

На правах рукописи



Дятлов Никита Викторович

РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ДЛЯ
ОБРАБОТКИ СОСКОВ ВЫМЕНИ У КОРОВ

06.02.03 Ветеринарная фармакология с токсикологией

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук

Краснодар - 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина»

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, доцент
Коба Игорь Сергеевич

Официальные оппоненты: **Алиев Аюб Юсупович,**
доктор ветеринарных наук,
директор Прикаспийского зонального научно-исследовательского ветеринарного института

Баркова Анна Сергеевна,
доктор ветеринарных наук, профессор
заместитель декана по научной работе
факультета ветеринарной медицины и
экспертизы ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

Защита диссертации состоится «02» декабря 2021 г., в 10 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 220.038.07 на базе ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина» по адресу: 350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13, корпус факультета ветеринарной медицины.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке университета и на сайтах: ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина» – <http://www.kubsau.ru> и ВАК – <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета



Д.П. Винокурова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Экономически-финансовый вопрос абсолютно во всех хозяйствах с активным молочным животноводством представляют собой заболевания вымени у крупного рогатого скота. Заболевания вымени весьма распространены и наносят животноводству крупные потери.

Они вызывают грандиозные убытки в хозяйствах из-за понижения молочной продуктивности, у животных сокращаются сроки хозяйственного использования, а также изменяются в худшую сторону свойства молока. (Л.Д. Демидова, 1997; Л.К. Попов с соавт., 2012; А. Дойтц, 2010).

Еще одна трудность, относящаяся к маститу, – это присутствие в молоке ветеринарных лекарственных средств – антибиотиков, гормональных веществ и др., а также микотоксинов; пестицидов и гербицидов; моющих и дезинфицирующих средств. Их наличие в молоке приводит к формированию у людей аллергии, шоковых реакций, отравлений, а в молочной индустрии – к нарушению производственных процессов при изготовлении молочной продукции.

Исходя из вышеизложенных фактов, отечественные учёные ведут напряжённую работу по созданию новых, высокоэффективных средств для борьбы с маститами (Л.Д. Демидова, 1997; А.А.Архипов, 2008; Е.А. Сидоркин, 2009 и др.). Эти средства должны быть доступны к использованию на животноводческих фермах, комплексах и в малых частных хозяйствах.

Резюмируя вышесказанное, мы констатируем тот факт, что разработка современных и более эффективных антимаститных средств, которые будут значительно отличаться по ценовой политике в сторону удешевления от импортных аналогов, является в Российской Федерации актуальной задачей.

Степень разработанности темы. Теоретической базой для научного исследования послужили публикации Забелина Ю.А. (1982), Бовкун Г.Ф., (1998), Крюкова Н.И. (1999), Кузьмич Р.Г. (2002), Багманова, М.А. (2003), Данилевской Н.В, Коробова А.В. (2005), Мисайлова В.Д., Нежданова А.Г., Парикова В.А.(2005), Баймишева, Д.Ш. (2007), Грязнева, Т.Н. (2008), Батракова А. (2010), Барковой А. С., Колчиной А. (2012), Климова Н.Т., Першина С.С. (2012), Коренника И. В. (2012) и других авторов.

Следует отметить, что, несмотря на большое количество исследований в области создания различных средств, предназначенных для лечения и профилактики мастита у коров, исследователями в основном делается упор на разработку антибиотикосодержащих средств для лечения маститов и мало внимания обращается на профилактику, а в частности на обработки сосков вымени после доения. На сегодняшний день имеется недостаточно средств для профилактики мастита, особенно таких, которые в качестве действующего вещества несут пробиотические культуры штаммов *Bacillus subtilis* и *Enterococcus faecium*. На ветеринарном фармацевтическом рынке имеется небольшой арсенал подобных средств, который в основном представлен импортными производителями.

Цель и задачи исследований. Цель настоящих исследований состояла в разработке нового пробиотического эффективного средства для профилактики мастита у коров путем обработки вымени после доения. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить степень распространения мастита у коров в хозяйствах Краснодарского края.
2. Разработать новое средство для обработки сосков вымени коров после доения на основе штаммов-пробионтов.
3. Определить антибактериальную активность средства.
4. Провести доклинические исследования средства.
5. Провести клинические испытания средства на поголовье крупного рогатого скота в хозяйствах Краснодарского края.

Научная новизна работы. Основываясь на методологических принципах фармакологии, токсикологии, микробиологии, а также на результатах проведённых клинических испытаний и широкого производственного испытания, нам впервые удалось научно обосновать технологию создания комбинированного средства на основе пробиотических культур штаммов *Bacillus subtilis* – В-5225 и *Enterococcus faecium* СТФ 1/56, предназначенного для профилактики мастита у коров.

Нами предложены и обоснованы методы контроля качества средства. В процессе доклинических и клинических испытаний изучена антимикробная активность, определена оптимальная доза и схема применения, доказана безопасность, высокая профилактическая эффективность нового средства,

предназначенного для профилактики субклинического мастита у коров в сравнительном аспекте с другими аналогичными по действию средствами.

Научная новизна работы подтверждена патентом № 2560277 на «Средство для профилактики мастита у коров в период лактации».

Теоретическая и практическая значимость работы. В ходе проведённых исследований удалось установить степень и сезонность распространения мастита на молочно-товарных фермах Краснодарского края, расположенных в разных климатических зонах этого региона. Исследованы различные способы профилактики мастита.

Предложено новое средство – «Биомастим», которое рекомендуется для применения в качестве профилактики мастита у коров.

На основании проведенных научно-исследовательских тестов сличительных испытаний нами предложена производству схема профилактики мастита у коров.

Полученные в работе результаты исследований могут использоваться:

- ветеринарными специалистами личных подсобных хозяйств, крестьянско-фермерских хозяйств, а также другими хозяйствами различных организационно-правовых форм собственности.

- в научно-исследовательской работе в прикладных и фундаментальных отраслях биологии, в ветеринарных научных и научно-образовательных организациях, при написании учебников, учебных пособий, методических рекомендаций и монографий.

Методы и методология исследования. Технология изучения базируется в едином целом исследовании предметов изучения, точной обработке, рассмотрении и синтезировании установленных результатов. При изучении опытных, а также клинических сведений, были применены способы точной статистики с использованием прогрессивных технических средств посредством персонального компьютера IBM с операционной системой «Windows» с помощью пакета программ «Вариативной статистики».

В ходе исследования нами проводились экспериментальные опыты на лабораторных животных (белые мыши, крысы, кролики), находящихся в виварии факультета ветеринарной медицины

ФГБОУ ВО Кубанского ГАУ имени И.Т. Трубилина, и сельскохозяйственных животных (коровы) хозяйств Краснодарского края.

В проведённых исследованиях мы пользовались методами, принятыми в фармакологии, токсикологии, ветеринарном акушерстве, микробиологии, гематологии, биохимии, патологической анатомии, а также методами, принятыми в статистике.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Разработка состава и технология создания нового комплексного средства после доения на основе пробиотических штаммов для профилактики мастита у коров. Методы контроля качества профилактического средства.

- Отсутствие токсического, раздражающего, аллергического действия средства.

- Показания и эффективность применения разработанного средства для профилактики мастита у коров в условиях производства.

Степень достоверности полученных результатов. Степень достоверности подтверждается повторяемостью, воспроизводимостью и статистической обработкой экспериментальных данных, полученных в результате опытов, а также результатами лабораторных и производственных исследований.

Математическая обработка полученных результатов исследований выполнена с помощью программ Windows 2010, MicrosoftOffice 2010, степень достоверности «Р» устанавливали по распределению Стьюдента.

Апробация работы. Главные утверждения, заключения, а также практические предложения, приведенные в диссертации, отвечают целям и задачам проделанного эксперимента. Лабораторные исследования проводились на современном сертифицированном оборудовании. Достоверность результатов исследований подтверждается их статистической обработкой.

Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на международных научно-практических конференциях:

1. 73-я научно-практическая конференция преподавателей по итогам научно-исследовательской работы за 2017 г, Краснодар, март 2018 г.

2. Национальная научно-практическая конференция, посвящённая 100-летию факультета ветеринарной медицины пищевых и био-

технологий «Саратовский форум ветеринарной медицины и продовольственной безопасности РФ», ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова Саратов, 13-14 сентября, 2018.

3 III-я национальная конференция «Научно-технологическое обеспечение агропромышленного комплекса России: проблемы и решения» Краснодар, 27–28 марта 2019 года.

4. Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы и достижения зооветеринарной науки», г. Казань, «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана» 30-31 мая, 2019. Доклад: «Клинические испытания средства «Бимоастим».

5. Премия «IQ года» 27 марта – 6 апреля 2018. Доклад: «Разработка средства для обработки сосков вымени после доения на основе *B. subtilis* и *E. faecium*»

По материалам диссертации опубликовано 8 научных статей, из них 3 в научных изданиях, рецензируемых ВАК.

Личное участие автора в получении научных результатов. Диссертация выполнена автором самостоятельно и является результатом многолетних научных исследований. Автором лично сформулирована проблема, определены цель и задачи исследований, пути их реализации, проведены постановка и выполнение эксперимента, обработка и интерпретация результатов.

В проведении ряда исследований принимали участие И.С. Коба, Е.Н. Новикова, М.Б. Решетка, А.В. Лунева и другие, которым автор выражает огромную благодарность за оказанную помощь и плодотворное сотрудничество.

Все авторы не имеют возражений при использовании в диссертации совместных данных, на что дано их письменное разрешение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 131 странице компьютерного исполнения. Состоит из введения, основной части, включающей обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, заключение, обсуждение результатов исследований, выводов и практических предложений, списка литературы, включающего 173 источника, в том числе 30 иностранных, приложений на 5 страницах. Работа иллюстрирована 21 таблицами и 11 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили с 2018-го по 2020-й год на кафедре терапии и фармакологии Кубанского ГАУ, а также в хозяйствах края: ООО АФ «им. Ильича» Выселковского района Краснодарского края, ООО «Смоленское» Северского района Краснодарского края, ФГУП «Кореновское» Кореновского района Краснодарского края.

Для проведения доклинических и лабораторных исследований нами использовались мыши – 50 шт., крысы – 30 шт., кролики – 6 шт. Опыты по проведению клинических исследований проводились на коровах голштинской породы в количестве 500 голов. Исследования по распространённости и сезонному распределению маститов крупного рогатого скота изучен на базе хозяйств ООО «Смоленское» Северского района Краснодарского края и ФГУП «Кореновское» Кореновского района Краснодарского края, находящихся в разных климатических зонах – предгорной и равнинной, в течение 2017-2019 года на 1030 головах дойного стада.

При изучении физико-химических свойств средства «Биомастим» определяли: цвет, запах, консистенцию, pH (Piccolo plus).

Определение бактериологической чистоты проводили в соответствии с ГОСТ 28085 «Средства биологические. Метод биологического контроля стерильности».

Для определения количества жизнеспособных микроорганизмов в течение срока хранения средства «Биомастим», были отобраны образцы средства в количестве 0,3 л. В течение срока хранения периодически брались пробы средства для анализа: на момент выпуска средства, через 1 месяц от даты изготовления и через 2 и 3 месяца от даты изготовления. Анализ проводили путем подсчета жизнеспособных микроорганизмов.

Противомикробную активность средства *in vitro* определяли по следующей методике: в чашки Петри наливали расплавленный и охлажденный до 45⁰С лактобакагар, затем добавляли небольшое количество бульонной культуры штамма-пробионта. Перемешивали содержимое чашки и оставляли до остывания агара. Сразу после остывания агара удаляли из чашки половину агаровой пластинки с выросшим на ней пробионтом. В свободную часть чашки заливали 10 мл СПА. После застывания среды на нее сплошным газоном засеивали тест-микроб.

Определение острой токсичности средства «Биомастим» проводили согласно Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ - Хабриев Р. У. (2005) и ГОСТ Р ИСО 10993-11-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследования общетоксического действия ГОСТ Р ИСО 10993.10-99 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 10.

Было сформировано 5 групп из белых мышей обоего пола, из них 4 опытных и 1 контрольная, по 10 голов в каждой. Масса тела животных составляла, в среднем, 25-30 г.

Средство вводили per os с помощью зонда в объеме 0,4; 0,6; 0,8; 1,7 мл. Контрольной группе вводили изотонический раствор натрия хлорида в дозе 1 мл/гол.

При определении параметров хронической токсичности средства «Биомастим» было сформировано 3 группы крыс-аналогов с массой тела 180-190 г (две опытные и одна контрольная) по 10 животных в каждой.

Исследуемый образец средства крысам первой группы задавали ежедневно в течение 28 суток с водой в дозе 600 мг/кг массы тела (1/10 от максимально-испытанной при изучении острой токсичности), во второй группе дозировка составила 300 мг/кг (1/20 от максимально испытанной). Третья группа служила биологическим контролем.

Биохимические исследование крови проводились на анализаторе «SINNOWA» с использованием реагентов ДИАБЕТ.

Определение общего анализа крови осуществляли на фотоэлектрическом анализаторе «Abacus».

Регистрацию и анализ поведенческих актов лабораторных животных проводили методом открытого поля. Автором метода является Hall C.S. (1934).

Исследования молока и смывов с сосков вымени для изучения его культурально-морфологических и биохимических свойств проводили общепринятыми методиками бактериологического исследования, по методике Н.Н. Михайлова, М.А. Лучко, З.С. Кононовой (1967).

Идентификацию выделенных микроорганизмов до вида проводили с использованием 23 биохимических тестов и «Определителя

бактерий Берджи» (М., 2001), «Определителя зоопатогенных микроорганизмов» (М.А.Сидоров с со авт., 1995. Для определения чувствительности выделенных культур к антибиотикам использовали метод диффузии в агар (МУК 4.2.1890-04).

Исследование раздражающего действия средства «Биомастим» на слизистые оболочки глаз проводили на 6-ти кроликах породы «Калифорнийский», согласно ГОСТ Р ИСО 10993.10-99.

Воздействие изучаемого вещества на слизистые оболочки фиксировали через 5 минут, 30 минут, 1, 3, 6, 24, 48 часов и оценивали по степени гиперемии, отечности, инъекции сосудов склеры и роговицы, ширине зрачка, состоянию век.

Кожно-резорбтивное действие «Биомастима» изучали на 5 кроликах в течение 21 суток. За сутки до начала эксперимента проводили депиляцию по обеим сторонам спины на участках площадью примерно 10 × 15 см. Опытным средством 0,5 мл смачивали марлю, которую наносили на кожу с каждой стороны и фиксировали повязкой.

Регистрацию состояния кожи в месте аппликации проводили через 1 ч после удаления образца и непосредственно перед следующей аппликацией - разница во времени между нанесением образца была 12 часов.

После последней аппликации регистрировали состояние каждого участка через 1, 24, 48 и 72 ч после снятия образцов.

При изучении ранозаживляющего действия средства «Биомастим» показатели заживления ран определяли методом вульнографии с использованием компьютерного наложения измерительной сетки, для масштабирования использовали линейку.

Для диагностики коров на скрытый мастит использовали подсчёт соматических клеток на анализаторе молока вискозиметрическом «Соматос Мини».

Проводили экспресс-диагностику скрытого мастита с использованием средства Масттест на пластинке типа МКП-1.

Общую микробную обсеменённость кожи сосков вымени и секрета молочной железы до и после применения средства «Биомастим» изучали на 12 клинически здоровых коровах. Животные были распределены на 2 группы по 6 коров. Доеание коров проводилось в коровнике с линейной дойкой. Животным опытной группы на соски вымени сразу после доения наносили средство «Биомастим» при

помощи распыскивателя типа «Росинка». Животным контрольной группы соски вымени обрабатывали средством после доения «HD UdderStabilizer» методом погружения соска в пластиковый стаканчик со средством.

Перед дойкой 1 раз в неделю в течение 5 недель у коров опытной и контрольной группы брали смывы с поверхности кожи соска вымени, до обмывания вымени и после него, при помощи тупфера, для подсчета общей микробной обсемененности. Пробы секрета из всех долей вымени брали в стерильный контейнер для сбора биологических жидкостей.

Для проведения испытаний делали ряд последовательных десятикратных разведений пробы (смыва).

3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Распространение и сезонность возникновения маститов в хозяйствах Краснодарского края

При анализе заболеваемости коров маститом в Выселковском районе Краснодарского края за 2017 – 2019 год было выявлено 19778 случая заболевания коров маститом из 507141 обследованных коров, что составляет 3,9%. Однако следует отметить, что в 12063 случаях заболевание является повторным, что составляет 61% от животных с установленным диагнозом.

В Тихорецком районе Краснодарского края за эти же годы из 4740 голов дойного стада заболело маститом 237 коров, из которых 137 случаев являются рецидивами (58%).

В Кореновском районе из 11400 коров мастит выявлен у 684, таким образом, заболеваемость коров маститом в данном районе составила 6 %. При этом повторные случаи заболевания регистрировались в 478 случаях (70 %).

Проведенный анализ заболеваемости коров маститом в зависимости от времени года (помесечно), на базе хозяйства ФГУП «Кореновское» Кореновского района равнинной зоны и ООО «Смоленское» предгорно-климатической зоны Краснодарского края.

В результате в 2017-2019 годах пик заболеваемости клиническим маститом в этих хозяйствах приходился на осенне-зимние месяцы, а именно на период с сентября по январь (рисунок 1). Следует отметить, что средние показатели заболеваемости маститом по стаду в

хозяйстве Северского района значительно выше и составляют примерно 10,6 %. Коровы содержатся в корпусах, содержание беспривязное, моцион отсутствует. В хозяйстве отмечено резкое колебание заболеваемости маститом, что может быть также связано с неудовлетворительными санитарными условиями и нарушением правил доения. Помимо этого, в хозяйстве отмечаются резкие перепады температуры в течение холодного времени года в разное время суток: от плюсовых до минусовых. В июне-июле отмечается заболеваемость маститом, что можно объяснить чрезмерным потреблением животными воды, большим расплодом мух и недостаточной обработкой вымени до и после доения. В хозяйствах центральной части края содержание коров привязное, коровы выпасаются в базах. В данном хозяйстве высокая заболеваемость маститом отмечена в апреле и сентябре, что можно связать с установлением большой разности ночных и дневных температур в сочетании с высокой влажностью воздуха.

В целом, заболеваемость маститом в хозяйстве ФГУП «Кореновское» существенно ниже, чем в ООО «Смоленское». Так средняя заболеваемость по стаду составила 2,2 %, отмечена меньшая амплитуда колебаний заболеваемости коров в разное время года, максимальный процент заболеваемости составил 3,54%, а минимальный – 1,25%.

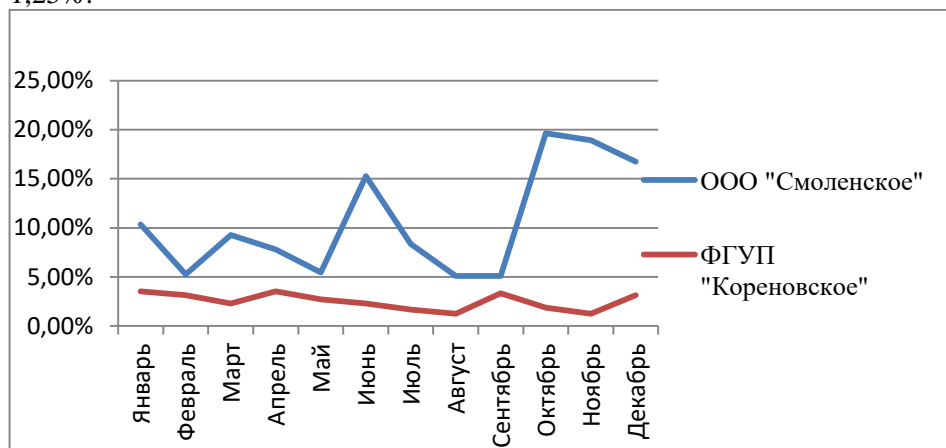


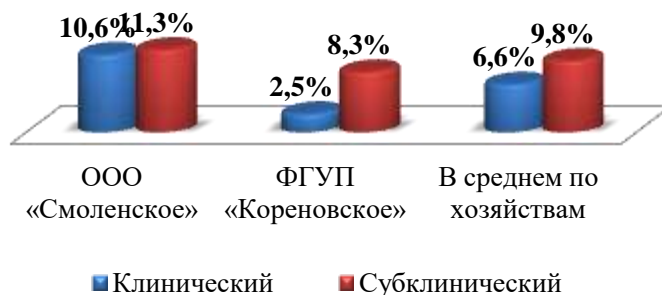
Рисунок 1 – Распределение клинических маститов по месяцам года в хозяйствах ООО «Смоленское» и ФГУП «Кореновское».

Из 844 случаев клинического мастита, диагностированных в хозяйствах в течение 2018 года, имело место следующее распределение клинических форм заболевания: 314 случаев (37,20%) приходилось на серозный мастит, в 419 (49,64%) случаях диагностировали катарально-гнойный мастит и в 111 случаях (13,15%) был диагностирован геморрагический мастит.

В зависимости от физиологического состояния животных, наиболее часто маститы диагностировали в период лактации (652 случая или 77,25%), реже – в период запуска (147 случаев или 17,42%) и наиболее редко в период сухостоя (45 случаев или 5,33%).

Исследования животных на скрытый мастит показали, что распространение субклинических форм мастита не имело выраженной вариабельности в течение года и в целом колебалось в диапазоне от 7,50 до 12,55 процентов от дойного стада, при этом в хозяйстве ООО «Смоленское» также отмечалась более высокая заболеваемость коров скрытым маститом. Соотношение клинических и субклинических форм маститов в данных хозяйствах отражено на рисунке 2.

Рисунок 2 – Сопоставление клинических и субклинических форм маститов в хозяйствах ООО «Смоленское» и ФГУП «Кореновское».



Как известно, в этиопатогенезе мастита основную роль играет условно-патогенная микрофлора, которая всегда присутствует на коже сосков вымени. Причем данная микрофлора способна вызвать заболевание маститом, проникая в сосковый канал во время доения.

Нами было проведено исследование по определению динамики бактериального загрязнения резины доильных стаканов в зависимости от количества выдоенных коров.

Анализ полученных результатов указывает, что бактериальное загрязнение сосковой резины доильных стаканов перед доением было в пределах 2,1-2,3 тыс. КОЕ/см². После проведения машинного доения пяти и десяти голов коров, бактериальное загрязнение резины доильных стаканов у животных первой лактации увеличилось в 249,2 и 626,4, у животных второй лактации в 259,7 и 626,4 раз соответственно. Данные исследования указывают на возможность перезаражения коров и передачи условно-патогенной микрофлоры от животного к животному при проведении машинного доения. Поэтому использование средств как после доения, так и моющих средств перед доением должно быть обязательным технологическим процессом в процессе машинного доения.

3.2 Состав и технология получения средства «Биомастим»

«Биомастим» является суспензией темно-зелёного цвета с кисловатым запахом.

Компонентный состав средства «Биомастим» имеет следующий вид: вода 65,9%, глицерин 20%, краситель хлорофиллин жидкий Е-141 10%, кукурузный экстракт 2,2%, меласса свекловичная 1%, сыворотка молочная 0,6%, пробиотические штаммы *Bacillus subtilis* В-5225 и *Enterococcus faecium* СТФ 1/56 0,3%.

Для получения разрабатываемого средства культуры *Enterococcus faecium* СТФ 1/56 и *Bacillus subtilis* В-5225, а также глицерин совмещают в соотношении 4:4:2. К одной части полученной смеси добавляют 9% частей стерильной дистиллированной Н₂О, смешанной в отношении 1:10 с медным комплексом Хлорофиллина Е-141 (краситель).

Кислотность по Тернеру разрабатываемого нами средства «Биомастим» колеблется в течение срока хранения. В первые 10 дней после выработки средства его кислотность составляет 101⁰Т, на 20-й день отмечается повышение кислотности средства до 121,2⁰Т. Причем тенденция роста кислотности отмечается вплоть до окончания срока годности средства (30 суток) и достигает 133⁰Т.

Следует отметить, что при увеличении кислотности разрабатываемого средства пропорционально происходит снижение КОЕ микробных клеток в средстве.

Разрабатываемое нами средство «Биомастим» обладает свойством сохранять количество жизнеспособных клеток при хранении до 1 месяца, сохраняя достаточно устойчивые титры микробных клеток

3.3 Определение антимикробной активности средства «Биомастим»

Мы отмечаем, что зона задержки роста между штаммами *Bacillus subtilis* и *Enterococcus faecium*, входящими в разрабатываемое средство «Биомастим», и тест-культурами, округленно составляла 8,6 мм. Следует отметить, что максимальная ЗЗР регистрировалась между культурами-пробионтами и *Kl. Pneumonia spp. Ozaenae*; *St. xylosus* – 11,6 мм. Наивысшая зона отсутствия роста между культурами-пробионтами и *S. freundii* составила 8 мм, культурами-пробионтами и *E. agglomerans* – 7,3 мм.

Минимальная зона отсутствия роста тестируемых культур микроорганизмов при перпендикулярном посеве штрихом зарегистрирована между *Kl. Pneumonia spp.* и средством «Биомастим» - 11,8 мм, относительно *St. epidermidis* и средства «Биомастим» – 12,6 мм, между средством «Биомастим» и *E. coli*, а также *St. Aureus* ЗЗР составила 8,4 мм.

В следующем опыте мы провели определение антагонистического действия средства «Биомастим» через 7, 14, 21 день от даты производства средства.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что зона задержки роста по отношению к тест-культурам, используемым в предыдущем опыте, отличались в незначительных показателях на разных сроках хранения средства. Так, зона задержки роста *E.coli* на 7, 14 и 21 день хранения средства составляла 8,3, 7,0, 8,0 мм соответственно. По отношению к *S. aureus* – 7,9, 7,9 и 7,6 мм. К *K. pneumoniae* – в среднем 11,2 мм, что свидетельствует о том, что средство «Биомастим» сохраняет свое антимикробное действие на протяжении всего срока хранения.

3.4 Определение острой и хронической токсичности средства «Биомастим»

О токсическом действии средства судили по клиническому состоянию лабораторных животных; специфике их поведения; энергичности и характеру проявляемой активности; реакции на тактиль-

ные, шумовые и оптические раздражители; состоянию шерстного и кожного покрова; окраске слизистых оболочек; потреблению корма и воды.

В результате проведенных исследований установлено, что применение средства «Биомастим» не вызывает клинических признаков интоксикации, а также дальнейшей гибели лабораторных животных. После применения средства клиническое состояние мышей оставалось удовлетворительным. Лабораторные животные в опытных группах вполне соответствующе реагировали на факторы внешней среды, аппетит не нарушался. Слизистые оболочки ротовой полости, конъюнктивы были розового цвета. Мыши обладали гладким, блестящим шерстным покровом, шерсть не слипалась и не взъерошивалась. Тургор кожи соответствовал физиологической норме. Ректальная температура тела была в пределах референсных интервалов, акт дефекации безболезнен.

Таким образом, при исследовании острой токсичности средства «Биомастим» установлено, что данное средство в соответствии с нормативами ГОСТ 12.1.007-76, относится к 4-му классу опасности – вещества малоопасные.

При изучении хронической токсичности средства «Биомастим» на беспородных крысах гибели животных и изменения их локомоторной активности не установлено. Масса тела подопытных животных существенно не изменялась.

Анализ патоморфологических исследований дает возможность утверждать об отсутствии токсического воздействия тестируемого нами средства на органы и системы организма опытных крыс. Однако следует отметить цвет содержимого кишечника, который имел характерный для цвета средства зеленый цвет.

Проведённые морфо-биохимические исследования показателей крови при многократном применении средства «Биомастим» позволяют утверждать отсутствие различий между показателями у животных опытных и контрольной групп. Таким образом, длительное введение в рацион исследуемого образца средства «Биомастим» лабораторным животным не привело к развитию токсических явлений, и не позволило установить его негативное влияние на организм.

3.5 Изучение раздражающего и ранозаживляющего действия средства «Биомастим»

Исследование раздражающего действия средства «Биомастим» на слизистые оболочки проводили на 6-ти кроликах породы «Калифорнийский».

Проведенные тесты со средством «Биомастим» позволяют утверждать, что он не обладает раздражающим действием, так как нам не удалось обнаружить патологических изменений. Клиническое состояние животных находилось в физиологической норме. Температурный показатель тела, частота дыхания, пульса находились в пределах референсных интервалов. Сосуды конъюнктивы были не кровенаполнены, состояние роговицы и век были сопоставимы с их состоянием у контрольных животных.

Нами также было проведено определение раздражающего действия средства «Биомастим» на кожные покровы.

Опыты проводились на 5 кроликах обоего пола (2 самца 3 самки) весом не менее 2 кг.

В результате проведенных исследований нами не было установлено специфических кожных реакций у опытных кроликов в течение всего периода проведения опыта.

В связи с этим мы констатируем тот факт, что средство «Биомастим» не обладает раздражающим действием как при применении на слизистые оболочки, так и при длительном использовании концентрата при накожных аппликациях.

Ранозаживляющее действие средства определяли на кролике породы «Калифорнийский», нанеся животному искусственное ранение в области правого подвздоха.

На основании проведенных опытов нами было установлено, что скорость заживления в сутки экспериментально нанесенной раны кролику при использовании средства «Биомастим» составляет 24,37%. В качестве средства-аналога нами использовалась мазь «Биосептин». Отмечено более медленное заживление раневой поверхности, которое составило 21,42%. Таким образом, среднесуточная скорость заживления раневой поверхности у кролика при использовании опытного средства была выше на 2,94%. Следует отметить, что полное заживление обоих ранений произошло одновременно – на 14-е сутки после нанесения ран и заживление происходило по первичному натяжению.

Сохранность животных во время проведения опыта составила 100%.

3.6 Отработка метода нанесения средства на соски вымени коров

Нами было апробировано два метода применения относительно разрабатываемого нами средства: метод окунания соска в стакан и метод обработки соска спреем. Для этого нами было использовано 40 клинически здоровых коров по 20 животных в группе. Одним животным средство наносили методом окунания соска в стакан, а второй группе животных средство наносили на соски, используя распылитель «Росинка». Опыт проводился в течение 30 дней.

При анализе проведённого эксперимента, нами было отмечено, что при применении средства «Биомастим» методом окунания соска в стакан расход средства был значительно выше, чем в группе, где применяли «Биомастим» методом распыления на сосок. Этот факт мы связываем с тем, что средство, имея жидкое агрегатное состояние, довольно быстро стекает с соска, а образующаяся на сфинктере капелька высыхает примерно в течение 5 минут.

При применении средства методом распыления, достаточно двух нажатий на рычаг, чтобы средство полностью покрыло сосок. При этом нами отмечалось образование мелких капелек на соске, которые медленно стекали к основанию соска вымени, образуя долго висящую каплю на сфинктере соска, которая медленно высыхала - до 40-60 минут.

Если рассматривать эти два метода применения средства со стороны терапевтической эффективности, то эффективность их была одинакова. Как в первом, так и во втором случае было зарегистрировано по одному случаю заболевания скрытым маститом в обеих группах.

Таким образом, нами рекомендовано применение средства «Биомастим» методом распыления на сосок главным образом для достижения более экономичного расхода этого средства.

3.7 Бактериальная обсемененность сосков вымени и молока до и после применения средства «Биомастим»

Нами был проведен бактериальный анализ загрязнённости сосков вымени, а также и секрета молочных желез, как до, так и после применения «Биомастима».

В результате нами было отмечено, что в контрольной группе после обработки сосков вымени бактериальная обсемененность кожи снижается до $2,1 \pm 0,9 \times 10^6$ с $3,6 \pm 3,4 \times 10^{14}$ на 1 см^2 , при этом, в опытной группе после обработки бактериальная загрязненность была в 10 раз выше по сравнению с группой контроля и составляла $1,4 \pm 1,2 \times 10^7$, в то время как до обработки она составляла $1,6 \pm 1,4 \times 10^{15}$. Однако в начале опыта бактериальная загрязненность сосков кожи вымени находилась практически на одном уровне, как у опытных животных, так и у контрольных.

Но в течение обработки вымени средством «Биомастим» мы отмечали увеличение бактериальной обсемененности кожи у этих коров. Бактериологический анализ подтверждает присутствие на коже сосков животных опытной группы бактерий рода *Bacillus* и *Enterococcus*. Несмотря на увеличение общей обсемененности кожного покрова, у животных этой группы отмечалось снижение условно-патогенной микрофлоры.

3.8 Оценка переносимости завышенных доз средства «Биомастим» после доения целевыми видами животных (коровы)

Так как производителем средства «Биомастим» ООО «Биотехагро», в виду экономической целесообразности, средство выпускается в качестве концентрата, который перед применением разводится в десять раз, нами было принято решение провести исследование переносимости животными завышенных и заниженных доз средства и определить их профилактическую эффективность.

Апробация была проведена на клинически здоровых коровах в фазе лактации. Было сформировано 3 группы животных по 10 голов в каждой. Средство «Биомастим» в различных концентрациях наносили на соски вымени методом распыления в течение 60 дней.

По результатам исследований выявлено, что наиболее оптимальной концентрацией микроорганизмов штаммов-пробионтов в средстве считается концентрация $1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл, так как при обработке сосков средством с этой концентрацией клиническим маститом не заболело ни одно животное, а субклинический мастит был выявлен лишь у 1 коровы.

При обработке сосков средством с концентрацией $1,0 \times 10^5$ КОЕ/мл, клиническим маститом заболело 2 коровы, а субклиническим - 4. Следует отметить, что пораженных долей вымени было значительно больше, у трех животных отмечали поражение двух

долей вымени. При обработке средством, содержащим $1,0 \times 10^{10}$ КОЕ/мл штаммов-пробионтов, профилактическая эффективность сохранялась на уровне 90%.

Ежедневный клинический осмотр кожи сосков вымени у коров 3-й группы не выявил поражений кожи. У животных отмечали хороший аппетит, животные адекватно реагировали на визуальные и звуковые раздражители. Также не отмечали изменения у здоровых животных в количественных показателях удоя

3.9 Клинические испытания средства «Биомастим»

Исследование клинической эффективности средства «Биомастим» проводилось на базе хозяйства ООО АФ «им. Ильича» Выселковского района Краснодарского края.

Обработки проводили после доения, два раза в день на протяжении 45 дней с помощью пульверизатора. Животных опытной группы обрабатывали средством «Биомастим», животных контрольной группы – средством «HD Udder Stabilizer».

По результатам наблюдения за животными установлено, что к концу второй недели использования средства «Биомастим» количество коров, больных клиническим маститом, составило 6,3%, в то время как в контрольной группе оно составляло 8,3%. На 45 день опыта процент коров, больных маститом, в опытной и контрольной группе снизился до 4,2%.

При анализе заболеваемости коров скрытым маститом, прослеживается явная тенденция к снижению заболеваемости в опытной группе, к 14 дню использования средства «Биомастим» заболеваемость коров составила 10,4%, а в контрольной группе 12,5%. К 45 дню опыта коров, больных скрытым маститом, в опытной группе было на 2,1% меньше, чем в контрольной и составило 8,3% и 10,4% соответственно. Проведенные исследования состояния сосков вымени на наличие трещин показало, что на протяжении всего опыта у коров опытной группы данное заболевание уменьшалось и в среднем составило 18,03%, в то время как в группе, где применяли HD Udder Stabilizer, трещины сосков вымени встречались в 19,47% (таблица 1).

Таблица 1 - Сравнение профилактической эффективности средства «Биомастим» и средства-аналога «HD Udder Stabilizer»

Группы	День исследования	Клинический мастит		Скрытый мастит		Трещины сосков вымени	
		гол.	%	гол.	%	гол.	%
Опытная (n =48)	перед началом опыта	0	0	0	0	12	25
	14-й	3	6,3	5	10,4	10	20,8
	45-й	2	4,2	4	8,3	4	8,3
	Среднее значение	1,67	3,5	3,0	6,23	8,67	18,03
Контрольная (n = 48)	перед началом опыта	0	0	0	0	14	29,2
	14-й	4	8,3	6	12,5	9	18,8
	45-й	2	4,2	5	10,4	5	10,4
	Среднее значение	2,0	4,17	3,67	7,63	9,33	19,47

При подсчёте соматических клеток в молоке, в ходе апробации профилактической эффективности «Биомастима», было установлено, что на всем протяжении опыта этот показатель находился на физиологическом уровне, то есть за весь период исследований число соматических клеток в молоке животных опытной и контрольной групп находилось на уровне 230 – 300 клеток.

В результате было обнаружено, что в пробах, отобранных от животных опытной группы, присутствуют микроорганизмы рода *Enterococcus*, входящие в состав средства «Биомастим», что подтверждает их жизнеспособность. Стрептококков, стафилококков, синегнойной и патогенной кишечной палочки в пробах от животных обеих групп выделено не было, что свидетельствует о достаточной эффективности обоих средств.

Для подтверждения эффективности средства «Биомастим» было проведено производственное испытание: обработку вымени коров проводили раствором средства «Биомастим» два раза в день после доения на протяжении 90 дней в опытной группе, а в контрольной группе - средством-аналогом «HD Udder Stabilizer». Эффективность применения средства «Биомастим» оценивали на 30-й, 60-й и 90-й день производственного испытания по следующим показателям:

частота возникновения клинических форм мастита, частота возникновения субклинических форм мастита, частота образования трещин сосков вымени.

Было установлено, что профилактический эффект клинического мастита с использованием средства «Биомастим» составляет 94,6% за весь период опыта, как и эффект средства-аналога HD Udder Stabilizer. Однако профилактический эффект опытного средства относительно скрытого мастита составил 83,3% и был выше средства-аналога на 2,7%. Анализируя пораженность сосков трещинами у коров, мы отмечаем явную динамику снижения данного заболевания как в первой, так и во второй группе. Но стоит отметить, что в опытной группе к концу опыта больных данной патологией коров было на 4% меньше, чем в контрольной группе.

Таким образом, средство «Биомастим» обладает высокой профилактической эффективностью при использовании его в условиях современной молочно-товарной фермы.

В начале и в конце производственного испытания у всех животных были отобраны и исследованы на 5 основных показателей качества пробы молока (белок, жир, плотность, СОМО, количество соматических клеток) (таблица 2).

Таблица 2 — Показатели качества молока на начало и конец производственного испытания

Показатель	Начало опыта	Конец опыта
Массовая доля жира, %	4,2±0,178	4,3±0,122
Массовая доля белка, %	3,5±0,171	3,6±0,099
Плотность, кг/м ³	28,3±0,712	28,4±0,633
СОМО	8,1±0,107	8,2±0,108
Соматические клетки, тыс./см ³	286,1±2,583	211,6±4,70

Как видно из таблицы 2, применение средства «Биомастим» в условиях производственного испытания не привело к ухудшению товарных качеств молока.

Также нами был проведен широкий производственный опыт в Агрофирме «Россия» Тимашевского района Краснодарского края. В опыте было задействовано 104 животных голштино-фризской поро-

ды с молочной продуктивностью на момент проведения опыта 8387 кг молока.

Следует отметить, что на начало проведения опыта на ферме скрытый мастит регистрировался в среднем у 16,3% коров. Однако, с учётом поражённых долей вымени, этот показатель составил 35,2% или 24 поражённых доли на 17 коров, больных скрытым маститом.

Клинический мастит диагностировали у 2-х коров - 1,9%. Причем у одной коровы мастит регистрировали в сразу 2-х долях вымени.

Трещины сосков вымени нами отмечались у 34,4% коров – 36 животных.

Все животные были распределены на 2 группы по 52 коровы по принципу пар-аналогов. Первой группе животных применяли средство «Биомастим» по вышеописанной схеме, а второй группе средство «Дипал» согласно инструкции по применению.

По результатам наблюдения за животными установлено, что к концу первого месяца использования средства «Биомастим» количество коров, больных клиническим маститом, составило 5,7%, в то время как в контрольной группе он составлял 3,8%. На 60 день опыта процент коров, больных маститом, в первой группе снизился до 1,9%, а в контрольной поднялся до 5,7%. По итогам пятой недели, животных, больных клиническим маститом, в опытной группе не выявлено.

При анализе заболеваемости коров скрытым маститом, прослеживается явная тенденция снижения заболеваемости в опытной группе. На 30 день использования средства «Биомастим» заболеваемость коров составила 7,7%. Однако стоит отметить, что в совокупности поражено было только 6 долей вымени, а в контрольной группе – 13 долей вымени у 17,3% коров. На 60 день опыта коров, больных скрытым маститом, в опытной группе было на 2% меньше, чем в контрольной - 5,7% против 7,7% соответственно. В конце третьего месяца в опытной группе количество животных, больных скрытым маститом, составило 6 коров, а в контрольной - 8 коров.

Проведенные исследования состояния сосков вымени на наличие трещин показало, что на протяжении всего опыта у коров опытной группы данное заболевание уменьшалось и в среднем составило

19,2%, в то время как в группе, где применяли «Дипал», трещины сосков вымени встречались в 28,1%.

Полученные результаты показали, что через 1 месяц применения пробиотических средств отмечается значительное улучшение состояния сосков вымени, а также снижается заболеваемость маститом коров.

Таким образом, применение средства «Биомастим» показано для профилактики мастита у крупного рогатого скота.

4. Экономическое обоснование применения разработанной системы лечебно-профилактических мероприятий при маститах у коров

Исходя из себестоимости средства «Биомастим» в 60 рублей за 1 литр и определённой оптимальной концентрации раствора в 10%, а также оптимальной профилактической дозы в 4 мл на одно животное, затраты на одну головообработку средством «Биомастим» в ходе клинических испытаний составили 0,024 рубля, таким образом на двукратную обработку одной коровы в день затрачивалось 0,048 рублей, на всех животных в день — 14,4 рубля, на всех животных за весь период опыта затрачено 1296 рублей, что говорит о высокой экономической эффективности испытуемого средства.

Выводы

1. Мастит у коров в хозяйствах Краснодарского края регистрируется в среднем от 1,25% до 19,6%, в зависимости от сезона года. Субклинический мастит регистрируется у 7,5% - 12,5% коров, больных маститом.

2. «Биомастим» представляет собой суспензию тёмно-зелёного цвета с кисловатым запахом. В состав его входят пробиотические культуры штаммов *Bacillus subtilis* - В-5225 и *Enterococcus faecium* СТФ 1/56, а в качестве красителя - комплекс Хлорофиллина Е-141.

3. В результате проведенных исследований нами установлено, что зона задержки роста между штаммами *Bacillus subtilis* и *Enterococcus faecium* средства «Биомастим» и тест-микробами в среднем составила 8,6 мм.

4. «Биомастим» по степени воздействия на организм в соответствии с нормативами ГОСТ 12.1.007-76 относится к 4-му классу опасности — вещества малоопасные. Безвреден в терапевтической дозе для животных.

5. «Биомастим» не оказывает раздражающего воздействия на слизистые оболочки и обладает ранозаживляющим действием. Скорость заживления раны составляет 24,37%.

6. При применении «Биомастим» в течение 14 дней, количество коров, заболевших клиническим маститом, составило 6,3%, в то время как в контрольной группе оно составляло 8,3%. На 45 день опыта процент коров, больных маститом, в опытной и контрольной группе снизился до 4,2%. Анализ заболеваемости коров скрытым маститом указывает на тенденцию к снижению заболеваемости к 14 дню использования средства «Биомастим»: заболеваемость коров составила 10,4%, а в контрольной группе 12,5%. К 45 дню опыта коров, больных скрытым маститом, в опытной группе было на 2,1% меньше, чем в контрольной - 8,3% и 10,4% соответственно. Наличие трещин на сосках вымени у коров, которым применяли «Биомастим», составило 18,03%, в то время как в группе, где применяли «HD Udder Stabilizer», трещины сосков вымени встречались в 19,47%.

Предложения производству

– Для профилактики мастита проводить средством «Биомастим» обработку сосков вымени коров после каждого доения методом орошения;

– Сократить использование химиотерапевтических средств в схемах профилактики мастита;

– Научно-практические результаты рекомендуется использовать в учебном процессе студентов по специальности ветеринария, при проведении научно-исследовательских работ в НИИ и ВУЗах ветеринарного профиля, при написании монографий, учебников, учебных пособий.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИС- СЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Дятлов Н.В. Результаты микробиологических испытаний нового средства для обработки сосков вымени коров на основе штаммов-пробионтов "Биомастим" / Коба И. С., Новикова Е.Н., Бурменская Г.А., Скляр С.П., Дятлов Н.В. // Вестник АПК Ставрополя. 2018. № 1 (29). С. 39-42

2. Дятлов Н.В. Доклинические исследования средства "Биомастим"/ Лысенко А.А., Бурменская Г.А., Дятлов Н.В., Коба И.С. // Ветеринария Кубани 2018. № 6. С. 15-17.

3. Дятлов Н.В. Клинические испытания средства "Биомастим"/ Дятлов Н.В., Коба И.С. // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана 2019. С. 117-120.

Патенты РФ на изобретения:

4. Патент № 2560277 на «Средство для профилактики мастита у коров в период лактации».

Коллективная монография

5. Дятлов Н.В. Разработка и апробация пробиотического средства после доения "Биомастим" Коба И.С., Новикова Е.Н., Дятлов Н.В.// Инновационное развитие агропромышленного комплекса как фактор конкурентоспособности: проблемы, тенденции, перспективы. Коллективная монография. В 2 частях. Киров, 2020. С. 66-82

Публикации в сборниках конференций:

6. Дятлов Н.В. Распространение мастита у коров в двух климатических поясах Краснодарского края / Коба И.С., Новикова Е.Н., Бурменская Г.А., Дятлов Н.В. // В сборнике: Итоги научной-исследовательской работы за 2017 год . 2018. С. 159-160.

7. Дятлов Н.В. Испытания средства «Биомастим» / Коба И.С., Дятлов Н.В. // Сборник тезисов по материалам II Международной конференции Институциональные преобразования АПК России в условиях глобальных вызовов Краснодар 30-31 октября 2018г. С. 46

8. Дятлов Н.В. Итоги микробиологических проверок средства для обработки сосков вымени коров / Коба И.С., Дятлов Н.В. // Сборник тезисов по материалам II Международной конференции Научно-технологическое обеспечение агропромышленного комплекса России: Проблемы и решения Краснодар 16-17 октября 2018 г. С. 49

9. Дятлов Н.В. Клинические испытания препарата «Биомастим» / Коба И.С., Дятлов Н.В. //Сборник тезисов по материалам III Национальной конференции Краснодар - 2019. С. 54. Научно-технологическое обеспечение агропромышленного комплекса России: проблемы и решения

Дятлов Никита Викторович

**Разработка пробиотического средства для обработки
сосков вымени у коров**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Подписано в печать 2021.Уч.-изд. л. – 2,0.
Тираж 100. Заказ №
Типография Кубанского государственного аграрного университета.
350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13