

8.



На правах рукописи

A handwritten signature in black ink.

ИВАНОВ ЕВГЕНИЙ НИКОЛАЕВИЧ

20 АВГ 2009

**ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ
ОЦЕНКА ПРЕПАРАТА «МИКОСУБТИЛ» И ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТЬ
ПРИ ОБЕЗВРЕЖИВАНИИ КОРМОВ ОТ МИКОТОКСИНОВ**

16.00.04 – ветеринарная фармакология с токсикологией

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2009

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (г. Казань).

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Тремасов Михаил Яковлевич

доктор биологических наук, профессор
Иванов Аркадий Васильевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Хисматуллина Наиля Анваровна

доктор ветеринарных наук, профессор
Софронов Владимир Георгиевич

Ведущее учреждение: Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (ВНИИВСГ), г. Москва

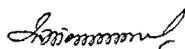
Защита состоится «29» 09 2009г. в «10» часов на заседании диссертационного совета Д – 220.012.01 при ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных»

(420075, г. Казань, Научный городок - 2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «ФЦТРБ - ВНИВИ» (г. Казань)

Автореферат разослан «06» 08 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат ветеринарных наук



В.И. Степанов

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы. Корма растительного происхождения, контаминированные плесневыми грибами, представляют реальную опасность не только для здоровья сельскохозяйственных животных, но и для здоровья человека - потребителя продуктов животноводства. Существует возможность накопления в организме микотоксинов, вторичных метаболитов плесневых грибов, кроме того, угнетается полезная микрофлора самих растений (А.Ф. Кузнецов, 2001; Г.П. Кононенко, 2003; А.В. Иванов, М.Я. Тремасов, К.Х. Папуниди и др., 2008). Наиболее часто корма загрязняются микотоксинами грибов рода *Fusarium* и *Aspergillus* (В.Г. Иванов, 1981; А.М. Смирнов, Г.П. Кононенко, Г.А. Таланов, 1999).

Растительные субстраты, обсемененные токсигенными грибами, не могут быть использованы в корм без соответствующей санитарной обработки, так как микотоксины у животных могут вызывать субхронические, хронические и острые микотоксикозы. Микотоксины даже в малых дозах вызывают значительное снижение продуктивности, прироста массы тела, ослабление резистентности организма животных, при этом создаются благоприятные условия для возникновения инфекционных и других болезней (М.Я. Тремасов, 2005; В.А. Антипов, 2005; В.И. Дорожкин, В.Г. Иванов, 2007).

В настоящее время разработаны физические, химические и биологические способы деконтаминации кормов от токсигенных, патогенных грибов и микотоксинов. Однако большинство физических и химических методов детоксикации дорогостоящие, требуют определенных производственных затрат, отрицательно влияют на показатели качества кормов и незначительно снижают количество микотоксинов (Д.В. Алеев, 2007; A.L. Patey, 1987; E. Boutrif, 1998).

В ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ" выделены изоляты микроорганизмов *V. subtilis* для обработки кормов, контаминированных микотоксинами. Однако оставались неизученными морфологические, физиолого-биохимические,

патогенные свойства микроорганизмов и обезвреживающее действие культуры *B. subtilis* в отношении микотоксинов.

1.2 Цель и задачи исследований. Целью работы явились скрининг и изучение биологических свойств микроорганизмов рода *Bacillus* для разработки биологических средств обезвреживания кормов от микотоксинов, сравнительная оценка их эффективности при профилактике микотоксикозов животных.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи:

1. Изучить морфологические, культуральные, биохимические и патогенные свойства бактерий рода *Bacillus* и их антагонистическое действие по отношению *Aspergillus flavus* и *Fusarium sporotrichiella*;

2. Провести скрининг и дать оценку профилактической эффективности препарата, созданного на основе отобранного изолята *B. subtilis* при длительном поступлении Т-2 и афлатоксина В₁, учитывая изменение клинических, гематологических и биохимических показателей и факторов неспецифической резистентности организма;

3. Провести ветеринарно-санитарную оценку мяса, патологоанатомические и гистологические исследования органов и тканей получавших корм, обработанный препаратом на основе *B. subtilis*-2006;

4. Разработать способ профилактики микотоксикозов животных препаратом на основе *B. subtilis* в условиях животноводческих предприятий.

1.3 Научная новизна. Впервые экспериментально обосновано применение препарата «Микосубтил», разработанного на основе *B. subtilis*, для обезвреживания кормов от Т-2 токсина и афлатоксина В₁.

Установлена антагонистическая активность изолятов *B. subtilis* в отношении грибов рода *Aspergillus* и *Fusarium* – продуцентов микотоксинов и их безвредность для животных. Проведен скрининг и дана оценка профилактической эффективности препарата, созданного на основе отобранного изолята *B. subtilis* при длительном поступлении Т-2 и

афлатоксина В₁, с учетом изменения клинических, гематологических и биохимических показателей и факторов неспецифической резистентности организма. Проведена ветеринарно-санитарная экспертиза мяса и изучена гистоструктура тканей внутренних органов животных после применения препарата «Микосубтил».

1.4 Практическая ценность работы. В качестве средств профилактики при воздействии Т-2 токсина и афлатоксина на организм животных рекомендуется применять препарат «Микосубтил» в концентрации 10,0 мл/кг корма с содержанием 2 млрд. микр. кл./мл.

По результатам проведенных исследований разработана «Инструкция по применению препарата «Микосубтил» для обезвреживания кормов от микотоксинов», утвержденная Главным управлением ветеринарии Кабинета Министров Республики Татарстан (2009).

1.5 Основные положения, выносимые на защиту:

- антагонистические свойства изолята *B. subtilis* - 2006 по отношению к токсигенным грибам рода *Aspergillus* и *Fusarium*.

- эффективность препарата на основе изолята *B. subtilis* – 2006 для обезвреживания кормов от микотоксинов;

- клинико-гематологические, биохимические показатели и факторы неспецифической резистентности животных при воздействии Т-2 токсина и афлатоксина на фоне применения препарата «Микосубтил»

1.6 Апробация материалов диссертации. Основные материалы диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на научных сессиях ученого совета ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ" по итогам НИР за 2006-2008 гг., Международных и Всероссийских симпозиумах (Казань, 2006, 2007, 2008, 2009; Москва, 2008, 2009; Санкт-Петербург, 2008; Екатеринбург, 2008; Ижевск 2008; Ульяновск, 2008).

1.7 Публикации. По результатам выполненных исследований опубликовано 11 научных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ: «Ветеринарный врач», «Вестник Российской

военно-медицинской академии», «Труды междисциплинарного микологического форума».

1.8 Объем и структура работы. Материалы диссертации изложены на 156 страницах компьютерного текста и включают следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список использованной литературы, приложения. Работа иллюстрирована 34 таблицами и 15 рисунками. Список использованной литературы содержит 210 библиографических источников, в том числе 73 зарубежных авторов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в 2007–2009 гг. в отделе токсикологии ФГУ «Федеральный Центр Токсикологической Радиационной Безопасности (г. Казань) производственные исследования проведены в условиях ООО «Новая жизнь» Кукморского района Республики Татарстан.

Опыты проводили на 71 белой мыши, 190 белых крысах, 15 овцах и 70 поросятах. В течение всего опыта животные находились в одинаковых условиях содержания и кормления.

В экспериментах использовали следующие культуры микроорганизмов: *Fusarium sporotrichiella*, штамм 2м-15, а также изоляты: *B. subtilis* - 2006; *B. subtilis* - F-2; *B. subtilis* - F-3; *B. subtilis* - К.М.; *B. licheniformis* и грибы рода *Aspergillus flavus*, хранящиеся в коллекции лаборатории микотоксинов ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Концентрацию микроорганизмов определяли по отраслевому стандарту-мутности (ОСО мутности), производства института им. Тарасевича.

Морфологические и культуральные свойства микроорганизмов изучали по характеру их роста в жидких (МПБ) и на плотных (МПА) питательных средах, тинктуральные свойства определяли световой микроскопией с использованием окулярного микрометра АМ-9-2.

Патогенные свойства изучали путем подкожного и внутрибрюшинного введения белым мышам 0,5-1 мл взвеси микроорганизмов в МПБ, с содержанием в 1 мл 100, 200, 500 млн. и 1 млрд. микробных клеток.

Морфологические исследования крови проводили по общепринятой методике. Биохимические исследования состояли из определения в сыворотке крови общего белка на рефрактометре ИРФ-22, а его фракций – турбидиметрическим методом (И.П. Кондрахин, 2004); активности аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), креатинкиназы, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), щелочной фосфатазы, а также содержания азота мочевины, креатинина, глюкозы, пировиноградной кислоты, холестерина и концентрации общего кальция, неорганического фосфора проводили на анализаторе «Microlab 200».

Содержание Т-лимфоцитов в периферической крови определяли методом спонтанного розеткообразования с гетероциклическими эритроцитами Е-РОК и ЕАС-РОК (И.П. Кондрахин и др., 1985), лизоцимную активность по И.Ф. Храбустовскому и Ю.М. Маркову (1974). Фагоцитарную активность нейтрофилов изучали по С.А. Кост и М.И. Стенко (1974), в качестве тест – микроба использовали *Staphilococcus aureus* штамм 209.

Изучение антагонистических свойств штаммов рода *Bacillus* проводили в отношении грибов-продуцентов Т-2 токсина и афлатоксина В₁ (*Fusarium sporotrichiella*, штамм 2м-15 и *Aspergillus flavus*).

Токсичность препарата «Микосубтил» оценивали в опытах на белых крысах и поросятах согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (2005). Общую токсичность корма определяли биотестированием на стилонихиях, кроликах и мышах согласно ГОСТу Р 52337-2005.

Ветеринарно-санитарную экспертизу мяса проводили в соответствии с ГОСТами 7269-79, 23392-78, 21237-75, «Правилами ВСЭ» (1988). Биологическую ценность мяса определяли на крысятах по приросту массы

тела и коэффициенту эффективности корма. Гистологические исследования проводили совместно с н.с. Губеевой Е.Г.

Обработку экспериментально полученного цифрового материала проводили статистическим методом с применением критерия достоверности по Стьюденту на персональном компьютере с использованием программного пакета Microsoft Excel XP (2000).

Библиографическое описание использованных в диссертации литературных источников осуществляли в соответствии с требованиями действующего ГОСТа.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Антагонистические свойства микроорганизмов рода *Bacillus*

В качестве микробов-антагонистов использовали изоляты микроорганизмов рода *Bacillus*: *B. subtilis* - 2006; *B. subtilis* - F-2; *B. subtilis* - F-3; *B. subtilis* - К.М. и *B. licheniformis*. Исследования проводили с использованием культуральной массы микроорганизмов, с концентрациями 1млрд. микр. кл., 500 и 200 млн. микробных клеток. На основании проведенных опытов наиболее эффективными, обладающими выраженными антагонистическими действиями в отношении плесневых грибов *Fusarium sporotrichiella*, 2м-15 и *Aspergillus flavus* оказались изоляты *B. subtilis* – 2006 и F 2.

3.2 Биологические свойства изолятов *B. subtilis*

При микроскопировании исследуемых изолятов из агаровых или бульонных культур были выявлены следующие грамположительные удлиненной формы микроорганизмы: изолят *B. subtilis*-2006 длиной $0,05\pm 0,02$ мкм и шириной $0,01\pm 0,001$ мкм, изолят F-2 длиной $0,02\pm 0,001$ и шириной $0,01\pm 0,001$, изолят К.М. длиной $0,02\pm 0,001$ и шириной $0,01\pm 0,001$, которые в мазках располагались поодиночке, парами и короткими цепочками.

На МПА данные микроорганизмы образовали средние, темно-коричневого цвета округлые, плоские, вязкой консистенции, непрозрачные колонии с гладкой поверхностью и ровными краями (S-формы колоний).

Рост этих колоний на МПБ сопровождался помутнением с формированием пленки легко разбивающейся при встряхивании.

Исследуемые изоляты обладали слабой сахаролитической активностью и на средах Гисса ферментировали без образования газа сахарозу и лактозу.

Исследуемые изоляты обладают амилазной активностью, протеолитической (разжижают желатин), каталазной и уреазной активностью. Не образовали сероводород, индол.

Введение подкожно и внутрибрюшинно белым мышам 0,5-1 мл взвеси микроорганизмов *B. subtilis*, с содержанием в 1 мл 100; 200; 500 млн. 1 млрд. микр. кл. не приводит к гибели животных, следовательно, они не обладают патогенностью. При вскрытии на 7 сут убитых животных патологоанатомические изменения во внутренних органах не наблюдались. Из тканей внутренних органов убитых животных выделяли исходную культуру.

3.3 Обезвреживающие свойства изолятов *B. subtilis*

В качестве объектов (кормов) использовали комбикорм, естественно загрязненный микотоксинами, уровень которых в 3-4 раза превышал ПДК.

Использование изолята *B. subtilis* - 2006 позволило значительно снизить содержание афлатоксина В₁. Так при внесении изолята в концентрации 2 млрд. микр. кл. через 24 ч микотоксин не обнаруживался, а в концентрации 1 млрд. микр. кл. выявлялись лишь следовые количества (0,001 мг/кг). Использование данного изолята для обезвреживания в концентрациях 0,5 и 0,2 млрд. микр. кл. снизило содержание афлатоксина В₁ через 48 ч на 95-92,5%. Следовые количества микотоксина (0,001 мг/кг) обнаруживались спустя 72 ч после обработки. В контрольной пробе на протяжении всего периода исследования количество афлатоксина В₁ не изменялось.

Применение изолята *B. subtilis* - 2006 позволило значительно снизить содержание Т-2 токсина в корме. При внесении изолята в концентрации 2 млрд. микр. кл. через 1 ч микотоксин обезвреживался на 92,2%, а в

концентрации 1 млрд. микр. кл. - на 81,5%. При использовании изолята для обезвреживания в концентрациях 0,5 и 0,2 млрд. микр. кл. содержание Т-2 токсина снизилось на 61,1 и 43,1% соответственно. Следовые количества микотоксина обнаруживались спустя 24 ч после обработки в концентрации 1 млрд. микр. кл. В контрольной пробе на протяжении всего периода исследования количество Т-2 токсина не изменялось.

3.4 Профилактическая эффективность изолята *B. subtilis* - 2006 при воздействии Т-2 и афлатоксина В₁ на белых крысах

Исследования были проведены на 90 белых крысах живой массой 160-180 г, которые по принципу аналогов были разделены на 5 групп. Животные первой и второй групп получали с кормом Т-2 токсин и афлатоксин В₁ в дозах 450- и 200 мкг/кг соответственно. Животные третьей и четвертой групп получали корм, содержащий Т-2 и афлатоксин В₁ в тех же дозах и обработанный изолятом 2006 *B.subtilis* в дозе 10,0мл/кг корма. Животные пятой группы служили контролем и получали обычный корм.

3.4.1 Биохимические показатели сыворотки крови белых крыс при воздействии Т-2 и афлатоксина В₁ на фоне применения изолята *B. subtilis* - 2006

О негативном действии Т-2 и афлатоксина В₁ на животных свидетельствуют результаты исследований белкового обмена. В сыворотке крови крыс, получавших микотоксины на 30 сут эксперимента, наблюдали достоверное снижение содержания общего белка – на 24,0 и 27,0% ($p<0,05$), содержания альбуминов – на 24,0 и 36,0% ($p<0,01$). Воздействие микотоксинов на фоне применения изолята *B.subtilis* - 2006 предотвращало белковый дисбаланс в организме. Так, в сыворотке крови крыс к концу эксперимента происходило снижение содержания общего белка относительно контроля на 9,5 и 5,4%, альбуминов – на 17,1 и 20,1% соответственно.

3.4.2 Патоморфологические изменения у белых крыс при воздействии Т-2 токсина и афлатоксина В₁ на фоне применения изолята *B. subtilis* - 2006

При вскрытии крыс, получавших Т-2 токсин и афлатоксин В₁ с кормом, наблюдали следующие изменения: шерстный покров был

взъерошенный и грязный, отмечались эрозии и некрозы кожи губ и слизистых оболочек ротовой полости и глотки, в подкожной клетчатке отмечены многочисленные точечные и полосчатые кровоизлияния, отсутствие жировых отложений. Сердце округлой формы, в полостях несвернувшаяся кровь темно-вишневого цвета. Легкие среднего размера, отёчны, кровенаполнены. Печень темно-красного цвета, дряблая, не эластичная с очагами некроза, увеличена в размерах. Почки неравномерно окрашены, капсула снимается легко, граница коркового и мозгового слоев выражена нечётко. Патоморфологическая картина крыс, получавших корм, содержащий Т-2 и афлатоксин В₁, обработанный изолятом *V. subtilis* - 2006, характеризовалась менее значительными изменениями.

При гистологическом исследовании внутренних органов крыс, получавших с кормом в течение 30 сут Т-2 и афлатоксин В₁ были обнаружены признаки нарушения проницаемости сосудов в виде единичных экстрavasатов в почках, печени, с кровоизлияниями в красную пульпу селезенки. В стенке кишечника имелись признаки фибриноидного некроза поверхностных слоев. В печени развивалась зернистая дистрофия, кариолизис единичных гепатоцитов, очаговые холестазы с обширными участками некроза паренхимы, нарушением балочного строения долек, в портальных трактах определялись скопления лимфоцитов, в сосудах - лимфоцитоз. В почках - зернистая дистрофия эпителия извитых канальцев с очаговой десквамацией верхушек, белковые массы в просветах канальцев. В легких определялись признаки очаговой полиэкссудативной пневмонии. При введении в рацион изолята *V. subtilis* - 2006 дегенеративно-дистрофические изменения в органах и тканях были менее выражены.

На основе изолята *V. subtilis* – 2006 нами был создан препарат «Микосубтил» для обезвреживания кормов от микотоксинов.

3.5 Определение безвредности препарата «Микосубтил»

3.5.1 Острая токсичность препарата «Микосубтил» на белых крысах и поросятах

Исследования проведены на 30 белых крысах массой 180-200 г, разделенных на 2 равные группы и 20 поросятах массой 20-25 кг по 10 животных в каждой.

Препарат «Микосубтил» вводили крысам в объеме 3 мл (2 млрд. микр. кл./мл), контрольные животные получали физиологический раствор в аналогичном объеме. Поросятам препарат задавали внутрь, однократно: животным первой группы - 50 мл (2 млрд. микр. кл./мл), поросята второй группы служили контролем и получали 50 мл физиологического раствора.

В результате проведенных опытов установлено, что препарат в указанных дозах не оказывает токсического действия. Клинически подопытные животные не отличались от контрольных. У животных, получавших соответствующие дозы «Микосубтила» и физиологического раствора отмечалась небольшая, быстро проходящая одышка, тяжесть в движениях, которая продолжалась в течение 30-40 минут. Других изменений со стороны клинического состояния животных не наблюдалось.

При диагностическом вскрытии белых крыс (через 5 сут) после введения препарата патологических изменений внутренних органов не выявлено.

3.5.2 Безвредность препарата «Микосубтил» на белых крысах и поросятах при многократном поступлении в организм

Безвредность препарата при многократном поступлении в организм изучена на белых крысах массой 120-140 г и на 20 поросятах массой 25-30 кг. Для оценки длительного воздействия препарата Микосубтил на организм животных были сформированы 4 группы белых крыс и две группы поросят по 10 животных в каждой.

Крысы первой группы служили контролем и внутрижелудочно получали 2 мл физиологического раствора. Крысам второй группы вводили 2

мл, третьей - 4 мл, четвертой - 6 мл препарата. Продолжительность опыта составила 20 суток.

За исследуемый период отрицательного действия препарата на организм крыс не установлено. Состояние животных как в опытной, так и в контрольной группах было хорошее—движения активные, координированные, шерстный покров блестящий, волос плотно удерживается в волосяных луковицах. Через 20 сут после начала опыта по 2 животных из каждой группы были убиты для диагностических исследований. При вскрытии крыс видимых патологоанатомических изменений не установлено.

В результате изучения безвредности Микосубтила выявлено, что десятикратное введение препарата в дозе 50 мл (2 млрд. микр. кл./мл) не вызывало видимых изменений в организме поросят.

Морфологические показатели крови подопытных животных не отличались от показателей контрольной группы и находились в пределах физиологической нормы. Среднесуточный прирост массы тела составил на 30 сут в первой группе – $163,0 \pm 1,16$ г, во второй – $159,0 \pm 1,1$ г.

3.6 Определение общей токсичности корма

В корме, обработанном препаратом «Микосубтил», выживаемость стилонихий составила 90%, что свидетельствует об отсутствии токсичности корма, в необработанном корме выжило 25% инфузорий - корм токсичный.

На участке кожи, куда был нанесен экстракт корма, обработанный препаратом, наблюдалась незначительная гиперемия, сохранявшаяся не более 2 сут после повторного нанесения экстракта и не сопровождающаяся шелушением кожи. На участке кожи, после нанесения экстракта из необработанного препаратом корма, наблюдалось шелушение, болезненность и уплотнение.

Из группы мышей, которым вводили экстракт из необработанного корма, погибли две, при вскрытии погибших и убитых животных наблюдали геморрагическое воспаления желудочно-кишечного тракта.

В группе мышей, которым вводили экстракт из обработанного корма, все животные остались живы. При вскрытии убитых мышей патолого-анатомических изменений не установлено.

3.7 Профилактическая эффективность препарата «Микосубтил» при воздействии Т-2 и афлатоксина В₁ на организм овец

Для решения данной задачи было сформировано 5 групп овец по 3 в каждой. Овцам первой группы ежедневно задавали корм, содержащий Т-2 токсин в дозе 450 мкг/кг, второй – афлатоксин В₁ в дозе 200 мкг/кг. Животным третьей и четвертой групп задавали корм, содержащий Т-2 и афлатоксин В₁, обработанный препаратом «Микосубтил». Пятая группа служила контролем.

3.7.1 Морфологические показатели крови овец при воздействии микотоксинов на фоне применения препарата «Микосубтил»

На 10 сут эксперимента у овец первой и второй групп, получавших токсичный корм, отмечалось незначительное снижение количества эритроцитов, лейкоцитов, содержание гемоглобина. К 30 сут уменьшение количества эритроцитов, относительно данных животных контрольной группы, составило - 16,6% ($p < 0,05$) и 12,6%, лейкоцитов – на 20,1% ($p < 0,05$) и 13,4%, содержания гемоглобина – на 20,3 ($p < 0,01$) и 19,7% ($p < 0,05$). У животных в третьей и четвертой группах снижение этих показателей было не достоверным не отличалось от показателей животных контрольной группы.

3.7.2 Биохимические показатели крови овец при воздействии микотоксинов на фоне применения препарата «Микосубтил»

У овец первой и второй групп, которым задавали Т-2 и афлатоксин В₁ с кормом, наблюдали закономерное уменьшение количества общего белка. Так, на 10 сут отмечали его снижение на 7,4 и 8,1%, на 20 сут – на 11,5 и 12,1% ($p < 0,05$), на 30 сут – на 15,1 и 19,5% ($p < 0,01$) соответственно. У животных третьей и четвертой групп, которым задавали корм, содержащий микотоксины и обработанный препаратом «Микосубтил», наблюдали незначительные изменения данного показателя. Процентное содержание в белке альбуминов к 30 сут исследований у овец первой группы снизилось на 10,6% ($p < 0,05$), второй - на 12,7% ($p < 0,05$), третьей - на 4,2%, в четвертой - на

8,5%. Результаты исследования активности ферментов представлены в табл. 1.

Таблица 1 - Активность ферментов а крови овец при воздействии микотоксинов на фоне применения препарата «Микосубтил» (n=3)

Срок иссл., сут	Группа животных				
	1	2	3	4	контроль
аланинаминотрансфераза, Ед/л					
10	31,7±1,91	32,1±0,95	30,4±1,56	30,8±2,19	29,2±2,05
20	35,3±0,96**	36,5±0,81**	31,7±1,48	31,5±0,99	29,2±1,48
30	37,8±1,56**	38,1±1,24**	33,9±1,95	33,4±1,76	30,9±1,31
аспартатаминотрансфераза, Ед/л					
10	126,1±0,92	124,8±1,20	123,1±1,48	121,6±0,57	122,2±1,10
20	132,0±1,35	130,7±2,54	123,8±2,33	124,3±1,38	122,0±2,11
30	137,9±1,81*	138,0±2,57*	125,0±2,51	125,3±1,74	123,4±2,15
креатинкиназа, Ед/л					
10	380,5±38,2	381,1±35,6	369,8±24,1	369,7±23,6	365,3±25,8
20	395,9±21,5	395,0±17,5	370,9±20,1	370,9±16,4	364,7±19,3
30	429,0±21,5*	429,7±23,8*	376,3±17,1	376,7±19,3	364,5±18,6
гамма-глутамилтрансфераза, Ед/л					
10	15,6±0,53	15,2±0,46	14,2±0,49	14,2±0,48	14,0±0,42
20	17,3±0,92**	17,8±0,75**	14,8±0,56	15,0±0,61	13,8±0,84
30	18,1±0,83**	17,9±0,91**	15,4±0,51	15,1±0,62	14,0±0,75
лактатдегидрогеназа, Ед/л					
10	588,0±25,9	586,0±29,7	566,8±31,6	565,5±27,5	559,1±31,4
20	606,9±32,6	596,9±27,3	565,3±30,1	563,5±23,8	561,1±34,1
30	623,1±29,3*	620,3±27,8*	567,1±22,1	569,8±24,1	559,1±23,4
щелочная фосфатаза, Ед/л					
10	100,0±0,9*	102,0±1,3*	89,4±1,5	90,0±1,3	88,5±1,9
20	108,0±1,6**	107,0±2,1**	90,0±1,24	90,8±1,84	89,7±1,1
30	123,0±1,9***	120,0±1,5***	91,8±1,10	92,7±1,31	90,6±1,38

Примечание: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001.

Степень активности ферментов в сыворотке крови отражает тяжесть и поражения печёночных клеток. В наших исследованиях отмечено увеличение активности АЛТ в крови подопытных овец на всём протяжении опыта. Так, увеличение активности АЛТ в крови овец, получавших Т-2 токсин к 30 сут составило 22,3%; у овец, получавших афлатоксин В₁ на 30 сут – 23,3%. У животных третьей и четвертой групп регистрировали менее выраженное

увеличение активности АЛТ - к концу эксперимента оно составило 9,7 и 8,0% соответственно. Степень активности фермента АСТ в сыворотке крови овец, получавших корм, содержащий Т-2 и афлатоксин В₁, увеличилась к 30 сут на 11,7 и 11,8% соответственно. Активность АСТ у животных, получавших обработанный корм, была незначительно выше контроля. Увеличение активности ГГТ в крови овец, получавших микотоксины, к концу исследований составило 29,2 и 27,8% соответственно. Активность ЛДГ в сыворотке крови овец, получавших корм, контаминированный Т-2 и афлатоксином В₁, увеличилась на 36,3 и 32,8% соответственно. У подопытных животных при интоксикации микотоксинами регистрировалось увеличение активности креатинкиназы, которое составило 17,6 и 17,8% соответственно. В проведенных исследованиях отмечено увеличение активности щелочной фосфатазы сыворотки крови овец во всех группах животных, наибольшие значения которой регистрировали в непрофилактированных группах, так, к 30 сут в группе овец, получавших контаминированный Т-2 и афлатоксином В₁ корм, увеличение активности щелочной фосфатазы составило 36,3 и 32,8%. У профилактированных препаратом «Микосубтил» животных активность данных ферментов (ГГТ, ЛДГ, креатинкиназы и щелочной фосфатазы) увеличилась незначительно.

3.7.3 Влияние препарата «Микосубтил» на показатели естественной резистентности овец

Результаты исследований по изучению влияния препарата Микосубтил на клеточные факторы неспецифической резистентности овец представлены в табл. 2.

Фагоцитарная активность нейтрофилов у овец в первой и второй групп к 10 сут эксперимента снизилась относительно группы контроля на 5,6%, к 20 сут - на 11,4 и 9,6%, к 30 сут - на 20,2% ($p < 0,01$) и 16,8% ($p < 0,05$), соответственно. У животных третьей и четвертой групп наблюдались лишь незначительные изменения данного показателя.

Таблица 2 - Показатели неспецифической резистентности овец в динамике интоксикации на фоне применения препарата «Микосубтил»

Группа животных	Фагоцитарная активность нейтрофилов, %	Фагоцитарное число	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарная емкость
10 сут				
1	41,5±2,35	2,80±0,12	6,73±0,38	17,8±1,23
2	41,5±2,06	2,83±0,16	6,82±0,50	18,5±1,40
3	42,5±2,56	2,86±0,13	6,73±0,19	18,5±1,22
4	43,0±2,71	2,89±0,18	6,71±0,29	19,7±1,39
Контроль	44,0±3,08	2,91±0,17	6,62±0,46	19,7±1,47
20 сут				
1	38,5±2,35*	2,72±0,16	7,06±0,34	14,9±1,17**
2	39,5±2,64	2,79±0,21	7,05±0,39	17,1±0,98*
3	42,0±1,71	2,80±0,25	6,67±0,23	17,2±1,14
4	42,5±2,35	2,85±0,16	6,71±0,21	18,6±1,49
Контроль	43,5±1,77	2,93±0,23	6,76±0,47	19,9±1,12
30 сут				
1	35,5±2,11**	2,61±0,17*	7,36±0,16*	13,9±1,39**
2	37,0±1,71*	2,71±0,23	7,31±0,14*	16,0±1,18*
3	42,5±1,77	2,87±0,15	6,78±0,35	16,6±0,95*
4	43,0±2,41	2,87±0,28	6,68±0,26	17,6±1,42
Контроль	44,5±2,06	2,91±0,20	6,54±0,23	19,4±1,15

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Фагоцитарное число к 10, 20 и 30 сут снизилось у овец первой группы на 3,7; 7,1 и 10,0% ($p < 0,05$), второй группы - на 2,7; 4,7 и 6,8%, третьей группы - на 1,7; 4,4 и 1,3%, и четвертой - на 0,6; 2,7 и 1,3% соответственно.

Увеличение значения фагоцитарного индекса наблюдалось во всех группах подопытных животных: в первой группе к 10, 20 и 30 сут - на 1,6; 4,4 и 12,5% ($p < 0,05$), во второй группе - на 3,0; 4,2 и 11,7% ($p < 0,05$) соответственно. У животных в третьей и четвертой группах фагоцитарный индекс в течение всего эксперимента оставался на уровне контроля.

Фагоцитарная емкость у подопытных животных относительно контроля, снижалась на 10, 20 и 30 сут исследования: первой группе на 9,6; 25,1 и 28,0% ($p < 0,01$), во второй группе - на 6,1; 14,0 и 17,5% ($p < 0,05$), в третьей группе - на 6,0; 13,5 и 14,4% ($p < 0,05$) соответственно. У животных четвертой

группы величина фагоцитарной емкости на 10 сут осталась на уровне контроля, на 20 и 30 сут снизилась - на 6,5 и 9,2% соответственно.

3.7.4 Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса овец на фоне применения препарата «Микосубтил»

Убой животных проводили на 30 сут исследования, методом обескровливания, отбирали пробы для проведения ветеринарно – санитарной экспертизы с учетом комплекса регламентируемых показателей.

Установлено, что мясо овец, подвергшихся воздействию Т-2 и афлатоксина В₁, сразу после убоя и мясо, полученное от животных контрольной группы, по органолептическим, бактериологическим и физико-химическим показателям соответствует требованиям ГОСТов для доброкачественного мяса. Однако, мясо животных, получавших с кормом только Т-2 и афлатоксин В₁, на 10 сут хранения относили к категории сомнительной свежести.

3.8 Профилактическая эффективность препарата «Микосубтил» в производственных условиях

Для подтверждения защитного действия препарата при микотоксикозах животных провели исследование его профилактической эффективности на свиньях в условиях животноводческого хозяйства ООО «Новая жизнь» Кукморского района РТ.

Выбор хозяйства был обусловлен проведенным нами ранее микотоксикологическими исследованиями кормов, выявивших их загрязненность микотоксинами и токсигенными микроскопическими грибами родов *Fusarium* и *Aspergillus*. В кормах одновременно обнаруживались микотоксины в концентрациях: Т-2 - от 290 до 330 мкг/кг, афлатоксин В₁ – от 60 до 80 мкг/кг. Как известно, при совместном действии Т-2 и афлатоксина В₁ они обладают синергетическим действием на организм.

Было сформированы 3 группы поросят крупной белой породы 2-3 месячного возраста по 10 в каждой. Животные первой группы служили контролем и получали обычный рацион, второй группы - получали основной рацион, обработанный препаратом «Микосубтил» в сухом виде, третьей

группы получала основной рацион, обработанный препаратом «Микосубтил» и его влажном виде из расчета 10,0 мл/кг корма. Продолжительность эксперимента составила 30 суток.

Установлено, что обработка корма препаратом оказало положительное влияние на динамику роста живой массы животных опытных групп. Так, к 30 сут исследования среднесуточные приросты массы в опытной группе были выше на - 16,4% относительно контроля.

Уровень потребления комбикорма с препаратом практически не отличался от соответствующих значений контрольной группы, что свидетельствует о хорошей поедаемости рациона с добавлением препарата «Микосубтил».

Таким образом, в результате исследований установлено благоприятное влияние препарата «Микосубтил» на клинико-гематологические и биохимические показатели поросят.

Полученные данные являются подтверждением целесообразности использования препаратов на основе живых микроорганизмов в качестве средств обезвреживания кормов от микотоксинов для профилактики микотоксикозов животных, протекающих в субхронической и хронической форме, преобладающих в естественных условиях.

3.9 Контроль за качеством препарата «Микосубтил»

В процессе производства препарата нами проводился контроль его качества соответствующий нормам предъявляемым к лекарственным препаратам. Результаты анализа 4 серий препарата представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Результаты анализа препарата на основе *B.subtilis-2006*

Наименование показателя	Нормы	Номер серии			
		1	2	3	4
1	2	3	4	5	6
Внешний вид, цвет	прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Наличие посторонних примесей	не допускается	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует

1	2	3	4	5	6
КОЕ в 1мл препарата, млрд., не менее	2,0	14,0±0,4	25,0±0,6	35,0±0,4	17,0±0,2
Бактерийная чистота	контаминация посторонней микрофлоры не более 300 тыс бактерий в 1 г	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
Безвредность	безвреден	безвреден	безвреден	безвреден	безвреден

Из таблицы следует, что все серии препарата «Микосубтил» взятых для контроля качества соответствуют разработанным требованиям и нормам технических условий.

4 ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга из 5 изолятов рода *Bacillus* для обезвреживания кормов, загрязненных Т-2 токсином и афлатоксином В₁, отобран изолят *B. subtilis* - 2006, обладающий выраженными антагонистическими свойствами к грибам рода *Aspergillus flavus* и *Fusarium sporotrichiella* - продуцентам афлатоксина В₁ и Т-2 токсина.

2. Изолят *B. subtilis* - 2006 обладает сахаролитической, протеолитической, уреазной и каталазной активностью, не патогенен для животных.

3. На основе изолята *B. subtilis* - 2006 создан препарат «Микосубтил», который является малотоксичным для лабораторных (белые мыши, белые крысы) и сельскохозяйственных (свиньи) животных. Среднесмертельная доза «Микосубтила» из-за низкой токсичности для животных не установлена, что согласно ГОСТу 12.1.007-76 «Вредные вещества» позволяет отнести его к 4-му классу опасности – вещества малоопасные.

4. Внутрижелудочное введение «Микосубтила» белым крысам и подсвинкам не оказывает отрицательного влияния на общее состояние и клинический статус животных, препарат не обладает эмбриотоксическим и

тератогенным действиями, способствует повышению среднесуточного прироста массы тела животных на 30 сут до $163,0 \pm 2,34$ г.

5. Включение в рацион лабораторных (белые крысы) и сельскохозяйственных (овцы, свиньи) животных препарата «Микосубтил» (в оптимальной дозе 10,0 мл/кг корма при содержании в 1 мл не менее 2 млрд. м.к.) в течение 30 сут, при одновременном введении Т-2 и афлатоксина В₁, способствует стабилизации гематологических, биохимических показателей и факторов неспецифической резистентности организма животных. В группах животных, получавших только микотоксины, регистрировалось снижение данных показателей.

6. Введение в рацион Т-2 и афлатоксина В₁ на фоне применения препарата «Микосубтил» сопровождается менее выраженными гистологическими изменениями в органах и тканях организма, чем у контрольных животных, затравленных микотоксинами.

7. Мясо овец, опытных и контрольной групп исследованное сразу после убоя животных по органолептическим, бактериологическим и физико-химическим показателям соответствует требованиям ГОСТов для доброкачественного мяса. На 10 сут хранения мясо, полученное от овец, употреблявших корм, загрязненный Т-2 токсином и афлатоксином В₁, в отличие от других групп животных, относится к категории «сомнительной» свежести.

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. В качестве средства профилактики животных, от воздействия Т-2 токсина и афлатоксина на организм рекомендуется применять для обезвреживания кормов от микотоксинов препарат «Микосубтил» из расчета 10,0 мл/кг корма.

2. Основные положения диссертационной работы рекомендуется использовать на курсах по повышению квалификации в ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» и

учебном процессе в ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана».

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Иванов, Е.Н.** Биологические методы обезвреживания кормов от микотоксинов / **Е.Н. Иванов** // Матер. науч.-практ. конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные проблемы ветеринарии». – Казань, 2007. – С. 44-46;
2. **Иванов, Е.Н.** Обезвреживающая способность *Bacillus subtilis* -2000 в отношении афлатоксина В₁ / **Е.Н. Иванов, М.Я. Трemasов, Л.Е. Матросова** // Вестник Российской военно-медицинской академии. Медико-биологические проблемы токсикологии и радиологии. – С.-Петербург, 2008. - №3(23). - С. 194-195;
3. **Иванов, Е.Н.** Изучения антагонистических свойств штаммов на основе *Bacillus subtilis* в отношении плесневых грибов / **Е.Н. Иванов** // Матер. науч.-практ. конф.: Современные проблемы диагностики, лечения и профилактики инфекционных болезней животных и птиц. - Екатеринбург, 2008. - С. 192-194;
4. **Иванов, Е.Н.** Показатели неспецифической резистентности организма крыс при воздействии микотоксинов и профилактическом применении *Bacillus subtilis* / **Е.Н. Иванов** // Матер. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов «Достижения молодых ученых – в производство, посвященная 100-летию со дня рождения профессора Х.Х. Абдуллина». - Казань, 2008. – С. 45-49;
5. **Иванов, Е.Н.** Сравнительное изучение биологических свойств микроорганизмов, используемых для детоксикации кормов от афлатоксина В₁ / **Е.Н. Иванов** // Всерос. науч.-практ. конф. «Научный потенциал – аграрному производству, посвящ. 450-летию вхождения Удмуртии в состав России 2008». – Ижевск, 2008. -Т.3. - С. 124-128;
6. **Иванов, Е.Н.** Гематологические показатели крыс при воздействии Т-2 токсина и афлатоксина на фоне применения *B.subtilis* / **Е.Н. Иванов** //

«Актуальные вопросы аграрной науки и образования, посвященной 65-летию Ульяновской ГСХА 2008». - Ульяновск, 2008. - С. 50-52;

7. **Иванов, Е.Н.** Использование микроорганизмов для детоксикации афлатоксина В₁ / **Е.Н. Иванов**, Л.Е. Матросова, А.В. Иванов // Современная микология в России. – Т.2. – М., 2008. – С. 225-226;

8. **Иванов, Е.Н.** Гематологические показатели крови и факторы неспецифической резистентности организма овец при воздействии микотоксинов и профилактическом применении препарата на основе *Bacillus subtilis* / **Е.Н. Иванов**, М.Я. Тремасов // Ветеринарный врач – 2009. - №1 – С.8-11;

9. **Иванов, Е.Н.** Биологическая оценка мяса овец, подвергшихся воздействию Т-2 и афлатоксина на фоне применения препарата на основе *Bacillus subtilis* / **Е.Н. Иванов**, Л.Е. Матросова, М.Я. Тремасов // Междунар. науч.-практ. конф. «Современные средства и методы диагностики, профилактики и лечения инфекционных, протозойных и микотических болезней сельскохозяйственных и промысловых животных, рыб и пчел, посвященной 100-летию со дня рождения академика ВАСХНИЛ А. Х. Саркисова». – М.; 2009. – С. 291-293;

10. **Иванов, Е.Н.** Препарат на основе *Bacillus subtilis* для профилактики Т-2 и афлатоксикоза животных / **Е.Н. Иванов**, М.Я. Тремасов, А.В. Иванов и др., // Труды междисциплинарного микологического форума. М., 2009. - С. 15-16;

11. **Иванов, Е.Н.** Биологический метод обезвреживания кормов от микотоксинов / А.А. Иванов, **Е.Н. Иванов** // Матер. второго съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов России: Современные проблемы ветеринарной фармакологии и токсикологии. – Казань, 2009. - С. 420-423;

*Отпечатано в ООО «Печатный двор».
г. Казань, ул. Журналистов, 1/16, оф.207
Тел: 272-74-59, 541-76-41, 541-76-51.
Лицензия ИД №7-0215 от 01.11.2001 г.
Выдана Поволжским межрегиональным
территориальным управлением МПТР РФ.
Подписано в печать 05.08.2009г. Усл. п.л 1,4
Заказ № К-6726. Тираж 100 экз. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Печать - ризография.*