганизмов в пробах |                 |                 |                   |                 |
|-------------------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
|                               | Дозировка, КОЕ/мл                   |                 |                 |                   |                 |
|                               | Контроль                            | $1 \times 10^7$ | $1 \times 10^8$ | $1,5 \times 10^8$ | $1 \times 10^9$ |
| контрольное время – 7 суток   |                                     |                 |                 |                   |                 |
| <i>E.coli lac<sup>+</sup></i> | $10^9$                              | $10^8$          | $10^6$          | $10^6$            | $10^5$          |
| <i>Bifidobacterium spp.</i>   | не обнаружены                       | $10^1$          | $10^3$          | $10^3$            | $10^3$          |
| <i>Lactobacillus spp.</i>     | $10^3$                              | $10^5$          | $10^{11}$       | $10^{10}$         | $10^{11}$       |
| контрольное время – 14 суток  |                                     |                 |                 |                   |                 |
| <i>E.coli lac<sup>+</sup></i> | $10^9$                              | $10^7$          | $10^5$          | $10^5$            | $10^5$          |
| <i>Bifidobacterium spp.</i>   | не обнаружены                       | $10^2$          | $10^4$          | $10^5$            | $10^5$          |
| <i>Lactobacillus spp.</i>     | $10^2$                              | $10^9$          | $10^{11}$       | $10^{10}$         | $10^{11}$       |

Исследования показали, что оптимальным количеством для проявления должного эффекта пробиотической композиции необходимым и достаточным является содержание микроорганизмов *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3Н в композиции  $1-1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл.

Пример 3. Характеристика антагонистической активности.

В ходе проведенных исследований были изучены морфологические, физиолого-биохимические, генетические и другие биологические свойства различных штаммов *Bacillus subtilis*, а также их сочетаний в различных комбинациях.

Важнейшим критерием отбора пробиотических штаммов является изучение их антагонистической активности по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам (УПМ), которая обеспечивает колонизационную резистентность желудочно-кишечного тракта. Цель исследования - охарактеризовать и сравнить антагонистическую активность различных сочетаний штаммов *Bacillus subtilis*, часто используемых в качестве пробиотиков, и предлагаемой пробиотической композиции.

Объекты исследований.

Штамм: *Bacillus subtilis* 1719, Коллекция Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, № 277.

Штамм: *Bacillus subtilis* 3Н, Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, № 248.

Штамм: *Bacillus subtilis* 534, Всероссийская коллекция микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН; ВКМ № 1666 Д.

Штамм: *Bacillus subtilis* 12В, "Споровит", Коллекция чистых культур микроорганизмов ВГНКИ.

Ветеринарная пробиотическая композиция на основе штаммов *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3Н по изобретению.

Штаммы тест-культур из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ "НЦЭСМП", используемые для определения антагонистической активности: *Staphylococcus aureus* "Филиппов", *Shigella Sonnei* 170, *Proteus mirabilis* 24a, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 9022, *Staphylococcus aureus* 29213, *Candida albicans* 690.

Дизайн исследования.

Исследования 20-часовых бактериальных культуральных жидкостей штаммов осуществляли методом отсроченного антагонизма. Исследуемые образцы содержали  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл каждого из штаммов. Культуру штаммов высевали петлей по диагонали в центре чашки Петри с агаризованной мясопептонной средой. Посевы инкубировали в термостате при  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Затем к выросшей культуре подсеивали штрихом тест-микроорганизмы (500-миллионные суспензии суточных культур в физиологическом растворе). Учет результатов проводили через 18 ч инкубирования при  $37^\circ\text{C}$  по величине зон отсутствия роста тест-культур. Контролем роста тест-культур служило параллельное выращивание их на чашках с агаризованной средой без культуры исследуемого штамма.

Результаты.

Полученные данные результатов испытания представлены в табл. 7.

Таблица 7

Антагонистическая активность комбинаций штаммов бактерий *B. subtilis*

| Тест-штамм                     | Задержка роста тест-культур, мм ( $M \pm m$ ) |                                      |                                        |                                                        |                          |                            |                                        |
|--------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------------------|
|                                | <i>B. subtilis</i><br>3H + <i>B.</i>          | <i>B. subtilis</i><br>3H + <i>B.</i> | <i>B. Subtilis</i><br>1719 + <i>B.</i> | <i>B. Subtilis</i><br>1719 + <i>B. Subtilis</i><br>12B | <i>B. subtilis</i><br>3H | <i>B. Subtilis</i><br>1719 | <i>B. Subtilis</i><br>1719 + <i>B.</i> |
|                                | <i>Subtilis</i><br>534                        | <i>Subtilis</i><br>12B               | <i>subtilis</i><br>534                 |                                                        |                          |                            | <i>subtilis</i><br>3H                  |
| <i>S. aureus</i><br>«Филиппов» | 19± 2,6                                       | 18± 2,0                              | 20 ± 1,2                               | 18 ± 1,1                                               | 20±0,9                   | 22±1,8                     | 24± 1,6                                |
| <i>S. sonnei</i> 170           | 23± 1,6                                       | 20± 1,2                              | 22 ± 1,7                               | 20 ± 1,8                                               | 22±1,3                   | 24±2,2                     | 26± 0,9                                |
| <i>P. mirabilis</i><br>24a     | 17± 1,9                                       | 17± 1,9                              | 18 ± 1,5                               | 19 ± 2,5                                               | 18±2,0                   | 19±2,0                     | 22± 2,3                                |
| <i>E. coli</i> ATCC<br>25922   | 14±1,0                                        | 13±2,1                               | 18 ± 1,6                               | 22 ± 1,2                                               | 15±2,1                   | 24±0,7                     | 26± 1,5                                |
| <i>P. aeruginosa</i><br>9022   | 16 ± 1,8                                      | 15 ± 1,7                             | 18 ± 1,5                               | 20 ± 1,9                                               | 17±3,3                   | 23±2,8                     | 27± 1,8                                |
| <i>S. aureus</i><br>29213      | 15± 1,6                                       | 18± 2,2                              | 19 ± 1,5                               | 19 ± 3,0                                               | 16±1,5                   | 21±0,8                     | 22± 2,1                                |
| <i>C. albicans</i><br>690      | 29±3,1                                        | 30±2,0                               | 28±2,2                                 | 29±1,7                                                 | 31±2,8                   | 29±1,1                     | 30±3,8                                 |

Как видно из табл. 7, различные комбинации пробиотических штаммов бактерий рода *Bacillus subtilis* проявляют антагонистическую активность к широкому классу условно-патогенных микроорганизмов. Наилучшие показатели зон торможения роста выявлены у комбинации *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3H, что свидетельствует о более выраженном их синергетическом действии.

Таким образом, пробиотическая композиция по изобретению обладает ингибирующим действием по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, повышает биодоступность кормов, не подавляя при этом микрофлору кишечника, активизирует работу кишечника, повышает устойчивость микрофлоры к негативным микробиологическим воздействиям за счет активации функции иммунной системы и литического (детоксицирующего) действия синтезируемых ферментов.

Применение пробиотической композиции по изобретению позволит существенно уменьшить расходы на лечение заболеваний у животных и птицы, повысить их продуктивность.

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. Пробиотическая композиция, включающая смесь биомассы живых и споровых форм бактерий штаммов *Bacillus subtilis* 1719 в титре  $1-1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл и *Bacillus subtilis* 3H в титре  $1-1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл.
2. Пробиотическая композиция по п.1, дополнительно включающая фармакологически приемлемый носитель, растворитель и/или наполнитель.
3. Пробиотическая композиция по п.1 в форме суспензии для перорального применения.
4. Пробиотическая композиция по п.1 в форме лиофилизата.
5. Пробиотическая композиция по п.1, в которой бактерии *Bacillus subtilis* 1719 и *Bacillus subtilis* 3H иммобилизованы на угольном энтеросорбенте.
6. Способ профилактики и/или лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта в ветеринарии, включающий применение пробиотической композиции по любому из пп.1-5.
7. Способ по п.6, в котором пробиотическую 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.

8. Способ по п.7, в котором пробиотическую композицию вводят из расчета 1 мл на 10 кг массы животного или птицы.

9. Кормовая добавка, включающая пробиотическую композицию по любому из пп.1-5.

10. Кормовая добавка по п.9, дополнительно включающая растительные, минеральные, технологические и/или балансирующие добавки.

