

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО УСТАНОВЛЕНИЮ ПАРАМЕТРОВ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА «СУБТИЛБЕН»

Н. Р. Самторов

Таджикский аграрный университет имени Ш. Шотемура
(г. Душанбе, Республика Таджикистан)

*Для коррекции микрофлоры кишечника нами было разработано новый пробиотический препарат «Субтилбен» на основе различных штаммов *Bacillus subtilis*. Параметры клинической безвредности этого препарата было изучено на лабораторных животных. Двумя общепринятыми методами исследований установлено, что пробиотик «Субтилбен» является не токсичным и практически безвредным препаратом.*

В последние годы получили распространение новые подходы к лечению и профилактики животных, которые базируются на восстановлении естественной экологии организма, на основании использования активных биологических продуктов. Одним из аспектов такого подхода является нормализация измененного микробного пейзажа организма при помощи бактериальных и биологических препаратов. Наиболее значимую группу бактериальных препаратов составляют пробиотики – лекарственные средства, содержащие в качестве действующих веществ определенные штаммы представителей эндофитной микрофлоры. Известно, что бактерии данной группы, в норме заселяющие слизистые, оказывают антагонистическое действие в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры, а так же обеспечивают витаминообразующую и ферментативную функции [1-3].

На базе лаборатории «Микробиотехнологии» Таджикского аграрного университета имени Ш. Шотемур из различных штаммов *Bacillus subtilis* нами было изготовлено экспериментальную серию пробиотика «Субтилбен» в форме порошка.

Материалы и методы. Исследование названного препарата провели на базе лаборатории микробиотехнологии и вивария университета двумя способами. Первый, который используют для проверки продуктов микробиологического синтеза [4, 5], а второй – для установления острой токсичности лекарственных средств на лабораторных животных [6].

В процессе проведения исследований за первым методом, определение степени токсичности экспериментального пробиотика проводили с использованием сухой культуры инфузорий колподы согласно требований ГОСТ Р 52337-2005. Примененный метод базируется на экстрагировании с исследуемых продуктов различных фракций токсических веществ дистиллированной водой и в последствии воздействием полученных экстрактов на культуру инфузории *Colpoda steinii*. Оценку результатов данного биотеста проводят по результатам гибели стилохоний.

Исполнение опыта по определению токсичности экспериментального препарата с помощью этого экспрес-метода состояло в последовательном исполнении следующих действий: подготовка инфузорий, приготовление питательной среды и водного экстракта продукта, проведение эксперимента и оценки его результатов.

Средой для культивирования инфузорий и разбавления экстрактов служил раствор Лозина-Лозинского. Его готовили из следующих компонентов: NaCl – 0,01%; KCl – 0,001%; CaCl₂-дводородный – 0,001%; MgCl₂-шестиводородный – 0,001%; NaHCO₃ – 0,002%. Затем в ту часть раствора, какую планировали использовать для культивирования инфузорий, вносили

свежее высушенные хлебопекарские дрожжи (12 мг на 100 мл), которых предварительно тестировали на токсичность.

Для проведения опытов за настоящей методикой необходимо использовать только суточную культуру стилохоний находячихся в фазе экспоненциального (активного) роста. Поэтому, за сутки до опыта, стилохонии их ампул, в которых их поставляют цисты и споры культуры, пересаживают в новую питательную среду со свежим кормом и помещают в термостат при температуре 22-24° С.

Для приготовления водного экстракта испытываемых образцов берут навеску массой 1000±10 мг, вносят ее в колбу вместимостью 25 мл, заливают 10 мл дистиллированной воды и на 20 минут колбу помещают в аппарат для встряхивания жидкостей. Затем раствор в течении 5 минут центрифугируют с частотой вращения 1000 об/мин и используют надосадочную жидкость.

Каждую пробу исследовали в пяти повторностях. Пересадку и подсчет стилохоний проводили под микроскопом при увеличении 2 x 8 или 2 x 14. Сначала автоматической пипеткой отбирали по 20 мкл среды со стилохониями и помещали в каждую лунку двух рядов блока микроаквариумов (5 лунок в ряде – всего 10 лунок). Через 2 минуты учитывали в каждой лунке количество живых стилохоний. Затем в в пять (опытных) лунок первого ряда добавляли по 20 мкл полученного водного экстракта, а в 5 лунок второго ряда (контроль) – такое же количество дистиллированной воды и засекали время. Спустя три часа в лунках опытного и контрольного рядов снова проводили подсчет количества активных стилохоний и сопоставляли результаты.

Выживаемость стилохоний кожного ряда (N,%) вычисляли по следующей формуле –

$$N = N_2 : N_1 \times 100 \text{ где:}$$

N_1 – среднеарифметическое (из пяти) значение количества активных стилохоний в начале опыта, шт;

N_2 – среднеарифметическое (из пяти) значение количества активных стилохоний в конце опыта, шт.

Изучение острой токсичности нового пробиотика на лабораторных животных проводили в соответствии с «Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве». Опыты провели на 40 белых мышах двух месячного возраста, массой 18-21 г. Перед началом исследований их содержали в обычных условиях и наблюдали в течение 14 дней. Последний раз корм давали вечером накануне опыта, прием воды не ограничивали.

Из белых мышей по принципу парных аналогов сформировали 5 групп (n=8). Из них 4 опытных и одна – контрольная.

Исходя из результатов предыдущего опыта о не токсичности препарата «Субтилбен» на культуре колпод, в этой серии наблюдений сразу применили высшие дозы исследуемого препарата. Для этого мышам 4-х опытных групп пробиотик в виде суспензии на физиологическом растворе вводили однократно перорально в объеме 0,5 мл. На одно животное дозы опытного препарата составили – 180 мг (1-я группа), 220 мг (2-я группа), 260 мг (3-я группа) и 300 мг (4-я группа), что в пересчете на 1 кг массы тела составляло соответственно: 9 г; 11 г; 13 г и 15 г.

Контрольным животным (5-я группа) в таком же объеме ввели только физиологический раствор.

Через 6 часов после введения препарата произвели очередную дачу корма белым мышам всех групп, которых в дальнейшем переводили на обычный режим кормления. За ими наблюдали в течение 15 дней, учитывая общее состояние, внешний вид, поведенческие реакции, прием пищи и воды, ритм и частоту сердцебиения, количество дыхательных движений.

Результаты и обсуждение. В ходе анализа результатов опыта на культуре колпод (табл.1), после проведения исчислений в соответствии наведенной выше формуле, установлено, что через три часа опыта активность стилохоний опытного ряда составила 89%, а в контроле – 90%.

Таблица 1

Результаты реагирования стилохоний на пробиотик «Субтилбен»

Наименование ряда лунок	Количество активных стилохоний в лунках микроаквариума											
	В начале опыта						Через 3 часа					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	N ₁	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	N ₂
опытный	9	11	8	10	8	46	8	9	8	9	7	41
контрольный	10	8	12	9	11	50	9	7	10	9	10	45

Руководствуясь требованием ГОСТ Р 52337-2005 до не токсичных препаратов микробиологического синтеза относят средства под действием которых за установленное время остаются активными свыше 80% стилохоний. Исходя из этого, пробиотик «Субтилбен», является не нетоксичным препаратом.

В ходе установления острой токсичности экспериментального препарата вторым методом, за клиническим состоянием белых мышей всех групп проводили постоянное наблюдение в течении первых шести часов, потом через каждые три часа в течении первых суток опыта. При этом должны были фиксировать: начало и динамику развития клинических проявлений отравления, время гибели опытных животных или возобновление примет улучшения их физиологического состояния. В последующие 14 дней опыта, ежедневно три раза проводили определения клинического состояния лабораторных животных всех групп. За все время наблюдения не было ни одного случая падежа животных кроме кратковременного снижения двигательной активности в первые 3-4 часа наблюдений. В дальнейшем клиническое состояние животных опытных и контрольной групп не отличалось (табл. 2).

Таблица 2

Результат изучение острой токсичности пробиотика «Субтилбена» на белых мышах

Показание	Номер группы и доза препарата, г /кг				
	№1	№2	№3	№4	№5
	9,0	11,0	13,0	15,0	0
Количество животных, гол.	8	8	8	8	8
Из них выжило	8	8	8	8	8
Пало	0	0	0	0	0
Z					
D					
DZ					

Таким образом, опыты на белых мышах свидетельствуют о том, что биомасса пробиотика «Субтилбен» при энтеральном введении в максимальных дозах до 15000 мг/кг не вызывала гибели экспериментальных животных.

Следовательно, экспериментальный пробиотик «Субтилбен» в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 возможно отнести к VI классу токсичности, тесть до веществ относительно безопасных.

ВЫВОДЫ

1. Новый пробиотический препарат «Субтилбен» созданный в форме порошка на основе разных штаммов *B. subtilis* в ходе опытов двумя способами не вызывал снижения активности стилохоний и гибели лабораторных животных.

2. В ходе опытов для препарата «Субтилбен» LD₅₀ не удалось установить, так как доза выше 14 000 мг / кг массы тела не приводила к гибели животных опытных групп.

Перспективы дальнейшего исследования. Для завершения сбора нормативной документации для регистрации данного препарата необходимо провести исследование его хронической токсичности.

STUDYING FOR THE ESTABLISHED OF THE PARAMETERS OF HIGH TOXIC OF PREPARATION «SUBTILBEN»

N.R. Sattorov

Tajik agrarian university of a name of SH. Shotemur
(Dushanbe city, Republic of Tajikistan)

For correction of microflora of intestines it has been developed new preparation «Subtilben» on the basis of various strain *B. subtilis*. Parameters of clinic harmlessness of these preparations it has been studied on laboratory animals. It was established by two methods, so probiotic «Subtilben» is practically harmless and no toxic preparation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зароза В.Т. Желудочно-кишечные болезни телят и меры борьбы с ними / Зароза В.Т. – М: Колос, 1985. – 62 с.
2. Третьяков А.М. Пробиотик Био-бифивит для коррекции постгельминтизационных дисбактериозов кишечника у овец / А.М. Третьяков // Ветеринария, 2009. - №8. – С. 34-36.
3. Сатторов И.Т. Смешанные желудочно-кишечные инфекции телят и меры борьбы с ними / И.Т. Сатторов, К.Б., Махмудов, А.Ш. Хамдамов // Науч. тр. ВНИИВВиМ. – Покров, 2000. – С. 101-104.
4. ГОСТ Р 52337-2005 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности. – 12 с.
5. ТУ 9388-001-885-95. Культура *Colpoda stenii* для эколого-токсикологических исследований. – М.: Стандартиформ. – 15 с.
6. Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве. – М., 1988. – 100 с.

Рецензент: доктор ветеринарных наук, профессор А.В. Березовский.