

НАО «Казахский агротехнический университет имени С. Сейфулина»

УДК 619:614.3:637(043.3)

На правах рукописи

ЖУБАТКАНОВА АИГЕРИМ ЖАНДАРБЕКОВНА

**Ветеринарно-санитарная оценка молочной продукции при использовании
химических и биологических средств
для санации помещений**

6D120200 – Ветеринарная санитария

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты
кандидат ветеринарных наук,
доцент
А.Н. Жумакаева

доктор PhD
М. Новицкий

Республика Казахстан

Астана, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| НОРМАТИВНЫЕ СЫЛКИ | 4 |
| ОПРЕДЕЛЕНИЯ | 5 |
| ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ | 6 |
| ВВЕДЕНИЕ | 7 |
| 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 12 |
| 1.1 Влияние заболевания молочных желез коров на производство молочной продукции..... | 12 |
| 1.2 Современные методы дезинфекции в животноводстве..... | 24 |
| 1.2.1 Действие химических дезинфицирующих средств на микробные клетки..... | 27 |
| 1.2.2 Пробиотические чистящие средства для поверхностей как возможная альтернатива традиционным дезинфектантам..... | 32 |
| 1.2.3 Механизмы действия пробиотиков на организм человека и животных..... | 37 |
| 1.2.4 Роль пробиотиков и пробиотических продуктов в ветеринарии..... | 39 |
| 1.2.5 Роль пробиотиков и пробиотических продуктов в профилактике инфекционных заболеваний и лечении больных животных..... | 41 |
| 2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ | 47 |
| 2.1 Материалы и методы исследований..... | 47 |
| 2.1.1 Метод определения бактериологической обсемененности поверхности помещения для содержания животных..... | 52 |
| 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 63 |
| 3.1 Мониторинг и оценка микробной обсемененности животноводческих помещений до и после применения химических и биологических средств дезинфекции..... | 64 |
| 3.1.1 Изучение микробной обсемененности, проведенных до и после дезинфекции помещений для содержания коров..... | 64 |
| 3.1.2 Эффективность применения химических и биологических средств дезинфекции..... | 69 |
| 3.1.3 Изучение влияния применения химических и биологических средств дезинфекции в помещениях молочных ферм..... | 70 |
| 3.2 Определение качественных показателей молока при применении химических и биологических средств дезинфекции..... | 70 |
| 3.2.1 Физико-химические свойства молока..... | 73 |
| 3.2.2 Диагностика мастита коров прибором «Маститон»..... | 75 |
| 3.3 Мероприятия по снижению микроорганизмов и соматических клеток в молоке коров..... | 78 |
| 3.3.1 Обработка помещения для содержания коров пробиотическим средством РІР Hause Cleaner и химическим Кристалл-900..... | 78 |
| 3.4 Изучение микрофлоры молока после применения химических и биологических средств дезинфекции в лаборатории..... | 84 |

| | | |
|-------|---|------------|
| 3.5 | Использование пробиотических культур для разработки дезинфицирующих препаратов и создание консорциумов из отобранных культур..... | 87 |
| 3.5.1 | Разработка технологии создания консорциума из пробиотических культур для дезинфекции помещений молочных ферм..... | 87 |
| 3.5.2 | Изучение эффективности комплексных мероприятий при использовании консорциума для профилактики мастита на ферме ТОО АФ «Родина»..... | 99 |
| 3.6 | Экономическая эффективность использования пробиотических средств для профилактики мастита..... | 108 |
| | ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 110 |
| | ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 115 |
| | СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ..... | 116 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ А – Акты апробации..... | 131 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Заявление о выдаче патента..... | 136 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ В – Фотографии из личного архива..... | 137 |

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 2668-85. Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов.

ГОСТ 26669-85. Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов.

ГОСТ 52814-2007. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода сальмонелла.

ГОСТ 10444.12 – 88. Методы выявления и определения количества бактерии группы кишечных палочек. Метод определения дрожжей и плесневых грибов.

ГОСТ 12.1.004-91. Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования.

ГОСТ 12.1.005-88. Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 12026-76. Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.

ГОСТ 1770-74. Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 24104-2001. Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия.

ГОСТ 6709-72. Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 9147-80. Посуда и оборудование лабораторные и фарфоровые. Технические условия.

ГОСТ 2668-85. Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов.

ГОСТ 26669-85. Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов.

ГОСТ 52814-2007. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода сальмонелла.

ГОСТ 52816-2007. Методы выявления и определения количества бактерии группы кишечных палочек.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Антагонизм микробов – биологическая несовместимость микроорганизмов различных видов.

Адгезивная активность – способность бактерий прикрепиться к эпителию кишечника и размножиться прежде, чем клетки слизистого слоя будут обновлены.

Биопрепараты – это многокомпонентные продукты, в основу которых составляют микроорганизмы (бактерии) и вспомогательные вещества.

Индигенная микрофлора – живые культуры микроорганизмов, которые составляют основу нормальной микрофлоры человека и животных.

Инокулят – суспензия живых клеток, вводимая в питательную среду с целью получения новой культуры микроорганизма.

Микробиоценоз – совокупность микроорганизмов в составе определенного биоценоза.

Оптимизация – это выбор из всех возможных вариантов использования, которые дают наилучшие результаты.

Пробиотики – это живые микроорганизмы, улучшающие флору кишечника.

Пробиотические микроорганизмы – непатогенные, нетоксигенные микроорганизмы, благотворно воздействующие на организм человека и животных, нормализующие состав и биологическую активность собственной (индигенной) микрофлоры.

Стабилизация – устойчивый, постоянный.

Санация – санитарно-профилактические меры по очистке и обеззараживанию помещений.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

| | |
|-----|--|
| °С | - градусы по Цельсию |
| БАВ | - биологически активные вещества |
| БАД | - биологически активные добавки |
| ВОЗ | - Всемирная Организация Здоровья |
| ЖКТ | - желудочно-кишечный тракт |
| КОЕ | - колониеобразующие единицы |
| МКБ | - молочнокислые бактерии |
| МРС | - питательная среда Ман, Рогоза и Шарп |
| ООН | - Организация Объединенных Наций |
| РНК | - рибонуклеиновая кислота |
| СПА | - сухой питательный агар |
| МПА | - мясопептонный агар |
| ОМЧ | - общее микробное число |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследований. Молочное скотоводство Казахстана является одной из самых доходных отраслей животноводства, и необходимость его дальнейшего развития диктуется удовлетворением потребностей населения в продуктах питания собственного производства, что играет важную роль в продовольственной безопасности страны. Молочная продуктивность и качество молока коров являются важными показателями для животноводческих хозяйств. Современные технологии позволяют создать максимально комфортные условия для коров, но, не смотря на это, многие хозяйства не могут достичь главной цели – получения молока высокого качества.

Для сохранения продуктивного потенциала молочного скота, увеличения валового производства молока и повышения конкурентоспособности молочной продукции на отечественном и мировом продовольственных рынках, необходимо повышение эффективности молочного скотоводства.

Однако повышение молочной продуктивности коров и улучшение качества молока приводят за собой различные болезни (Сиренко С.В., 2015). Учитывая это необходимо по новому решать вопросы обслуживания животноводческих хозяйств промышленного типа. Особое внимание следует уделять комплексному подходу к проведению мероприятий по профилактике и лечению болезней коров.

О снижении качества молока свидетельствует его бактериальное загрязнение и повышенное содержание в нем соматических клеток. Количество соматических клеток в молоке является важным показателем, определяющим его качество и безопасность.

Основным фактором, определяющим уровень санитарно-гигиенических показателей качества получаемого молока является гигиена содержания коров. Изучение роли гигиены доения имеет большое значение для правильного понимания путей решения проблемы получения молока высокого качества. Особое внимание ученых и практиков в последние годы сосредоточено на использовании и внедрении высокоэффективных моющих и дезинфицирующих средств в производстве молока. Но только комплексный подход к решению данной проблемы позволит достичь положительного результата. Приоритетной задачей, стоящей перед животноводческой отраслью современного сельскохозяйственного производства страны, является обеспечение высокого уровня молочной продуктивности крупного рогатого скота и получение молока высокого санитарно-технологического качества.

Частота данной патологии молочной железы коров в высокопродуктивных стадах может достигать 50% и более от общего числа лактирующих животных (Елесин А.В., Баркова А.С., 2007), а потери молочной продуктивности составлять 10 и более %. Это непосредственно связано и с интенсивным использованием дезинфицирующих средств в условиях воспроизводства животных, что привело к появлению микроорганизмов,

обладающих высокими резистентными свойствами, устойчивыми даже к сильным дезинфектантам. Для того чтобы снизить распространение заболеваний и удерживать качество выпускаемой продукции на должном уровне, предприятия вынуждены применять более сильные дезинфицирующие и моющие средства при обеззараживании животноводческих помещений, а через некоторое время менять их на новые.

Длительное повсеместное, а порой и бессистемное применение химиотерапевтических средств при дезинфекции помещений для содержания животных привело к снижению эффективности лечения данного заболевания из-за образования лекарственно устойчивых штаммов микроорганизмов. Ведь ветеринарно-санитарные мероприятия являются неотъемлемой частью технологического процесса в животноводстве, на убойных пунктах, мясокомбинатах и других предприятиях по переработке сырья и продуктов животного происхождения. Они направлены на выполнение комплекса неспецифических работ, способствующих исключению возникновения и распространения инфекции, получению готовой продукции требуемого санитарного качества и контролю гигиенического состояния хозяйств и предприятий.

И химические элементы, применяемые при обработке помещений, подавляют факторы местной резистентности молочной железы и могут отрицательно влиять на секреты. Наличие в молоке остаточных количеств химиотерапевтических средств создает опасность для потребителей. Попадая с пищей в организм человека эти вещества способны вызывать дисбактериозы, аллергические реакции, нарушение обмена веществ.

Одним из путей преодоления негативных последствий применения химических средств при субклиническом мастите коров, является разработка эффективных экологически безопасных средств для дезинфекции помещений, которые бы имели и моющий эффект а так же и лечебные свойства, не содержащих химиотерапевтических средств.

В комплексе мероприятий по увеличению производства продуктов животноводства, улучшению качества и снижению их себестоимости большое значение имеют разработка и внедрение в производство прогрессивной технологии содержания животных, размещение их в постройках, удовлетворяющих сани-тарногигиеническим требованиям и обеспечивающих нормальное течение физиологических процессов в организме животных. Поэтому необходимо создавать животным такие условия, при которых они могли бы наилучшим образом проявить потенциальные возможности своей продуктивности, обусловленные наследственностью. При нарушении условий содержания, ветеринарно-санитарных норм, воздействии технологических стрессов и т.д. снижается их продуктивность, устойчивость к заболеваниям. У животных нарушается обмен веществ, снижается перевариваемость и усвояемость питательных веществ корма, что отрицательно влияет на эффективность животноводства [1-3].

В конце прошлого века начата разработка экологически безопасных технологии очистки и стабилизации микрофлоры при воспроизводстве

животных в результате которой появились технологии на основе пробиотиков [4].

В настоящее время во всем мире, включая и нашу страну, усиленно ведется поиск альтернативных путей замены и снижения применения дезинфектантов для объектов ветеринарного надзора.

Одним из реальных направлений являются пробиотики. Они представляют собой биомассу бактерий в вегетативной или споровой форме с четко выраженной антагонистической активностью к патогенной и условно патогенной микрофлоре. Пробиотики нацелены на создание здоровой и стабильной микрофлоры, противопоставленной среде неестественной абсолютной стерильности [5].

Пробиотики оказывают благоприятное действие на организм, как животного, так и человека [6, 7].

Использование отдельных антибактериальных и дезинфицирующих препаратов отрицательно влияет на качество выпускаемой продукции, так как происходит накопление их в продуктах животноводства [8-10].

Тогда как биологические препараты на основе пробиотических культур не накапливаются в продуктах животноводства и способствуют лишь увеличению выхода мяса и молока.

В государственной программе 2030 намечается строительство крупных животноводческих комплексов, которые будут нуждаться в стабилизации микробного фона, применение пробиотических средств позволяет обеспечивать безопасность окружающей среды и качество получаемой продукции.

Поэтому изучение вопросов применения пробиотических средств дезинфекции на молочных фермах и их влияния на санитарно-гигиенические показатели молока является весьма актуальным. Кроме того, разработанная нами технология стабилизирующего средства для объектов животноводства на основе отечественных штаммов пробиотических культур микроорганизмов, будет являться гарантией безопасности получаемой продукции, а также снизятся затраты на проведение мероприятий при дезинфекции.

Целью диссертационной работы – является изучение эффективности применения химических и биологических средств санации, создание консорциума из пробиотических культур для использования на молочных фермах и оказания влияния на ветеринарно-санитарную оценку молока.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- Провести мониторинг микробной обсемененности молочных ферм ТОО АФ «Родина»;
- Изучить эффективность применения химических и биологических средств дезинфекции в сравнительном аспекте в помещениях молочных ферм;
- Изучить влияние применения химических и биологических средств санации в помещениях молочных ферм на физико-химические показатели молока;
- Разработать технологию создания консорциума из пробиотических культур для использования при санации помещений молочных ферм.

- Изучить эффективность консорциума при комплексных профилактических мероприятиях.

Научная новизна. Изучена эффективность применения химических и биологических средств дезинфекции в сравнительном аспекте на молочных фермах, влияние применения данных средств дезинфекции на заболеваемость коров маститом, а также определены качественные показатели молока коров, находящихся в помещениях, подвергшихся санации. Установлено улучшение качества молока по количеству мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов и соматических клеток. Кроме того, разработана технология создания консорциума из пробиотических культур для использования при санации помещений молочных ферм.

Практическая значимость работы. Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическую значимость работы представляет обоснование снижения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов и соматических клеток в молоке коров.

Практическая значимость работы заключается в улучшении санитарно-гигиенического состояния коровника, вымени коров, снижении микробиологической обсемененности и количества соматических клеток, повышении качества молока.

В условиях ТОО АФ «Родина» с положительным эффектом апробировано использование пробиотических средств для обработки вымени и стабилизации микрофлоры коровника. Установлено улучшение качества молока коров по микробиологическим показателям (Приложение А).

Предложено биологическое средство для их применения как в виде моющего средства для животноводческих помещений, так и для профилактики мастита высокопродуктивных коров, с использованием пробиотической культуры (Приложение Б).

Полученные результаты исследований могут быть рекомендованы для дезинфекции помещений молочных ферм с целью профилактики маститов и улучшения санитарно-гигиенических показателей молока. Разработанная технология создания консорциума из пробиотических культур может быть предложена производству в качестве эффективного средства для санации животноводческих помещений.

По материалам диссертации подготовлено в сельскохозяйственное производство научно-практическая рекомендация «Ветеринарно-санитарные мероприятия по охране здоровья высокопродуктивных коров и повышению качества молока», результаты которых будут использованы в учебном процессе АО «Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина».

Апробация работы.

Результаты исследований доложены на научных конференциях:

- международной научно-практической конференции «Ветеринария в XXI веке: проблемы, методы, решения», посвященная 100-летию со дня рождения профессора Кадырова Н.Т. (Нур-Султан, 2016 – 27-28 октября. – С. 124-127);

- республиканской научно-теоретической конференции

«Сейфуллинские чтения–14: Молодежь, наука, инновации: цифровизация – новый этап развития» (Нур-Султан, 2018 – 26 апреля);

– международной научно-практической конференции (Москва, 2018. – 15-30 ноября. – С. 199-204);

а) напечатаны статьи в:

– многопрофильном научном журнале «3 i: intellect, idea, innovation - интеллект, идея, инновация». – 2018. – №3. – С. 3-8;

– вестнике Государственного университета имени Шакарима г. Семей. – 2018. – №3(83). – С. 343-347;

– вестнике Казахского агротехнического университета имени С. Сейфуллина (Нур-Султан, 2018. – №3(93). – С. 128-132;

– international journal of Veterinary Science. – 2018. – №7(4). – С. 186-189.

Положения, выносимые на защиту:

- Мониторинг микробной обсемененности молочной фермы ТОО АФ «Родина»;
- Изучение эффективности применения химических и биологических средств дезинфекции в сравнительном аспекте в помещениях молочных ферм;
- Влияние применения химических и биологических средств санации в помещениях молочных ферм на физико-химические показатели молока;
- Разработка технологию создания консорциума из пробиотических культур для использования при санации помещений молочных ферм;
- Изучение эффективности консорциума при комплексных профилактических мероприятиях.

Публикация результатов исследований. Результаты исследований отражены в 8-и печатных работах, 3 из которых в изданиях, рекомендованных Комитетом МОН РК, 2 статьи в журналах с ненулевым импакт-фактором:

1. International Journal of Veterinary Science входящим в базу данных Scopus (Impact Factor 2018 – 0,12) (Impact Factor 50).

2. EurAsian Journal of BioSciences Eurasia J Biosci 13, [1841-1848](#) (2019) входящим в базу данных Scopus (Impact Factor 39).

2 статьи в материалах международных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 130 страницах компьютерного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и результатов собственных исследований, обсуждения и заключения. Работа содержит 218 источников использованной литературы, 22 таблицы и 30 рисунков.

Работа выполнялась в рамках инициативного проекта «Разработка биопрепарата для стабилизации микробного фона животноводческих помещений» 0118РКИ0571 Жумакаева А.Н. 2018 ВиТЖ.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Влияние заболевания молочных желез коров на производство молочной продукции

Молочные продукты, особенно молоко, являются одним из наиболее важных источников питания для большинства населения мира. Растущий мировой спрос на молочные продукты обуславливает необходимость увеличения среднего удоя на корову [1, р. 1277]. Увеличение удоя молока стало результатом генетического отбора, а также улучшения питания и управления коровами. Одной из самых больших проблем, влияющих на высокий удой молока, является плохое здоровье вымени, особенно из-за мастита [2, р. 1030].

Мастит, проявляющийся воспалением молочной железы, в настоящее время является одним из наиболее распространенных заболеваний, поражающих молочный скот [3, р. 47; 4, р. 20; 5, р. 4729-4745]. Примерно 60-70% всех противомикробных препаратов, вводимых на молочных фермах, предназначены для профилактики и лечения мастита [6, р. 144-154]. Мастит вызывает резкое снижение производства молока и доходов фермерских хозяйств [8, р. 139-149; 9, р. 304-310; 10, р. 61-66; 11, 12]. Общественное здоровье потенциально подвержено риску, поскольку мастит может передавать зоонозы и болезни, связанные с пищевыми токсинами [13, 14]. По этой причине прямое потребление сырого молока не рекомендуется из-за высокой вероятности заражения микроорганизмами коровы, пастбища, доильного аппарата и контейнеров. Следовательно, пастеризация молока обязательна для обеспечения его безопасности, а также для продления срока годности [15].

Воспаление определяется как реакция ткани на повреждение [16]. В случаях мастита, вызванного бактериями, такие микроорганизмы, как *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* и золотистый стафилококк, заражают молочную железу [17], и распространенность специфических патогенов варьируется по всему миру. В некоторых стадах наиболее серьезная проблема вызвана коагулазонегативными стафилококками (ЦНС) [18], которые могут появляться или не появляться как проблема в других стадах. Таким образом, перечисленные возбудители в этом обзоре могут быть не самыми распространенными в каждой области и в каждом стаде.

Количество соматических клеток (SCC) может быть использовано в качестве показателя здоровья вымени. Здоровые или уже выздоровевшие от мастита коровы должны иметь SCC ниже 200 000 клеток/мл, а коровы с количеством клеток более 400 000 клеток/мл должны рассматриваться как имеющие внутримаммарную инфекцию [19].

Мастит напрямую влияет на технические характеристики и гигиенические качества молока, косвенно изменяя его внутренние качества [4, р. 25].

Еще одной актуальной проблемой является способность патогенов противостоять противомикробным агентам по мнению автора статьи Холко И. [19, р. 438] продемонстрировал, что примерно 62% изолированных агентов,

вызывающих мастит, устойчивы по крайней мере к одному противомикробному агенту. В большинстве случаев выделенные штаммы демонстрировали устойчивость к стрептомицину, неомицину, цефалексину и пенициллину. Наихудшие случаи наблюдались в *Str. agalactiae*, где 100% изолятов были способны противостоять по крайней мере одному противомикробному агенту (амоксциллин, амоксициллин/хлор, клоксациллин, пенициллин, цефалексин, цефалексин/канамицин, цефтиофур, цефхином, тетрациклин, стрептомицин, неомицин, линкомицин, рифаксимин, новобиоцин, сульфаметоксазол/триметоприм, и энрофлоксацин). Устойчивость была обнаружена у 86% изолятов *Str. uberis* и 79% изолятов *E. coli*.

Распространенность и классификация мастита. Существует множество способов классификации мастита. Случаи мастита можно разделить по признаку происхождения на экологические и инфекционные. Экологический мастит вызывается бактериальными микроорганизмами из окружающей среды, называемыми экологическими патогенами, в то время как инфекционный мастит возникает из-за распространения из других инфицированных кварталов [20, 21]. Как правило, к числу патогенов окружающей среды относятся *E. coli*, *Klebsiella* (К.) *pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* и *Str. uberis*. Клаас и Задокс [22] предположили, что многие микроорганизмы, такие как *S. aureus* и *Str. agalactiae*, могут быть классифицированы как патогены окружающей среды, даже если они обычно классифицируются в литературе как возбудители инфекционного мастита. Эта точка зрения подтверждается тем, что эти патогены передаются несколькими путями не только через заразное молоко от инфицированных коров или плохую гигиену во время доения, но и через постельные принадлежности, фекалии, мочу и другие загрязнители. Водоросли из рода *Prototheca* обычно классифицируются как возбудители экологического мастита, но, согласно авторам Яноси [23] и Осуми [24], неясно, являются ли они заразными или патогенами окружающей среды. Экологический мастит вызывается микроорганизмами, присутствующими в окружающей среде животного. Эти патогены заражают вымя через канал соска [25]. Согласно Nemeth et al. [26], фекалии являются основным источником патогенов окружающей среды. Канал соска может оставаться открытым в течение одного-двух часов после доения [27], а между дойками конец соска постоянно подвергается воздействию патогенов окружающей среды; это в отличие от инфекционных патогенов, которые обычно поражают сосок только во время доения [21, р. 1932]. По данным автора статьи Идриса С.Е. [18, р. 115], большинство внутримаммарных инфекций устанавливается во время доения или до двух часов после этого. Процесс микробной контаминации молока до и после подготовки вымени к доению был описан Tancin et al. [28]. Средства борьбы с маститом, такие как дезинфекция концов сосков после доения и сухая терапия коров, гораздо менее эффективны против агентов, вызывающих мастит в окружающей среде, но было доказано, что эти средства борьбы очень эффективны против инфекционных патогенов [29-31].

По данным Шарифа А. [32], наиболее заразными патогенами, вызывающими внутримаммарное воспаление, являются *S. aureus*, *Str. agalactiae*

и *Str. uberis*. Аналогичные данные были представлены для условий в Словакии [19, p. 439; 20, p. 1531; 33, 34].

Основными резервуарами инфекционных патогенов являются области прямой кишки, рубца и половых органов, а также молочная железа. Инфекция распространяется во время доения, когда инфицированное молоко контактирует с неинфицированной молочной железой, а затем бактерии проникают в канал соска [35]. Распространенность инфекционного мастита может быть снижена за счет реализации пятибалльной программы [36], которая позже была расширена до десятибалльной программы [37]. Эта программа охватывает аспекты здоровья вымени, процедуры доения, клиническую терапию мастита, управление сухими коровами и другие методы управления для контроля всех патогенов мастита.

Мастит также может быть классифицирован как клиническое или субклиническое внутримаммарное воспаление в зависимости от симптомов. Клинический мастит характеризуется внезапным началом с покраснением и отеком вымени [38]. Молоко пораженной четверти изменено, содержит хлопья или сгустки и/или имеет водянистую консистенцию. Коровы могут быть заметно вялыми, иметь плохой аппетит и обычно иметь лихорадку. Количество соматических клеток выше по сравнению с обычно нормальным количеством менее 200 000 клеток/мл. Субклинический мастит, напротив, характеризуется отсутствием видимых признаков в молоке или в вымени [39]. Тем не менее, это приводит к снижению производства молока (хотя и не так сильно, как в клинических случаях) и повышению SCC.

Как сообщают Ширер и Харрис [40] и Сигерс и др. [41], субклинический мастит встречается в 15-40 раз чаще, чем клиническая форма, и его продолжительность больше. Поэтому субклинический мастит труднее обнаружить, и инфекция служит резервуаром патогенов, которые распространяют инфекцию вымени среди животных в стаде.

В последние годы, особенно в странах с более высоко развитой отраслью молочного животноводства, распространенность инфекционного мастита значительно снизилась, в то время как относительная заболеваемость экологическим маститом возросла [42-45]. В таблице 1 мы приводим данные различных исследований распространенности патогенов в различных развитых странах. Возможной причиной этого изменения является постоянное улучшение уровня гигиены и программ борьбы с маститом на фермах, в то время как риск состояния окружающей среды не может быть эффективно устранен. В развивающихся странах ситуация иная. Выбраковка животных, инфицированных маститом, в основном субклинической формы, не практикуется в менее развитых частях мира, таких как Эфиопия, Уганда, Руанда и Пакистан.

Следовательно, патогенные микроорганизмы, обнаруженные в случаях субклинического мастита, обычно происходят от постоянных или хронических инфекций. Обычным источником инфекций является вымя, пораженное патогенами. Болезнь в основном передается из-за плохой гигиены во время доения и из-за того, что зараженных коров доят не в последнюю очередь. Таким

образом, коровы, которые уже инфицированы, являются основным источником мастита в этих странах, а патогенные микроорганизмы, происходящие из окружающей среды, имеют второстепенное значение [46].

Основные патогены вызывающие мастит. В дополнение к классификации возбудителей мастита, основанной на происхождении, их можно разделить на основные и второстепенные патогены в зависимости от их распространенности и тяжести симптомов. По данным Хейкилла А.М. [47] и Сейдани М. [48], основными патогенами, вызывающими мастит, являются

E. coli, *S. aureus* и стрептококки. *E. coli* и *S. aureus* также могут передаваться людям, поскольку они являются зоонозными патогенами [49-54]. В таблице 2 мы приводим данные различных исследований.

Escherichia coli. Одним из наиболее важных патогенов, вызывающих экологический мастит, является кишечная палочка. Он обычно поражает молочную железу во время ранней лактации, иногда приводя к летальным последствиям, если его не лечить [55]. Гиперострый мастит кишечной палочки считается наиболее частой причиной летальных исходов [56]. Клинический исход мастита *E. coli* зависит от тяжести инфекции [57], стадии лактации [55, р. 399], энергетического баланса [58], дефицита витаминов [54, р. 189] и статуса вакцинации [55, р. 400]. Когда кишечная палочка встречается в легкой форме, у коров проявляются только местные признаки в вымени и молоке, а продолжительность симптомов коротка. В других более острых случаях это может иметь очень тяжелые или даже смертельные последствия [57, р. 74]. Патоген, как правило, не проникает в альвеолы и ткани молочной железы, а, скорее, остается в сосковом канале и молочных пазухах. Соответственно, более частое доение во время кишечного воспаления является полезным средством для молочной железы [55, р. 401]. Однако более частое доение не доказало своей эффективности в случаях умеренного и тяжелого мастита, что указывает на то, что бактерии размножаются слишком быстро, чтобы этот метод был эффективным, и что патоген распространился на железистую цистерну вымени [59].

Первичной клеточной защитой молочной железы от мастита является фагоцитоз, который опосредуется нейтрофилами [60]. Уровень, скорость и эффективность реакции нейтрофилов сильно влияют на пиковое количество бактерий в вымени и тяжесть заболевания. Это может объяснить, почему вакцинация против мастита *E. coli* более успешна, чем вакцинация против других агентов, вызывающих мастит [61]. Двумя наиболее важными факторами, ограничивающими выживаемость кишечной палочки в вымени, являются способность патогенов использовать лактозу и выживать в почти анаэробных условиях. В сухих молочных железах коров железо может быть фактором, ограничивающим пролиферацию кишечной палочки. Во время инволюции вплоть до молозива сухое вымя коровы имеет высокий уровень железосвязывающего белка лактоферрина, который обеспечивает антибактериальную функцию. Если инфекция установлена и реакция нейтрофилов замедлена, *E. coli* может удваивать свою популяцию каждые 20 минут [62]. При метаболизме молочного углевода лактозы и при слабой

реакции иммунной системы популяция колониеобразующих единиц *E. coli* может достигать 10⁸ на миллилитр молока [63]. Частота распространения патогена в образцах молока, которые дали положительный результат, была описана в работе Идриса [18, р. 116].

Внешняя клеточная стенка кишечной палочки содержит эндотоксин, который обладает инфекционным потенциалом и играет важную роль в патогенезе бактерий. Эндотоксин считается основным фактором вирулентности грамотрицательных бактерий и отвечает за повреждение ткани вымени, но его присутствие в молочной железе также вызывает активность лейкоцитов [64]. Хоган и Смит [60, р. 507] заявили, что возникновение нового воспаления окружающей среды в молочной железе чаще происходит в сухой период, чем во время лактации. Они сообщили, что самый высокий риск новой инфекции мастита возникает в течение первых двух недель после высыхания и в последние две недели тяжести. Воспаление, возникающее в последние две недели перед отелом, особенно опасно, поскольку оно почти всегда сохраняется до лактации [21, р. 1935]. Эта инфекция обычно начинается в субклинической форме и затем может перерасти в клинический мастит на ранней стадии лактации, который продолжается более 100 дней в период доения [65]. Смит и др. [20, р. 1531] показали, что 65% клинических случаев мастита, возникающих в течение первых двух месяцев лактации, возникли в сухой период. В более позднем исследовании Брэдли и Грин [62, р. 1857-1964] показали, что 50% клинических маститов, вызванных кишечной палочкой, возникли в сухой период. Поэтому эффективное управление сухими коровами должно рассматриваться как важная часть любой программы борьбы с маститом [66].

Klebsiella pneumoniae. Хотя обычно считается агентом окружающей среды, который в основном присутствует в окружающей среде и передается через окружающую среду, *K. pneumoniae* может иногда распространяться от инфицированной коровы к здоровой корове [61, р. 201]. Чаще всего он встречается в подстилке, особенно в опилках и торфе, которые являются основными резервуарами этого патогена [67]. Вода и почва также являются возможными средами, в которых этот микроорганизм может выживать и процветать [68, 69].

По данным Тодхантера К. [50, р. 363], *K. pneumoniae* более способна, чем большинство штаммов *E. coli*, преодолевать ингибирующие эффекты лактоферрина и заражать молочную железу. Как и в случае инфекции *E. coli*, инфекция *K. pneumoniae* может начаться в конце сухого периода в виде субклинического мастита, а затем обычно прогрессирует в клиническую форму в начале лактации [65, р. 673]. Поскольку это грамотрицательная бактерия, похожая на кишечную палочку, внешний слой ее клеточной стенки содержит липополисахариды, которые являются известными эндотоксинами. Как упоминалось выше, этот эндотоксин является основным фактором вирулентности, который активирует цитокины, что приводит к повреждению ткани молочной железы.

Патофизиология внутримаммарного воспаления, вызванного *K. pneumoniae*, изучена не так широко, как при мастите *E. coli*, но недавний

обзор был посвящен патогенности, в котором сравнивался иммунный ответ коров с этими патогенами [70]. Тяжесть мастита *Klebsiella spp.* обычно находится на легком клиническом или субклиническом уровне [71]. В некоторых случаях это может иметь летальные последствия, как описано Рибейро и др. [66, р. 485]. После вскрытия коровы, подвергшейся эвтаназии из-за тяжелых симптомов клинического мастита, вызванного *K. pneumoniae*, они обнаружили, что микроорганизм может быть культивирован из фрагментов молочной железы и легких. Изолят показал тот же антимикробный профиль, что и штамм, выделенный из молока той же коровы. Это указывало на то, что при некоторых условиях патоген может проникать и в другие органы.

Streptococcus uberis. Согласно исследованиям Задокс и Дэвис, имеют общее мнение о том, что *Str. uberis* является возбудителем окружающей среды, является спорным, и передача от коровы к корове может быть преобладающим путем распространения патогена [72-74]. Большинство авторов классифицировали *Str. uberis*, который происходит в окружении животных, как возбудитель окружающей среды [75, 76].

Подобно *K. pneumoniae*, *Str. uberis* в основном присутствует в подстилочных материалах, таких как торф или солома [67, р. 239]. Этот патоген также может быть обнаружен на телах животных, например, на внешней коже вымени. Это показывает, что других инфицированных коров может быть одним из путей, по которым *Str. uberis* передается от инфицированных здоровым коровам [77]. Первоначальная инфекция обычно возникает между дойками, поэтому дезинфекция, чистка, обновление подстилки и удаление навоза помогают контролировать экологический мастит, связанный с этим патогеном. В системах молочного животноводства, основанных на пастбищах, само пастбище является основным резервуаром *Str. uberis* [78].

Традиционные постельные материалы, такие как солома, могут быть довольно дорогими, а их доступность недостаточной. В результате переработанные твердые частицы навоза, которые физически отделены от навозной жижи, иногда используются в качестве подстилки. Это привело к увеличению распространенности экологического мастита в последние годы [79].

Тяжесть воспаления молочной железы зависит от реакции иммунной системы хозяина, типа патогена и специфического штамма, поскольку некоторые конкретные штаммы более заразны, чем другие [80].

Большинство инфекций *Str. uberis* происходят в сухой период и обычно имеют субклиническую форму [81].

Эти инфекции обычно развиваются в острые случаи во время последующей лактации [82]. По данным Уилкинсона [80, р. 16], 56% всех маститов, диагностированных в период лактации, возникли в сухой период. Дэнис М. [81, р. 111] обнаружили, что макрофаги у коров в сухой период более активны, чем у коров в середине лактации, хотя инфекция *Str. uberis* обычно происходит в сухой период. Было показано, что темпы выздоровления от этих инфекций выше у коров первого и второго паритета по сравнению со старшими коровами.

Уже через шесть дней после установления инфекции этот патоген начинает повреждать альвеолярную ткань (вызывая фиброз), подобно *S. aureus*. Это может объяснить, почему *Str. uberis*, как было замечено, плохо реагирует на лечение антибиотиками [83].

И наоборот, автор Пьюрал С. [84] сообщил, что мастит, вызванный возбудителями окружающей среды, такими как кишечная палочка или *Str. uberis*, в большинстве случаев может быть вылечен антибиотикотерапией. Продолжительность случаев мастита, вызванного этим патогеном, варьируется в широких пределах и не может быть обобщена [85-87]. Несмотря на то, что большинство таких инфекций длятся относительно короткие периоды от 16 до 46 дней [88, 89], также сообщалось о случаях, длящихся значительно дольше (от 2 до 20 месяцев) [90, 91]. Особенно в персистирующих случаях повышенная вероятность повторного заражения наблюдалась после успешного лечения инфекций молочной железы *Str. uberis*. Аналогичный риск реинфекции наблюдался в случаях мастита *S. aureus* [92].

Streptococcus agalactiae. По данным Lyhs et al. [90, p. 2097], несколько источников косвенных доказательств предполагают, что доильный персонал может передавать *Str. agalactiae* в стада крупного рогатого скота. Исследование, характеризующее штаммы *Str. agalactiae*, выделенные из мастита вымени и от инфекций человека, показало, что они имеют 58% сходства, а кластеризация изолятов показала, что они имеют 70% генетического сходства [91-94]. Инфекции, вызванные человеческими штаммами, с большей вероятностью спонтанно заживают, чем инфекции, вызванные штаммами, инфицирующими вымя других животных [95].

Частота самолечения очень низка у штаммов, передаваемых от животного к животному [72, p. 336].

Косвенные данные свидетельствуют о том, что молодые коровы в период первой лактации более устойчивы к инфекционным возбудителям [96]. Патоген может выживать в течение относительно длительного времени и сохраняться незамеченным в вымени. Эти животные служат резервуарами инфекции и источниками распространения болезни [97].

В отличие от *S. aureus* и других инфекционных патогенов, *Str. agalactiae* не может размножаться или расти вне вымени, но может выживать в течение короткого времени на руках доильного персонала, доильных аппаратах и поверхностях сосков. Этого может быть достаточно для его распространения на здоровых коров во время доения. Даже если гигиена стада адекватна, некоторый риск связан с покупкой новых коров, если они инфицированы и не содержатся в карантине до интеграции в стадо. *Str. agalactiae* известна своей высокой инфекционностью, быстрым распространением и молчаливым характером.

Распространенность *Str. agalactiae* свидетельствует о том, что эта бактерия является значительной причиной мастита, особенно в стадах, которые плохо управляются и имеют плохую гигиену. Исследования Толлы [95, 365p.], Шарифа и др. [32, p. 102], Касса и др. [96, p. 33] и Лейкью и др. [97, p. 1507] показали, что основные возбудители мастита в менее развитых странах, таких

как Эфиопия или Пакистан, являются заразными и что наиболее распространенными случаями мастита являются случаи заразного происхождения. Это может быть связано с негигиеничной практикой доения и плохим управлением стадом. И наоборот, Томази [98] заявили, что распространенность *Str. agalactiae* стала очень низкой в отдельных регионах Европы и Северной Америки, главным образом из-за улучшенных программ борьбы с маститом. Этот патоген хорошо реагирует на антибиотикотерапию и может быть уничтожен из молочных стад с помощью хороших методов борьбы с маститом, таких как погружение соска после доения и терапия сухого периода [40, p. 5].

Терапия является одним из подходов, наиболее широко используемых для искоренения мастита *Str. agalactiae*.

Этот метод предполагает одновременное лечение всех коров в стаде, независимо от инфекционного статуса. Однако эта процедура является дорогостоящей и может создать устойчивость к противомикробным препаратам [99-102]. Метод обычно модифицируется таким образом, чтобы лечились только те животные, у которых положительный результат теста на инфекцию, особенно потому, что профилактическое использование антибиотиков запрещено в некоторых странах [103].

Золотистый стафилококк. Хан заявили, что инфекции, вызванные *S. aureus*, остаются самой большой проблемой мастита у молочного скота, поскольку уровень излечения с использованием антибиотиков очень низок во время лактации, и во многих случаях инфекции становятся хроническими, что часто делает необходимым выбраковку пораженного животного [40, p. 6].

Мастит, вызванный этим патогеном, успешно контролируется только путем предотвращения новых инфекций и выбраковки пораженных животных. Подобно другим инфекционным патогенам, он распространяется через компоненты доильного аппарата, руки доильного персонала и через мочалки [35].

Несмотря на то, что штаммы *S. aureus* чувствительны к широкому спектру антибиотиков *in vitro*, фермеры часто жалуются, что показатели излечения в условиях *in vivo* ниже, чем ожидалось. Возможно, подтверждением этого наблюдения являются доказательства того, что *S. aureus* обладает сильной способностью выживать при активности нейтрофилов [104], индуцируя фиброз в вымени и вторгаясь в эпителиальные клетки молочной железы [105]. Однако основная причина низкой скорости излечения заключается в его способности создавать микроабсцессы, которые препятствуют попаданию антибиотиков в патоген [35; 106]. Согласно результатам исследований, производственные потери, вызванные стафилококковым маститом, обычно носят долгосрочный характер. Патоген вызывает необратимое повреждение секреторной ткани вымени, которая впоследствии вытесняется несекреторной тканью, и это снижает способность коровы производить молоко [107].

По мнению автора Задокс Н.М. [52, p. 357], что, хотя *S. aureus* может передаваться от коровы к корове, он также может оставаться в среде молочной фермы между дойками. Телки являются доказанными резервуарами этого

патогена. В Тринидаде и др. [108] 12-15% коров первой лактации уже были инфицированы *S. aureus*.

Многие из них оставались инфицированными в течение всей лактации незамеченными и служили резервуарами для распространения инфекции на других коров в стаде.

В целом, 10-12% клинических случаев мастита вызваны *S. aureus* [109]. Реакция патогена на лечение *in vivo* слабая, и *S. aureus* обычно сохраняется в вымени [110]. Наиболее известна резистентность к антибиотикам пенициллина, но уровень резистентности варьируется в зависимости от года исследования и страны [111, 112]. Мастит, вызванный *S. aureus*, обычно является субклиническим и хроническим, и в работе Тенхагена [110, р. 2542] было показано, что он чаще возникает в конце, чем в начале лактации. Это соответствует наблюдениям Лованса [111, р. 3219] и Танк [112, р. 2223], которые обнаружили, что SCC был выше у коров с более поздней лактацией. Хертл и соавт. [70, р. 1465] отметили, что инфекция, вызванная *S. aureus*, оказывала более критическое влияние на выработку молока, если она происходила во время первой или второй лактации, чем во время третьей и последующих лактаций. Частично аналогичные результаты были получены Рексеном и соавт. [113]; однако в их исследовании наибольшие потери молока произошли во время первой и третьей лактации, но последствия были меньшими во время второй лактации.

Str. dysgalactiae. Хотя Фокс и Гей [51, р. 475-486] отметили, что статус *Str. dysgalactiae* как инфекционного или экологического возбудителя мастита может быть спорным, его важность как возбудителя мастита очевидна. Хан и Хан [38, р. 204] разделяли это мнение и указывали, что *Str. dysgalactiae* может жить практически в любом месте: в молочной железе, рубце, кале, подстилке и в сарае. Возбудитель был выделен не только из вымени, но и из других частей тела животных, включая ротовую полость, миндалины и влагалище [77, р. 5130; 114-118]. *Str. dysgalactiae* мастит может возникать в сухой период в стадах, даже если ранее не было никаких наблюдений за этим конкретным типом инфекции [82, р. 7691].

Этот патоген редко изучается отдельно; исследования обычно не отличают *Str. dysgalactiae* от *Streptococcus spp.* [49, р. 132]. Его распространенность часто сопоставима или даже превышает распространенность *Str. uberis* [119, 120].

Присутствие этого патогена в молочных стадах является серьезным, поскольку воспаление, вызванное этим агентом, обычно является острым [121]. Йерухам и др. [118, р. 462] заявили, что *Str. dysgalactiae* возникает в окружении животных и в редких случаях может передаваться через переносчиков насекомых, таких как осы или мухи. Однако этот вид передачи можно наблюдать только летом [122]. Патоген способен нейтрализовать неспецифический иммунитет животного, выделяя ферменты и токсины, способные преодолеть эту в противном случае эффективную защиту [123].

Реакция Хозяина и инфекционность патогена. Первая линия защиты вымени от патогенов-это конец соска. Он открыт и закрыт сфинктером,

состоящим из гладких мышц, который служит барьером для предотвращения проникновения патогенов в канал и предотвращения выхода молока. Канал соска выстлан многослойным плоским эпителием, который создает кератин для заполнения канала между 30 минутами и двумя часами после доения. Этот промежуток времени может варьироваться, создавая возможность для бактерий вблизи отверстия проникнуть в канал соска [55, р. 410]. Кератин состоит из жирных кислот и волокнистых белков. После того, как патогены попадают в канал соска, волокнистые белки электростатически связываются с патогенами, изменяют их клеточные стенки и тем самым делают их более восприимчивыми к осмотическому давлению. Неспособность поддерживать осмотическое давление вызывает лизис клеточных мембран и гибель вторгающихся патогенов [55, р. 411; 124]. Уровень защиты конца соска от патогенов зависит от нескольких специфических физических и физико-химических факторов, включая, среди прочего, длину и ширину канала соска, количество присутствующего кератина и молочность, измеряемую пиковой скоростью потока [41, р. 478; 42, р. 170].

Бактериальные патогены, способные проникать через отверстие канала и избегать антибактериальной активности кератина, создают патологический процесс в молочной железе. Вторая линия защиты, которая является иммунной реакцией хозяина, должна затем отреагировать.

Бурвенич и др. [52, р. 522] сообщили, что тяжесть заболевания в основном зависит от иммунного ответа и генетической предрасположенности хозяина, но Фернандес и др. [121, р. 1147] заявили, что вирулентность бактериальных штаммов также может играть важную роль в тяжести заболевания. Среди основных факторов, связанных с патогеном, вид, вирулентность, штамм и размер инокулята бактерий, в то время как факторы хозяина включают паритет, стадию лактации, возраст, иммунный статус животного [125, 126], стресс [127] и статус вакцинации [128]. Реакция иммунной системы на ранних стадиях инфекции зависит от рецепторов клеточной поверхности, которые могут распознавать микробные молекулы [129], в дополнение к растворимым компонентам, таким как белки острой фазы и цитокины, которые секретируются в кровь и молоко [130]. Реакция хозяина специфична для различных типов агентов, вызывающих мастит [131]. По данным Эрнандеса-Кастеллано и др. [128, р. 284], грамотрицательные бактерии, такие как *E. coli*, вызывают гораздо более высокие концентрации иммуноглобулина G и активность лактатдегидрогеназы по сравнению с грамположительными бактериями. Это означает, что лактатдегидрогеназа в сочетании с SCC может использоваться в качестве маркера для дифференциации грамположительных и отрицательных бактерий.

В настоящее время лечение мастита в основном включает использование антибиотиков, хотя к этим препаратам добавляются глюкокортикоиды, такие как преднизолон [132, 133]. Они помогают организму хозяина, находящемуся под угрозой, повысить целостность молочного барьера и восстановить сниженное качество молока, вызванное маститом [134]. Преднизолон может связываться с глюкокортикоидным рецептором на клетках и блокировать

выработку провоспалительных цитокинов [129, р. 4407]; что более важно, он может влиять на рекрутирование иммунных клеток в очаги воспаления. Однако преднизолон также ухудшает иммунную систему молочной железы, снижая концентрацию иммуноглобулина G в молоке; поэтому он может оказывать как полезное, так и вредное воздействие на лечение мастита [134, р. 2206]. Уолл и др. обнаружили, что супрафизиологические дозы окситоцина открывают барьер между кровью и молоком и усиливают его открытие во время мастита, вызванного липополисахаридами. Эти результаты означают, что окситоцин индуцирует больший перенос компонента крови в молоко и может быть эффективно использован в тех случаях, когда перенос иммуноглобулина G незначителен или отсутствует.

Обычно это происходит во время субклинических случаев мастита.

Чтобы установить воспаление, патоген должен не только проникнуть в вымя, но и иметь возможность выживать и размножаться, чтобы произвести патогенный эффект [50, р. 367]. Возбудители мастита различаются по своей вирулентности [125, р. 270], так же как животные различаются по своей устойчивости к проникновению микробов в молочную железу и их последующей реакции на преодоление воспаления [126, р. 292].

Значительные потери в производстве молока происходят в результате как клинического, так и субклинического мастита [135].

Даль М.О. [136] обнаружили, что производство молока не улучшается даже после полного выздоровления от субклинического мастита, поэтому экономические потери по-прежнему значительны. Хотя лечение антибиотиками предотвращало прогрессирование субклинического мастита до клинической формы во время лактации, субклиническая форма сохранялась даже после лечения.

А Берри Е.А. [133, р. 409] оценили стоимость среднего случая мастита, поражающего молочную корову с производством 7000 кг молока за лактацию, примерно в 131 фунт стерлингов (198 евро). Эта стоимость включает труд, лечение, лекарства, ветеринарные сборы, выброшенное молоко, потерю производства молока, потребление корма, необходимого для производства выброшенного молока, и случайную летальность от болезни. По мнению Бар Д. [134, р. 2207] эта стоимость была определена как 179 долларов США (162 евро), в то время как Ча Е. [135, р. 4478] сообщили о стоимости 155 долларов США (140 евро), а Даль М.О. [136, р. 10144] сообщили о 148 долларах США (134 евро). Эти цифры в основном зависят от фактической цены на молоко и лекарства, а также от тяжести и продолжительности заболевания. Продолжительность лактации каждого инфицированного животного сокращается примерно на 57 дней в соответствии с Ханом и Ханом [38, р. 206], а Сигерс и др. [41, р. 480] сообщили, что средняя потеря молока составляет 375 кг за лактацию.

На молоко из инфицированной молочной железы влияют многие факторы, в том числе изменения его состава. Потери жира, казеина и лактозы значительны [137-143]. Согласно статистике Национального совета по борьбе с маститом [37, р. 10382], в США потери из-за сокращения производства в

результате мастита плюс затраты на профилактику и борьбу с ним ежегодно превышали 2 миллиарда долларов США, и примерно треть всех коров была поражена.

Существует выраженная разница между потерями молока в случаях клинического и субклинического мастита. Некоторые исследователи не наблюдали существенного влияния на потери молока в случаях субклинической внутримаммарной инфекции, вызванной незначительными патогенами [144-146]. Гонсалвес и др. [141, р. 26] не обнаружили существенных изменений в концентрациях белка или жира между здоровыми коровами и коровами, страдающими субклиническим маститом, вызванным различными патогенами. Было обнаружено, что эти коровы имеют лишь умеренно более высокий SCC, но не оказывают заметного влияния на удой молока. Напротив, клинический мастит может привести к прямым и огромным потерям молока. Безман и др. [9, р. 305] обнаружили, что квартальный удой молока снизился на 20% в случаях мастита *Str. dysgalactiae* и на 50% в случаях мастита *E. coli*.

Молоко, вырабатываемое молочной железой, пораженной клиническим маститом, бесполезно в молочном производстве и должно быть выброшено. Экономические потери из-за выброшенного молока намного больше, чем потери из-за снижения производства молока, поскольку выброшенное молоко производится коровами и, таким образом, понесло связанные с этим затраты на кормление, которые учитываются в убытке.

Это означает, что экономические потери из-за 10 кг выброшенного молока больше, чем потери из-за 10 кг снижения производства молока. Чтобы снизить экономические потери, это отбракованное молоко часто скармливают телятам вместо заменителя молока, но только при определенных условиях молока, и таким образом снижают затраты на заменитель [4, р. 21]. Однако Хейккиля и др. [8, р. 140] сообщили, что снижение производства молока является долгосрочной потерей, поэтому оно приводит к большим финансовым потерям, чем выбрасываемое молоко в краткосрочной перспективе. Согласно Халасе и др. [4, р. 22] и Гуссман М. [142, р. 1483-1492], экономические потери, связанные с маститом, можно разделить на потери, связанные с лечением больных животных, потери, вызванные повышенной смертностью из-за инфекции и выбраковки зараженных животных, и косвенные потери из-за снижения производства молока. Автор Хогевин Х. [143, р. 21] далее разделили экономические потери, разделив экономические затраты на мастит на профилактические и неудачи. Профилактические расходы связаны с ресурсами, необходимыми для поддержания программы профилактики мастита и борьбы с ним для здоровых животных. Затраты на отказ включают ресурсы, необходимые для решения проблем у животных, уже пострадавших от мастита, таких как антибиотики, лечение, ветеринарная работа и т.д. Затраты на отказ согласуются с потерей производства молока, но только несколько авторов [147-151] аналогичным образом классифицировали экономические последствия мастита.

При производстве молока качество должно быть важнее количества. Пищевая промышленность не может перерабатывать молоко с высоким

содержанием SCC или молоко, содержащее остатки антибиотиков. Это означает, что контроль мастита очень важен. Причиной этого повышенного беспокойства является то, что мастит остается самой дорогостоящей медицинской и экономической проблемой в молочной промышленности и что усиливается давление, чтобы избежать использования антибиотиков.

Молочные фермеры должны сосредоточиться на профилактике инфекций мастита при реализации и соблюдении программы борьбы с маститом. Однако реальность часто бывает совершенно иной, и фермеры могут подождать, пока не появится мастит, чтобы начать решать проблему. Хотя программы борьбы с маститом являются ключом к защите от мастита и его профилактике, их успешная реализация зависит от всесторонних знаний фермера и правильной классификации агентов, вызывающих мастит. Определение происхождения и передачи многих патогенов в полевых условиях часто затруднено (например, различие *S. aureus* и *Str. uberis*, которые могут передаваться несколькими способами). Результаты многочисленных исследований различаются даже для основных возбудителей. Тем не менее, распространенность клинических и острых случаев мастита в стаде может быть снижена до минимального уровня благодаря постоянному соблюдению и улучшению гигиенических практик во время доения и надлежащего лечения дойных коров, эффективному ведению сухой терапии коров и разумному лечению коров с субклиническим и хроническим маститом. Кроме того, коровы с постоянно увеличивающимся SCC и без ответа на лечение должны быть отобраны из стада. Последовательные усилия по сокращению использования антибиотиков и применению новых подходов в молочных стадах также могут помочь предотвратить и вылечить это заболевание за счет лучшего понимания связанных с этим факторов окружающей среды и их внедрения в управление молочными стадами. Для этой цели важно разработать новые методы иммунотерапии, которые не предполагают применения антибиотиков. Например, стратегии, направленные на лучшую реализацию потенциала иммунных клеток и использование природных иммуномодуляторов в качестве цитокинов для регуляции воспаления молочной железы.

1.2 Современные методы дезинфекции в животноводстве

Ветеринарное благополучие животноводческих ферм, комплексов и птицефабрик во многом зависит от регулярного и тщательного проведения ветеринарно-санитарных мероприятий. Дезинфекция - важная часть мер, направленных на профилактику и борьбу с инфекционными заболеваниями животных. В большинстве случаев, существующие дезинфицирующие средства и рекомендации по их применению разработаны для крупных товарных и промышленных комплексов, не полностью удовлетворяющих требованиям малых хозяйств. Чаще всего используемые в таких случаях средства токсичны для людей и животных (раствор гидроксида натрия или калия, отбеливатель, фенол и др.), Поэтому их следует использовать осторожно, чтобы предотвратить отравление. В ветеринарной практике практически нет экологически чистых и безопасных средств дезинфекции, которые можно было

бы использовать для санации различных объектов ветеринарного надзора, в том числе в присутствии животных и птицы.

Практика использования дезинфицирующих средств в сельском хозяйстве для стойких химикатов, таких как отбеливатель, перекись водорода, формальдегид и некоторые другие, оказалась во многих отношениях непригодной. Прежде всего, это биологическая вредоносность, невозможность проводить дезинфекцию в присутствии животных и птицы, адаптацию патогенной микрофлоры, дороговизну, высокую сложность обработки объектов, засорение внешней среды и др. Большинство современных малотоксичных дезинфицирующих средств используются в виде растворов по орошение или аэрозоли, но использование их в помещениях в присутствии животных невозможно. Использование этих средств также относительно трудоемко, сильно увеличивает влажность в помещении, и есть вероятность накопления их остаточных количеств в мясе.

Интенсивное использование дезинфицирующих средств в условиях воспроизводства животных привело к появлению микроорганизмов, обладающих высокими резистентными свойствами, устойчивыми даже к сильным дезинфектантам.

Для того чтобы снизить распространение заболеваний и удерживать качество выпускаемой продукции на должном уровне, предприятия вынуждены применять более сильные дезинфицирующие и моющие средства при обеззараживании животноводческих помещений, а через некоторое время менять их на новые.

В конце прошлого века начата разработка экологически безопасных технологии очистки и стабилизации микрофлоры при воспроизводстве животных в результате которой появились технологии на основе пробиотиков [152, 153].

В настоящее время во всем мире, включая и нашу страну, усиленно ведется поиск альтернативных путей замены и снижение применения дезинфектантов для объектов ветеринарного надзора.

Одним из реальных направлений являются пробиотики. Они представляют собой биомассу бактерий в вегетативной или споровой форме с четко выраженной антагонистической активностью к патогенной и условно патогенной микрофлоре. Пробиотики нацелены на создание здоровой и стабильной микрофлоры, противопоставленной среде неестественной абсолютной стерильности [154].

Пробиотики оказывают благоприятное действие на организм, как животного, так и человека [155, 156].

При применение препаратов на основе пробиотиков, санирующий эффект достигается колонизацией обрабатываемых поверхностей культурами пробиотических бактерий, которые, создавая новый микробиоценоз, подавляют развитие патогенной микрофлоры по принципу антагонизма, конкурируя за пищу и среду обитания [157, 158].

Наряду с этим, полная ветеринарно-санитарная оценка продукции животноводства проводится не всегда. Имеются сообщения о том, что

отдельные антибактериальные и дезинфицирующие препараты могут накапливаться в продуктах животноводства и отрицательно влиять на качество выпускаемой продукции [159, 161].

Тогда как биологические препараты на основе пробиотических культур не накапливаются в продуктах и способствуют лишь увеличению выхода мяса и субпродуктов.

А.А. Поляков, Т.В. Кирюткин, А.А. Рогов указывают, что ликвидация инфекции не может быть решена только применением биопрепаратов (вакцин, сывороток), создающих у животных лишь временную невосприимчивость. Поэтому борьба с заразными болезнями животных должна вестись в комплексе с ветеринарно-санитарными и карантинными мероприятиями. При этом основное внимание уделяется на уничтожение выделяемого во внешнюю среду возбудителя и охране стад от заноса инфекции [162].

Отдельные авторы (Вашков В.И. Современное состояние вопросов дезинфекции отмечают, что в условиях животноводческих ферм и промышленных комплексов возрастает значение и роль дезинфекции, как основного звена в системе ветеринарно-санитарных мероприятий и что она должна стать составной частью технологии производства и органически вписаться в неё.

Одна из основных задач развития сельскохозяйственного предприятия - забота о биобезопасности хозяйства, защита животных от опасных и патогенных микроорганизмов. Успех проведения комплекса профилактических мероприятий, направленных на уничтожение патогенных микроорганизмов, зависит от выяснения всех возможных источников проникновения инфекции, использования эффективных средств защиты, гигиенической подготовки помещения и дезинфекции [163].

Несмотря на имеющиеся успехи современной ветеринарной санитарии, ученые ведут интенсивный поиск новых дезинфицирующих средств, создают новые композиции и разрабатывают способы их применения.

Для разработки эффективных дезинфектантов успешно применяется направление по созданию композиционных средств на основе существующих дезинфектантов и четвертичных аммониевых соединений, обладающих поверхностно-активными свойствами [164-166].

Требования к современным дезинфектантам довольно жесткие и им не соответствуют некоторые монокомпонентные дезинфицирующие средства. Наиболее эффективными признаны комбинированные дезсредства, при правильном использовании которых, опасность возникновения устойчивости микроорганизмов к данным дезсредствам является практически невозможной, что нельзя сказать о применении средств, содержащих одно действующее вещество [167].

По химической структуре современные дезинфектанты подразделяются на следующие разновидности - галогены, фенолы, перекиси, спирты, альдегиды, бигуанидины, амфозиды и четвертичные аммониевые соединения.

В последние годы прошли апробацию и рекомендованы для использования в ветеринарии, в том числе и для свиноводческих предприятий,

наиболее эффективные отечественные средства дезинфекции: дезкантен, йодез, абсолюцид-вет, кальций гипохлорит нейтральный, аламинол, «Биопаг-Д», а также для аэрозольной дезинфекции дезинфицирующая композиция «Пемос-1» и другие средства.

Во всех развитых странах предпочтение отдают катионным ПАВ, диальдегидам, производным гуанидина, перекисным соединениям и комбинированным препаратам на их основе. Об этом свидетельствуют характеристики препаратов производства зарубежных фирм, зарегистрированных в последние годы в Казахстане [168].

Таким образом, проблема обеспечения ветеринарной службы дезинфицирующими средствами, обладающими широкими спектрами действия, является довольно острой. Особое значение данная проблема приобретает при инфекционных болезнях общих для человека и животных, как бруцеллез, туберкулез, сибирская язва и т.д. Микобактерии туберкулеза по сравнению с другими неспорообразующими бактериями более устойчивы к химическим веществам за счет наличия высокого содержания липипротейдов. На наш взгляд, особую актуальность имеют композиционные препараты при дезинфекции крупных животноводческих комплексов и птицефабрик, а также цехов переработки продуктов животноводства. Одним из перспективных способов дезинфекции помещений является аэрозольная, препаратами широкого спектра действия, обеззараживающая возбудители болезней передающихся аэрогенным путем. Немаловажное значение отводится и физическим методам дезинфекции с использованием ультрафиолетовых лучей в присутствии животных, тем самым значительно понижается патогенная и условно-патогенная микрофлора в помещении животных.

Традиционные химические дезинфицирующие средства, используемые в процедурах очистки в животноводческих хозяйствах, имеют ряд недостатков, таких как ограниченное во времени действие биоцидов, быстрое бактериальное повторное загрязнение обработанных поверхностей, развитие множественной лекарственной устойчивости микроорганизмов, загрязнение окружающей среды и потенциальное возникновение химической чувствительности у пациентов, рабочей силы и уборщиков. Согласно недавним экспериментальным исследованиям, методы очистки, основанные на микробной биостабилизации с использованием продуктов на основе пробиотиков, являются перспективными.

1.2.1 Действие химических дезинфицирующих средств на микробные клетки

Бактериальная безопасность является одним из ключевых факторов эффективной профилактики инфекционных заболеваний животных и птиц, который играет существенную роль [169].

Дезинфекция определяется как комплекс мероприятий, направленных на уничтожение инфекционных агентов с целью предотвращения распространения инфекции [138, р. 600; 170, 172]. Основной целью этих мероприятий является разрыв эпизоотической цепи путем воздействия на ее важнейшее звено –

факторы передачи возбудителя от источника инфекции к восприимчивому организму [173-176].

В связи с этим необходимы эффективные и безопасные дезинфицирующие средства для предотвращения или, по крайней мере, уменьшения накопления микрофлоры в животноводческих и птичниках [177, 178].

Устойчивость патогенных бактерий к воздействию дезинфицирующих средств зависит от характеристик используемого химического вещества (концентрация, продолжительность и т.д.) и в значительной степени от различий в ультраструктурной организации бактерий [179].

Устойчивость бактериальных клеток зависит от типа микроорганизмов, особенностей строения и проницаемости клеточных стенок, стадии их развития, количества липидов, защищающих их от неблагоприятного воздействия многих химических факторов [180-182]. Форма спор или образование капсулы у бактерий способствуют повышению устойчивости микробных клеток к действию химических агентов, в то время как вегетативные формы клеток вредны и обладают низкой токсичностью химических веществ.

Суть воздействия бактерицидов на микроорганизмы сводится к различного рода реакциям между организмом и химическим веществом. Однако разрушение патогена химическим дезинфицирующим средством в первую очередь связано с реакциями, которые происходят между дезинфицирующим средством и белком микроорганизма.

Химическое дезинфицирующее средство, находящееся в растворе, при контакте с микробной клеткой либо адсорбируется ею, либо проникает в нее, а затем в некоторой степени соединяется с веществами, составляющими клетку. На скорость проникновения химического вещества влияет большая или меньшая способность к диссоциации: чем раньше и полнее диссоциируется химическое вещество, тем быстрее оно проникает в цитоплазму и тем сильнее его разрушительное действие [180, р. 717].

Дезинфицирующие средства различны по своей химической природе, и, проникая в клетки, они оказывают различное избирательное действие. Наблюдения многих авторов по-разному объясняют механизм действия дезинфицирующих средств на микроорганизмы. Исследования показали, что определенные группы базовых дезинфицирующих средств оказывают различное воздействие на микробные клетки [182, р. 3306-3310]. Таким образом, окислители (хлор, продукты хлора, перекись водорода) вступают в реакцию с белками клетки, вызывая реакцию окисления. Минеральные кислоты и щелочи, действующие совместно с ионами водорода и гидроксидом, вызывают гидролиз. Фенольные препараты вызывают реакцию свертывания клеточных белков. Эта схематичная концепция функционирования не объясняет все сложные способы воздействия на микробную клетку, например, влияние дезинфицирующих средств на ферментативную активность (дыхание, питание, рост и т.д.).

Анализ механизмов функционирования дезинфицирующих средств на микробной клетке является необходимым условием для разработки и совершенствования новых режимов дезинфекции [183].

Основой этих исследований послужили исследования Павловой И.Б. в 1966-1999 годах и Куликовского А.В. в 1969-1989 годах ультратонких срезов клеток патогенных бактерий под воздействием дезинфицирующих средств методом просвечивающей электронной микроскопии. Этот метод позволяет изучить влияние препаратов на определенные структуры выделенной бактериальной клетки.

Электронно-микроскопический анализ патогенных микроорганизмов для животных и птиц позволил получить четкое представление об их строении. Так, по данным И.Б. Павловой и др., грамотрицательные микроорганизмы (возбудители колибактериоза, сальмонеллеза, бруцеллеза и др.) имеют трехслойную клеточную стенку, расположенную под ней цитоплазматическую мембрану, зернистую цитоплазму и тонко-фибрилярный нуклеотид. Эти бактерии делятся простым расщеплением. Установлено, что клеточная стенка грамотрицательных микроорганизмов составляет 6-9% сухой клеточной массы и состоит из большого количества липопротеинов (до 80%), 20-40% из них составляют липосахариды и фосфолипиды.

Грамположительные микроорганизмы (стафилококки, стрептококки, возбудители листериоза, рожи свиней и др.) обычно имеют однородную, более толстую клеточную стенку, чем грамотрицательные. На поверхности можно наблюдать капсульный элемент. В цитоплазме бактерий имеются хорошо развитые комплексы мембранных структур, и клетки делятся, образуя поперечную перегородку. Клеточная стенка грамположительных микроорганизмов составляет 20% сухой клеточной массы и состоит в основном из мукопептидов (до 50%) [184, 185].

Хлорные вещества – активные вещества с широким спектром бактерицидного и вирулицидного действия, хорошо растворяются в воде, но они агрессивны к обрабатываемым поверхностям и быстро теряют свои активные свойства при хранении и использовании, поэтому, как правило, их используют только один раз [186]. Хлорсодержащие препараты включают: хлор, хлорную известь, хлорамин, гипохлориты и другие. Они являются сильными окислителями. Окисление является одним из важнейших химических методов повреждающего воздействия на микробные клетки. Когда хлор вступает в контакт с влагой, содержащейся в микробной клетке, образуются соляная и хлорная кислоты. Выделяющийся таким образом кислород окисляет клеточные компоненты [187].

Йод известен как одно из самых распространенных дезинфицирующих средств. Среди всех соединений йода комплекс йода с носителем наиболее широко используется для дезинфекции, например, комплекс с поливинилпирролидоном или этоксилированными неионными моющими средствами, которые могут быть представлены в виде резервуара постоянно выделяемого молекулярного йода. Точный механизм антимикробной активности йода до сих пор не изучен. Предполагается, что он вступает в

реакцию с аминокислотами и жирными кислотами, разрушая клеточные структуры и ферменты [184, р. 19; 188]. Препараты йода обладают выраженным антибактериальным, противовирусным и противогрибковым действием, но не обладают достаточной активностью в отношении спор бактерий.

Альдегиды широко используются для дезинфекции помещений для скота и птицы [189]. Основным известным представителем альдегидов является формальдегид с выраженными антимикробными свойствами, в том числе активностью в отношении всех видов микроорганизмов за счет алкилирования amino и сульфгидрильных групп белков и подавления синтеза последних. Более полувека с момента первых открытий и до сегодняшнего дня большинство современных ферм продолжают использовать формальдегид для подавляющего большинства мероприятий, связанных с дезинфекцией. Конечно, это трудно переоценить дезинфицирующая сила формалина. Это действительно мощный и эффективный метод дезинфекции [190].

Растворы формальдегида оказывают пагубное воздействие на споровые формы микробов, а также на неспорообразующие микроорганизмы, вирусы и грибы. Споры сибирской язвы при воздействии 1% раствора формальдегида погибают через 24 часа, 3% - через 5 часов, 5% - через 3 часа. [191].

Механизм действия щелочей во многом зависит от объекта и свойств среды, в которой находится объект. Протоплазма живых клеток под воздействием щелочей претерпевает значительные изменения из-за увеличения рН среды: гидролизуются белки, образуются коллоидные частицы, жиры омыляются, а углеводы расщепляются. Таким образом, бактерицидная активность щелочей зависит от группы ионов, например, большая часть ионов гидроксида натрия взаимодействует с клеткой мембраны, и в связи с тем, что мембрана содержит 22% липидов [192], здесь происходит омыление жира, которое проявляется в разрушении клеточной стенки [193].

При вредном воздействии кислот на бактериальную клетку *E. coli* и *St. aureus* поверхностные структуры разрушаются, и содержимое клетки высвобождается. Проникновение ионов Н кислоты в клетку осуществляется по типу диффузии иона, связывающегося с клеточной стенкой, но эта связывающая способность уменьшается с уменьшением рН, в связи с этим активируется аутолитическая способность клетки. Это приводит к “размазыванию” рибосом цитоплазмы [194].

Кислородсодержащие продукты, в частности перекись водорода, являются сильными окислителями, которые образуют свободные радикалы, повреждающие липидные клеточные мембраны, ДНК и другие важные компоненты микробных клеток.

Несмотря на выработку многими микроорганизмами каталазы, которая защищает клетки от воздействия перекиси водорода путем разложения на воду и кислород, концентрации H_2O_2 , используемые при дезинфекции, позволяют в большинстве случаев преодолеть этот механизм резистентности. Однако в его высоких концентрациях в рамках такие положительные качества, как широкий спектр активности, в том числе споры бактерий, способность растворять биологические вещества, отсутствие запаха, быстрое разложение на

нетоксичные продукты во внешней среде, есть и некоторые отрицательные качества-высокая тканевая токсичность (II класс) с выраженным местным раздражающим действием. При использовании перекиси необходимо четко следовать инструкции по их применению, так как они очень агрессивны в высоких концентрациях [195].

При изучении ультраструктуры клеток *S. typhimurium*, подвергнутых воздействию перекиси водорода, было установлено, что вещество вызывает значительное разрушение наружной мембраны клеточной стенки, цитоплазматической мембраны и рибосом. Воздействие перекиси водорода на *S. aureus* в первые минуты вызывает увеличение объема клетки за счет активной подачи активированного кислорода и воды, что приводит к гидратации и увеличению объема бактериальной клетки. При дальнейшем контакте перекиси водорода с в бактериальных клетках наблюдается локальное нарушение целостности клеточной стенки, цитоплазматической мембраны и рибосом. Основным механизмом действия перекиси водорода на грамотрицательные и грамположительные бактерии, приводящим к инактивации, является воздействие активированного кислорода, который, взаимодействуя с липидами и липопротеинами, индуцирует образование токсичных пероксидов, вызывающих окисление и разрушение структуры мембран и клеточных белков [196].

Естественной реакцией бактериальной популяции на воздействие абиотических факторов является разрушение межклеточного матрикса и покровов в колониях, нарушение целостности клеточных стенок, что приводит к гетероморфизму клеток с проявлениями L-трансформации и образованию стабильных или нестабильных L-форм. Изучение структурных и функциональных изменений бактериальных клеток и биохимических свойств способствует целенаправленной разработке новых антибактериальных препаратов, а также научному обоснованию их применения [197].

В настоящее время наиболее эффективными антибактериальными свойствами обладают вещества, вызывающие разрушение поверхностных структур клеток, а также вещества, нарушающие структуру рибосом и ДНК. Эти вещества можно отнести в первую очередь к составу на основе поверхностно-активных веществ (ПАВ), которые буквально “раздевают” бактериальные клетки в популяции, делая их наиболее уязвимыми к любым воздействиям. Дальнейшее воздействие на популяцию бактериальных клеток зависит от эффективного начала в составе дезинфицирующего средства, концентрации, времени действия и т.д. Отличительными свойствами поверхностно-активных веществ являются их минимальная агрессивность и токсичность, а также достаточно выраженная бактерицидная, вирулицидная и фунгицидная активность [198].

Поверхностно-активные вещества делятся на катионные, анионные, амфолитические и неионные. Только катионные и амфолитические [199] используются в качестве дезинфицирующих средств. Катионными поверхностно-активными веществами являются четвертичные аммониевые соединения (QAC). Воздействие QAC на восприимчивые бактериальные клетки

происходит в несколько этапов: адсорбция молекул QAC на компоненты клеточной стенки и проникновение через нее; взаимодействие с фосфолипидами цитоплазматической мембраны с последующим его разрушением; высвобождение внутриклеточных низкомолекулярных веществ; белок и нуклеиновая кислота деградиация; лизис клеточной стенки, вызванный аутолитическими ферментами [200]. Суббактерицидные концентрации QAC вызывают менее глубокие изменения в структуре макромолекул цитоплазматической мембраны, что проявляется в нарушении ее функций (повышение проницаемости, изменение осмотического давления, нарушение транспорта через мембрану молекул и ионов, ингибирование метаболических процессов и биологического окисления, ингибирование клеточного деления, регулируемого мезосомами).

1.2.2 Пробиотические чистящие средства для поверхностей как возможная альтернатива традиционным дезинфектантам

Известно, что любые поверхности окружающей среды в животноводческих помещениях и не только являются резервуаром для микроорганизмов и способствуют передаче патогенов, увеличивая риск перекрестного загрязнения через опосредованный контакт. Широкое и не всегда рациональное использование химических дезинфицирующих средств несет риски для безопасности окружающей среды, пациента и медицинского персонала. В связи с этим актуальным остается поиск альтернативных методов очистки и обеззараживания абиотических поверхностей в учреждениях здравоохранения. Тестировали средство для очистки помещений, содержащее 3 штамма бактерий рода *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*.

Средство для очистки помещений на основе пробиотиков – бактерий рода *Bacillus* – сдерживает рост санитарно-показательных микроорганизмов по сравнению с контролем. Таким образом, средства пробиотической очистки не обладают биоцидным действием, но, контаминируя поверхности, они подавляют рост и распространение условно-патогенных бактерий.

В настоящее время существует понятие пробиотики как альтернатива антибиотикам. Потому что нет никаких сомнений в том, что антибиотики, используемые в качестве лечения или стимулятора роста человечества, имеют побочные эффекты. В ходе хаотического применения антибиотиков у микроорганизмов сформировалась устойчивость к большинству антибиотиков, кроме того, остатки антибиотиков в продуктах животного происхождения сохраняются длительное время и оказывают негативное влияние на организм человека. Кроме того, антибиотики убивают в организме все микробы, в том числе полезные и вредные, из-за чего в организме развиваются различные заболевания [201].

Однако в жизни нет человека, который не принимал антибиотик. Антибиотики, открытые в 40-х годах прошлого столетия, использовались для лечения многих заболеваний. Но антибиотик не совсем безвреден для жизни человека, как думают многие. У них очень много побочных эффектов. Осложнения от всех антибиотиков приводят к дисбактериозу. Возникает

вопрос, в чем причина? Само слово Антибиотик состоит из двух латинских слов: "анти" – против, а "биос" – против жизни, то есть против жизни бактерий, вызывающих болезни. Но болезни не отличаются по строению вызывающими микроорганизмами и обычными микроорганизмами. Поэтому антибиотик убивает как болезнетворный микроб, так и микроорганизмы нормальной микрофлоры. В результате в желудочно-кишечном тракте развивается дисбактериоз, происходят функциональные изменения в органах и системах человека и животных.

В связи с этой проблемой выявляется важность применения пробиотиков вместо антибиотиков. В настоящее время публикуется достаточно много данных об использовании пробиотиков при борьбе с различными инфекциями вместо малоэффективных антибиотиков. Потому что пробиотики не имеют побочных эффектов на организм. В связи с этим большое значение имеет переход на пробиотики, обладающие хорошими свойствами антибиотиков, но не оказывающие никакого патологического действия [202].

Применение пробиотиков с конца XX века для борьбы с различными вредными бактериями вместо многих антибиотиков с низкой эффективностью находит широкое применение.

Штаммы для включения в состав препарата отбирают по многим свойствам: способность к ингибированию патогенных и условно-патогенных кишечных палочек, образование микробной биомассы в короткие сроки при культивировании, продолжительность колонизации в желудочно-кишечном тракте, устойчивость к низким показателям рН и высоким концентрациям желчи, фенола, способность к кислотообразованию и свертыванию молока, устойчивость к антибиотикам.

Только некоторые штаммы молочнокислых бактерий могут отвечать этим высоким требованиям. В связи с этим очевидно, что в настоящее время в производстве ограничено количество перспективных штаммов молочнокислых бактерий, используемых в лечебных целях.

По мнению В.М. Бондаренко, биопрепараты, благотворно влияющие на нормальную микрофлору, следует разделить на три группы: пробиотики, пребиотики и синбиотики.

Пробиотики по сравнению с антибиотиками не являются продуктом определенных метаболических процессов микроорганизмов и не имеют определенного спектра действия [203].

Пробиотики включают порошок бифидумбактерин, Бифидумбактерин форте и бифилиз. Их действующее вещество – бифидобактерии, которые проявляют антагонистическую активность к болезнетворным бактериям, вырабатывают кислоты, ферменты, витамины. Эти препараты формируют внутри-строительную деятельность организма, улучшают обменные процессы, повышают неспецифическую резистентность организма.

Пробиотики представляют собой высушенные или живые клеточные молочнокислые бактерии. Они регулируют и усиливают работу иммунной системы в организме. В связи с этим пробиотики нашли применение в медицинской и ветеринарной практике как при нарушениях пищеварительной

системы, так и в процессе алиментарного расстройства желудка [204].

Пробиотики не только формируют кишечную флору, но и корректируют усвоение организмом пищи, улучшают усвояемость.

Пребиотики не относятся к числу микробных препаратов. Они влияют на формирование микрофлоры кишечника, проявляя метаболическую активность в организме человека, животных. В эту группу входят такие препараты, как хилак-форте, лактулоза, лизоцим. Например, лактулоза (синтетический дисахарид) снижает кислотность (рН) жидкости в полости толстой кишки, уменьшает объем гнилостных бактерий, регулирует кишечные сокращения (перистальтику) и ускоряет рост и размножение в ней бифидо- и лактобактерий. А лизоцим формирует состав нарушенной микрофлоры, подавляет рост патогенных микробов.

Синбиотики препараты из комбинации пребиотиков с пробиотиками. Обычно это биологически активные соединения, обогащенные штаммами *Lactobacillus* или *Bifidobacterium*, которые добавляются в состав корма. В России выпускается три препарата: биовестинлакто, мальтидофилюс и бифидобак [205].

Наряду с синбиотиками широко применяются еще биологически активные добавки (БАДы) – пробиотические продукты смешанного состава- пробиотические комплексы, а также мультиштамм, с различными пробиотическими веществами – «синбиотики». Действие синбиотиков основано на синергизме пробиотических и пребиотических смесей хозяина не только на основе микроорганизмов, введенных в ЖКТ, но и посредством стимуляции собственной микрофлоры.

Синбиотики могут включать пищевые волокна, иммуномодуляторы, ферменты, микроэлементы, растительные добавки. Список этих препаратов растет. С целью производства эубиотиков - препарата, богатого компонентами пролиферации бифидобактерий и повышающего иммунную резистентность организма, работают многие российские микробиологи. Например, препарат «Бифилиз» («Вигэл»), в котором сбалансирован состав живых бифидобактерий и лизоцима. Входящий в состав препаратов лизоцим улучшает адгезионные свойства бифидо – и лактобактеринов в организме, проявляет другие биологические свойства – иммуномодулирующие, антианемические, стимуляции регенерации. Лизоцим имеет более высокий бифилиз, чем Бифидобактерин: кишечный микробиоценоз устойчиво улучшает аэробное и анаэробное состояние, обрабатывает местные иммунные факторы, формирует структуру и функцию слизистой оболочки ЖКТ [206].

Ветеринарные исследования также показывают важность использования пробиотиков при заболеваниях животных. Бактериальное соединение, полученное в сортировке, вступая в контакт с микрофлорой в пищеварительной системе животного, улучшает его физиологическую функцию и усиливает сопротивляемость организма к болезням. Но, чтобы определить конкретные способы применения пробиотиков в ветеринарной практике, необходимо провести множество дополнительных исследований.

В последние годы проблема получения пробиотиков, содержащих бифидо

- и лактобактерии, привлекает многих исследователей.

Требования, предъявляемые к этому, должны быть направлены на то, чтобы действие вновь полученных пробиотиков вытесняло патогенные бактерии из состава биоценоза кишечника конкурентным (конкурентным) путем и подавляло их патогенный фактор.

Это связано с такими биологическими свойствами молочнокислых бактерий, как антагонистичность, кислотность, ускорение иммунитета.

Сообщается, что в последующие годы среди скота чаще регистрируются заболевания пищеварительной системы. Как правило, заболевания кишечника вызваны нарушением регуляторного процесса самих организмов, формирующих кишечный биоценоз, изменением патогенных элементов, повышением токсичности патогенной микрофлоры, повышением переносимости возбудителей применяемых лекарственных средств и другими факторами. При этом основной причиной смертности среди молодняка является нарушение функции пищеварительной системы.

Многие ученые считают, что пробиотики оздоравливают кишечник, регулируют формирование бактерий по всему кишечнику, улучшают пищеварительный процесс, очищают слизистую оболочку кишечника и увеличивают количество иммунных клеток в крови. Их совместное применение с антибиотиками или другими лекарствами позволяет в кратчайшие сроки излечить заболевший молодняк.

Некоторые исследователи считают, что вытеснение пробиотиками патогенных бактерий не только в конкурентном свойстве. Конкурентные свойства бактерий, некоторых дрожжей (дрожжей) препятствуют проникновению патогенных микробов в эпителиальные клетки кишечника, в результате чего кишечная полость, особенно тонкая кишка, сохраняет чистоту от патогенных элементов, печень избавляется от белково-метаболических продуктов бактерий, плохо растворимые соли превращаются в растворимые соли.

Tuomola E., Crittendent R.L. анализируя значение адгезии для микроорганизмов, считают, что *Lactobacillus acidophilus* вступает в полезные конкурентные и кооперативные реакции с патогенными микроорганизмами в пищеварительном тракте. Предполагают, что они проявляют активное преобладание над патогенными факторами и вырабатывают ингибирующие вещества, бактериоцины [207].

Цель применения пробиотиков-формирование нарушенного баланса микроорганизмов, находящихся в слизистых оболочках организма человека и животных, то есть пробиотики направлены на лечение и профилактику любого заболевания, характеризующегося дисбактериозом.

В организме человека очень много микроорганизмов (например, на 1 см³ кишечника приходится до 10¹² микроорганизмов). Места их обитания:

– слизистые оболочки организма, универсальные микроорганизмы прилипают только к определенным рецепторам. Количество таких рецепторов ограничено, поэтому микроорганизмы, попавшие в организм вместе с пробиотиком, оседают только на свободных рецепторах. Остальные

микроорганизмы попадают в эпителий кишечника, не успев застрять, кишечник остается в полости и через некоторое время отделяется от организма. Из-за этого при приеме пробиотика не происходит превышения дозы.

Пробиотики повышают иммунную систему независимо от того, какова причина иммунодефицита. Кроме того, пробиотики в разной степени повышают иммунную систему, которая регулирует как местный иммунитет слизистых оболочек, так и общий гуморальный иммунитет. Бактерии, содержащиеся в пробиотике, содержат ферменты ДНК-аза и РНК-аза, которые борются с вирусами.

Полезность бифидо-и лактобактерий в составе пробиотика для организма обусловлена такими свойствами:

- образует в организме следующие витамины: В1, В2, В5, В6, В12, РР, К, С, Н, а также обеспечивает усвоение витаминов D, Е и микро-и макроэлементов (железо, кальций, йод, селен;

- влияет на расщепление и усвоение 80-90% белков, углеводов, поступающих с пищей и кормами;

- образует уксусную, молочную, муравьиную и жирные кислоты, влияющие на синтез креатинина и АТФ, благодаря чему энергия, необходимая мышцам, накапливается и накапливается;

- выводит из организма болезнетворные и ядовитые вещества, т. е. выполняет функцию " второй печени;

- защищает организм от бактериальных и вирусных инфекций, усиливает защитные факторы иммунной системы [208].

Пробиотики, наряду с вышеперечисленными, необходимы в следующих случаях: различные нарушения функций желудочно-кишечного тракта (метеоризм, изжога желудка, диарея, запор, ферментативная недостаточность, атония кишечника, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, послеоперационные заболевания органов брюшной полости, постинфекционное состояние кишечника, рецидивные инфекции мочевыводящих и половых путей, частые заболевания бронхов и легких рецидивирующие инфекции, различные заболевания, устойчивые к антибиотикотерапии, ревматические заболевания, остеопороз, беременность, психические стрессы, хроническая усталость, стрессы) [209].

Все ждали новшества на пути борьбы с инфекционными заболеваниями в жизни человечества. Такая необходимость вызвана разрывом жизней миллионов людей из-за различных инфекционных заболеваний. В связи с этим открытие пенициллина А. Флемингом стало большим открытием на мировом уровне. Пенициллин стал известен на всем континенте и спас миллионы жизней. Новшеством Флеминга стало открытие нового научного направления, эра пенициллина в биологии и медицине.

В дальнейшем возникла проблема развития резистентных к антибиотикам форм патогенных микроорганизмов и снижения эффективности многих антибиотиков. В сведениях американских ученых об этом говорится, что если люди поражены антибиотикоустойчивыми микроорганизмами, заболевание протекает очень тяжело или заканчивается летальным исходом. Борьба с

такой ситуацией очень дорого. Например, лечение человека, пораженного антибиотикоустойчивой микобактерией, в 15 раз больше, чем борьба с чувствительным микроорганизмом. Тогда возникает вопрос, Что делать. В отличие от результатов исследований, многие антибиотики не нужны больным людям, так как люди часто дают эти препараты при простудных заболеваниях, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, повышенной температуре. Под его влиянием микроорганизмы проявляют устойчивость к ним [210].

Во-вторых, врачи спешат лечить антибиотиками широкого спектра действия с высокой эффективностью, при каком бы заболевании они ни находились. Вместо этого было бы не так, если бы он определил чувствительность возбудителя к антибиотику и использовал бы предыдущие антибиотики.

В связи с этими обстоятельствами в медицине и ветеринарной практике возникла проблема выпуска альтернативных безопасных для организма препаратов. Очевидно, что с этой точки зрения никто не может отрицать важность пробиотиков [211].

1.2.3 Механизмы действия пробиотиков на организм человека и животных

На сегодняшний день пробиотиками являются лекарственные препараты, БАДы и пищевые продукты, содержащие живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, которые при естественном введении оказывают положительное влияние на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма путем стабилизации и оптимизации его нормальной микрофлоры и обменных процессов.

Первым и наиболее известным эффектом действия пробиотиков является нормализация состояния микрофлоры кишечника, которая характеризуется стимуляцией роста «полезных» микроорганизмов и торможением роста условно-патогенной флоры. В основе этого действия пробиотиков лежат различные механизмы, среди которых, прежде всего, следует определить способность энтероцитов конкурировать с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами из мест их контакта с рецепторами. Участие симбионтных микроорганизмов в азотистом (белковом) питании является одной из их основных функций. В результате сложных биохимических процессов, протекающих в желудочно-кишечном тракте хозяина, микроорганизмы поглощают поступающие питательные вещества, размножаются, растут и быстро увеличивают свою биомассу. Они перевариваются и усваиваются организмом, являясь источником белка. Симбионтная флора благодаря ферментативной активности (амилолитическая, протеолитическая, целлюлозолитическая и др.) способна синтезировать множество биологически активных веществ: органические кислоты, спирты, липиды, витамины, соединения тетрапирольной структуры.

Всасываясь в кровоток, многие из них активно участвуют в энергетическом и витаминном обменах, играют важную роль в жизнеобеспечении организма. Органические кислоты усиливают перистальтику

и кишечную секрецию, что способствует перевариванию пищи и повышает резорбцию кальция и железа. Полифосфаты бактерий участвуют в замене сахара клеткой, выполняя функцию гексокиназы. Кроме того, симбионты способны синтезировать метаболиты, обладающие антитоксическим действием. Пробиотическая микрофлора участвует в инактивации избытка некоторых пищеварительных ферментов, детоксикации отдельных эндогенных и экзогенных веществ.

Пробиотические микроорганизмы могут конкурировать с условно-патогенными микроорганизмами за нутриенты, необходимые для их роста. Антибактериальная активность симбионтов производство спиртов, перекиси водорода, молочной, уксусной и других органических кислот, благодаря способности синтезировать лизоцим и антибиотики широкого спектра действия (лактолин, низин, ацдофилин, лактоцид и др.). Они могут ингибировать рост других видов за счет высоких биологических условий, быстрого размножения, короткой lag - фазы, изменения рН или окислительно-восстановительного состояния среды. Другое важное защитное действие пробиотиков происходит за счет способности улучшать состояние кишечного эпителия путем стимуляции образования защитного слоя Муцинов (в частности, за счет индукции экспрессии генов образования кишечного муцина), а также за счет способности пробиотиков восстанавливать нарушенную проницаемость эпителия. Пробиотики способны модулировать иммунный ответ.

Исследования ученых выявили механизмы действия пробиотических микроорганизмов на иммунную систему животных. При подаче пробиотиков у животных наблюдается повышение иммунологической реактивности организма. Под их действием происходит стимуляция лимфоидного аппарата, усиление функциональной активности цитокиновых продуктов и *m* - и *v*-лимфоцитов, синтез иммуноглобулинов, повышение уровня комплемента, повышение активности лизоцима и снижение проницаемости сосудистых тканевых барьеров для токсических продуктов, интенсивность фагоцитоза и повышение бактериоцидной активности крови. Активизация иммунных процессов способствует уничтожению атипичных клеток организма [212].

О пользе пробиотиков для здоровья, о том, что различные продукты, содержащие живые бактерии, имеют место на постоянном рынке, а также о том, что пробиотики-это организмы с определенными группами автохтонных микроорганизмов, которые научно подтверждают эффективные механизмы жизнедеятельности животных, доказано во многих публикациях. Хотя большинство бактерий, обладающих пробиотическими свойствами, являются представителями семейства *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, в этом качестве часто используются и спорообразующие бактерии рода *Bacillus*. Российские ученые на сегодняшний день заявляют около 25 видов препаратов на основе *Bacillus* и других спорных микробов, и часть из них используется для нужд медицины и ветеринарии (бактиспорин, споробактерин, ветом, субалин, коредон, витаспорин, споровит, интестевит, биокормит, бацилоспорин, субтилис, сахабактисуптил, целлобактерин, эндобактерин, споролактин, споролакт и др.). Кроме того, известно, что спорообразующие бактерии

используются в качестве пробиотиков реже и с большими ограничениями, чем лакто- и бифидобактерии [213].

1.2.4 Роль пробиотиков и пробиотических продуктов в ветеринарии

Биопрепараты, обладающие пробиотическим действием и их легализация в республике. Термин «пробиотики» означает «для жизни» (в отличие от термина «антибиотики» означает «против жизни»). По определению многих авторов, пробиотики-это живые микроорганизмы, в высокой степени, распространяющиеся в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), ферментированные (культивируемые) ими продукты, оказывающие благоприятное воздействие на здоровье человека и животных.

Торможение процесса старения организма и оздоровление людей путем добавления в рацион кисломолочных продуктов, особенно йогурта, было предложено 100 лет назад русским микробиологом И.И. Мечниковым. По его мнению, элиминация гнилой микрофлоры из кишечника с помощью микроорганизмов кислого молока с повышенной антагонистической активностью и прекращение всасывания их токсинного метаболизма в кровь увеличивают продолжительность жизни человека. В 1920-1922 годах в Америке начала реализовываться практика использования лактофильных лактобациллов в терапевтических целях. Исследователи приступили к изучению этих вопросов еще в 50-х годах.

Термин «пробиотики» впервые был использован R. Parker в 1974 году для обозначения живых микроорганизмов, которые были введены в качестве питания для животных с целью стимулирования роста и стрессоустойчивости. Позже (в 1989 году), P. Fuller сформулировал это понимание как «дополнение к питанию, содержащему живые микроорганизмы, которые благоприятно воздействуют на организм животных путем оздоровления микрофлоры кишечника». Данное определение широко распространено в виде совокупности понятий, объединяющих живые микроорганизмы, улучшающие качество жизни хозяина и попадающие в ЖКТ за счет формирования микробной экологической системы [214].

Многие специалисты и исследователи относят к бактериям-пробиотикам в основном эубиотики (показывающие нормальную микрофлору кишечника и другие полости организма) и молочнокислые микроорганизмы, часто относящиеся к бифидобактерии и родству *Lactobacillus*. Это связано с бактериями, выделяемыми из кишечника, которые оказывают большое благоприятное воздействие на людей, и колонизируют ЖКТ этими бактериями, участвуют в нем и принимают на себя основную защитную функцию в случае транзитной связи с другими микроорганизмами. Кроме того, существует множество видов пробиотиков: молочнокислые палочки и колонии, которые не встречаются в кишечнике человека и другие микроорганизмы-граммовые положительные (пропионобактерии, *Bacillus*) и грамм отрицательные (*Esherichia coli*, *Citrobacter*) бактерии, дрожжи (*Saccharomices*, *Candida pintolepjesii*) и грибы (*Aspergillus*, *Rizopus*, *Cordiceps*) [215].

Нормально функционирующая резидентная микрофлора контролирует

токсические продукты в кишечнике, предотвращая их выделение в большом количестве и попадание в кровь. В результате метаболизма пробиотиков, обладающих детоксикационными и протеолитическими свойствами, обеспечивается протеолиз аллергенов и антигенов, эндотоксинов в кишечнике. Это связано с тем, что в кишечнике перевариваются полупереваренные белки, появляется непереносимость пищи и кожные заболевания. Конечно, при нарушении микробиоценоза эти вещества попадают в кровь. В настоящее время прямые связи хронических экземных поражений: волчанка с эритемой, псориаз и т.д. показано снижение или недостаток активности функций пробиотиков в организме [216].

Как пробиотики, активно участвующие в функционировании и морфогенезе тканей организма человека и иммунокомпонентных клеток роль лактобацилов изучена достаточно полно. Из пероральных и ректальных препаратов, направленных на применение при иммунодефиците в то же время, – кокковые микроорганизмы *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* – в высоких концентрациях. Иммуностимулирующие и антинеопластические эффекты в результате повышения неспецифической резистентности макроорганизмов в виде других таксономических групп и родственных (*Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus*), они не являются основным продуктом молочного обмена. На основе таких штаммов созданы биопрепараты и молочнокислые продукты с выраженным пробиотическим действием для клиники.

Государственный реестр ветеринарных препаратов и кормовых добавок в Республике Казахстан (далее – Реестр) состоит из 5 разделов:

- препараты, вакцины, включая гипериммунные сыворотки крови, иммуномодуляторы для лечения и профилактики инфекционных заболеваний животных;
- диагностические препараты;
- белково-витаминно-минеральные добавки, антибиотики, премиксы, добавки, специи;
- химико-фармацевтические препараты, антибиотики, ферменты, гормоны, аминокислоты, витамины, парфюмерно-косметическая продукция для животных, радиофармацевтические препараты;
- дезинфекционные и дератизирующие устройства

Государственный реестр ветеринарных препаратов и кормовых добавок в Республике Казахстан издан в соответствии с законами Республики Казахстан «О ветеринарии» и «о безопасности пищевой продукции».

В данный реестр включены ветеринарные препараты и кормовые добавки, зарегистрированные в Республике Казахстан и разрешенные к продаже, имеющие применение в ветеринарии и животноводстве на своей территории, предусмотренные законодательством от 31 декабря 2014 года.

Регистрация и включение в реестр ветеринарных препаратов и кормовых добавок утверждены приказом Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан от 31.10.2002 года №349 правила и правила государственной регистрации и включения в Государственный реестр Республики Казахстан

впервые произведенные (разработанные) и впервые введенные (импортированные) в Республику Казахстан утверждены Постановлением Правительства Республики Казахстан от 24.05.2012 года.

На основании Правил, утвержденных постановлением Правительства РК №668.

Реестр является официальным изданием Министерства сельского хозяйства РК, распространенным в государственных организациях, контролирующих и регулирующих ветеринарные препараты и кормовые добавки.

Реестр ветеринарных аптек, зоомагазинов, аквапарков, животных, а также осуществляющих производство, ввод (импорт), ввод и применение, хранение, поставка ветеринарных препаратов в зоне их поставки, является обязательным документом для всех юридических и физических лиц в области рекламы, производства ветеринарных препаратов, кормов и кормовых добавок.

В ходе проведения данных исследований в государственном реестре белково-витаминных минеральных добавок, премиксов, наполнителей, специй, красителей и химико-фармацевтических препаратов для животных, антибиотиков, ферментов, гормонов, аминокислот, витаминов, парфюмерно-косметической продукции, радиофармацевтических препаратов, используемых в качестве кормовых добавок для непродуктивных животных.

12.5 Роль пробиотиков и пробиотических продуктов в профилактике инфекционных заболеваний и лечении больных животных

В странах Европы в последнее десятилетие активно осуществляется переход к органическому сельскому хозяйству. Общие требования к биологической сельскохозяйственной технологии были созданы в 1972 году

Содержится в документах «Международной федерации движения за органическое сельское хозяйство». Законодательной базой управления экологическим сельским хозяйством в странах ЕС являются «Постановление об экологическом животноводстве» и «Постановление об экологическом земледелии и соответствующие отличительные признаки продовольствия».

В законодательном порядке установлено, что экологическая сельскохозяйственная продукция в ЕС отличается контролем производства, а не тестированием остаточных количеств декларируемых веществ. Решением ЕС с 1 января 2006 года полностью прекращено применение промышленных антибиотиков в качестве кормовых добавок. В связи со вступлением России в ВТО возникла необходимость внедрения системы менеджмента качества, базовые принципы которой утверждены ISO 9001:2000, в которой заложены условия обязательного декларирования применяемых фармакологических препаратов. Продукты, не прошедшие по строгим нормам ЕС, занимают место «максимально дешевого продукта». На этом фоне использование биологически безопасных препаратов – пробиотиков становится приоритетным в животноводстве и птицеводстве.

Наибольший интерес к средствам коррекции микробиоценозов человека и животных проявился в 60-70-х годах прошлого века, широкое применение

антибиотиков и ухудшение экологической обстановки привели к их существенному нарушению, а также к возникновению устойчивости патогенных бактерий к антибиотикам.

В некоторых случаях в качестве пробиотиков используют микроорганизмы, не являющиеся представителями микрофлоры кишечника, но обладающие выраженной антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. В настоящее время из этой группы препаратов используются спорообразующие бактерии типа *Bacillus subtilis* (венозная палочка). Препараты на основе этого вида обладают широким спектром антагонистической активности и иммуномодулирующими свойствами.

Для нормальной жизнедеятельности любому организму необходим пластический и энергетический материал. Эти вещества поступают из пищи в организм. Но усваиваются только минеральные соли, вода и витамины в том виде, в котором они содержатся в животной пище. Белки, углеводы, жиры поступают в организм в виде сложных комплексов и усваиваются, для переваривания их необходимо перерабатывать в простые соединения. В организме эти изменения происходят с помощью процесса пищеварения.

Применение пробиотиков-это реинтродукция полезной микрофлоры в виде чистых побегов, не подверженных риску заболевания. О полезности последних необходимо говорить по их влиянию на здоровье и развитие животных, при этом влияние на молодняк более выражено, особенно в неблагоприятных условиях разведения. Также применение пробиотиков способствует восстановлению баланса микрофлоры кишечника путем способствует возвращению к нормальному физиологическому и поведенческому состоянию и тем самым является одним из факторов, поддерживающих их здоровье, влияющих на получение высококачественного продукта, безопасного как с бактериальной, так и с химической точки зрения. Сегодня пробиотики следует рассматривать как неотъемлемый компонент рационального кормления животных. Единственным его доказательством является результат исследовательской работы ученых – то есть влияние пробиотических препаратов на различные группы животных, показанный в таблице 4 [62, p. 1857-1964].

Применение пробиотических препаратов для коренной коррекции микрофлоры кишечника у взрослых животных практически бесполезно, начинать оздоровление стада нужно только с молодняка. Кишечная микрофлора взрослых особей, выращенных без применения пробиотиков, сформировалась в соответствии с окружающим ее микробиоценозом, что повлияло на деятельность иммунной системы организма и определило уровень его иммунного реагирования. Поэтому использование для него новых штаммов может сигнализировать о введении постороннего организма и даже вызвать обратную реакцию. Основным принципом введения пробиотиков должна быть преемственность препаратов и штаммов пробионта. Нельзя использовать разные препараты с разными штаммами бактерий – пробионтов у матери и потомства, это может привести к отсутствию результатов, а также к

отрицательным результатам. Опыт применения пробиотиков в хозяйствах показывает, что для явного улучшения всех показателей, в том числе экономических, требуется постоянная поддержка восстановленной экосистемы не менее одного года.

До открытия пенициллина сэром Александром Флемингом в 1917 году германский профессор Альфред Ниссле выделил непатогенный штамм кишечной палочки из фекалий солдата Первой мировой войны, который не вызвал развитие энтероколита во время серьезной эпидемии шигеллеза.

Впервые Бифидобактерия была изолирована от грудного ребенка Анри Тисье (Институт Пастера) и получила название *Bacillus bifidus communis*. Тисье предложил, чтобы бифидобактерии могли заменять протеолитические бактерии, вызывающие диарею, и вводил бифидобактерии детям, страдающим этим синдромом. Термин «пробиотики» был впервые введен в 1965 году. Пробиотики, противоположные антибиотикам, описаны как микробные факторы, стимулирующие рост других микроорганизмов. В 1989 году Рой Фуллер, отметив жизнеспособность пробиотиков, предложил идею об их положительном действии для пациентов [216].

В ветеринарной медицине пробиотики как лечебный препарат заявили о себе не так давно. Основным стимулом в развитии ветеринарных пробиотиков стал запрет на использование кормовых антибиотиков в Европе в 2006 году. Была поставлена задача разработать качественную замену, которая не только обеспечила полноценное здоровье животного, но и способствовала конверсии кормов, и, как следствие, повышению молочной продуктивности. В то время при применении первых пробиотических препаратов на основе 1 штамма бактерий (I поколения) была достигнута только одна цель – не только здоровье поголовья, но и ряд побочных веществ, что способствовало повышению продуктивности, ускорению развития животных, значительной экономии кормов и др.

Получив такие невероятные результаты, ученые начали искать варианты усовершенствования препарата. Проведено множество экспериментов по составу различных штаммов микроорганизмов, их количеству, соотношению, общему титру – появились новые поколения препаратов пробиотического действия.

В настоящее время на рынке ветеринарных препаратов существует две конкурирующие линии пробиотиков, это живые пробиотики (на основе активных микроорганизмов) и лиофильные сушеные и спорные (вводимые при анабиозе путем сухого замораживания).

Леофильные сушеные-по ряду показателей значительно уступают живым пробиотикам, но активно их используют, так как имеют важную особенность – они устойчивы к хранению (температура, влажность, продолжительность). Эта особенность важна не только конечному потребителю, но и изготовителю и реализаторам.

«Живые» пробиотики обладают рядом важных функций – высокой скоростью колонизации в кишечнике животного, дополнительными лечебными факторами, метаболитами и т. единственным недостатком-малый срок хранения

и строгий температурный режим.

Иммуномодулирующее действие пробиотиков оказывают А.Н. Панин, Н.И. Малик, О.С. Илаев на формирование их мукозного и системного иммунитета и с точки зрения участия в регулировании. Пробиотические бактерии активно участвуют в формировании механизмов ранней защиты от инфекций, которые обеспечиваются факторами естественной резистентности: повышают концентрацию секреторного IgA, фагоцитарную активность, бактерицид сыворотки крови, активность сывороточного лизоцима и комплемента. В литературных источниках показано, что прием пробиотиков способствует значительному увеличению относительного и абсолютного числа В-лимфоцитов при снижении относительного и абсолютного числа Т-лимфоцитов [77, р. 5129; 78; 79, р. 481; 80, р. 16-19]. Важная роль микрофлоры в развитии иммунного ответа основана на ее универсальных иммуномодулирующих свойствах, включающих иммуностимуляцию, а также иммуносупрессию. Бактериальные липополисахариды и пептидогликаны, входящие в состав клеточной стенки различных нормофлор, проявляют эффект иммунной регуляции. Поэтому пробиотические препараты назначаются как в остром периоде заболевания, так и при реконвалесценции, в зависимости от их способности оказывать антагонистическое воздействие на возбудителей инфекции и стимулировать естественный иммунитет. По данным ученых Л.С. Азнабаевой, З.Р. Хисматуллиной и др., У детей с зооантропонозной трихофитией наблюдается значительное снижение функциональной активности нейтрофилов. Применение пробиотика «Бактиспорин» в комплексной терапии оказывает иммуномодулирующее действие на функциональные свойства нейтрофилов. Активизируется функциональная активность клеток, что ярко выражено в очаге воспаления. Это хорошо видно по высоким показателям фагоцитарного индекса, фагоцитарного числа, активности миелопероксидазы нейтрофилов на 10 сутки лечения. Перед иммунизацией холерными токсинами вызывали повышение уровня антител к этому токсину (IgG и IgA) в слизистой оболочке бронхов. Alvarez S., Herrero C., Bru E., Perdigon G. *L. casei* 3-недельное введение *casei* в ткани вызывало усиление синтеза IgA и IgM в слизистых оболочках бронхов после инфицирования побегом PS [217].

Современное определение пробиотиков дано рабочей группой Всемирной организации здравоохранения: «пробиотики – апатогенные бактерии, обладающие антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий и обеспечивающие восстановление нормальной микрофлоры кишечника». Это определение справедливо и для ветеринарных препаратов.

Механизм профилактического и терапевтического действия пробиотических препаратов основан на разнообразной и штаммовой принадлежности микроорганизмов, входящих в их состав, а также наличию в составе конкретного лекарственного средства вспомогательных веществ. Эти пробиотики можно классифицировать по группам:

- монокомпонентные пробиотики;
- поликомпонентные пробиотики или симбиотики;

- комплексные пробиотики (синбиотики), содержащие химически активные вещества-пребиотики);
- иммобилизованные пробиотические комплексы на природных адсорбентах.

В ветеринарной медицине основой для применения пробиотиков являются положительные эффекты, которые они вызывают в организме животных. Основные эффекты пробиотиков включают улучшение пищеварения, иммуностимулирующее действие и повышение продуктивности животных [218].

Улучшение процесса пищеварения происходит за счет колонизации кишечника микроорганизмами-пробиотиками (чаще всего содержащими лактобифидобактерии), которые являются антагонистами условно-патогенных энтеробактерий, продуцирующих биологически активные вещества. В результате повышается синтез микробного белка и витаминов, всасывание питательных веществ.

Пробиотические препараты способны повысить экономическую эффективность животноводства за счет описанных свойств. Например, при добавлении в рацион пробиотика Витафорта отмечалась интенсивность роста и развития птиц, что повышало их мясную продуктивность. Скармливание комплексного растительного концентрата с пробиотиком на основе *Bacillus subtilis* повысило среднесуточное доение крупного рогатого скота, снизило затраты обменной энергии и расход комбикорма на 1 кг молока. М.И. Подчалимова и др. приведены данные по изучению влияния кормовой смеси с пробиотиком субтилис на сохранность поросят разного возраста и качество продукции. При выращивании и откорме молодняка свиней добавление пробиотика Субтилиса в полноценный комбикорм увеличивает их мощность роста, сокращает сроки выращивания, сокращает затраты кормов на единицу продукции. Таким образом, применение пробиотических препаратов позволяет не только оптимизировать терапевтическую деятельность, но и повысить экономическую эффективность предприятия.

Основными показаниями к применению пробиотических препаратов являются повышение резистентности организма и продуктивности животных. Пробиотики назначают также для восстановления микрофлоры кишечника при несбалансированном кормлении, стрессе, хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта и других органов, а также при комплексном лечении антибиотиками. В птицеводстве пробиотики используются с целью предотвращения колонизации кишечника сальмонеллой. Неоспоримым преимуществом пробиотических препаратов является их иммунокоррекционный эффект.

Открытие пенициллина Александром Флемингом в 1928 году стало переменным моментом, который произвел революцию в медицине и ветеринарии. Антибиотики в ветеринарии и медицине используются для профилактики и борьбы с бактериальными инфекциями и в качестве стимуляции роста промышленных животных. Профилактика и контроль бактериальных инфекций были достигнуты при лечении антибиотиками,

метафилактическом или профилактическом применении. Антибиотики, используемые в кормах для животных, были определены как антибиотики – стимуляторы роста с целью повышения их роста, улучшения использования кормов и снижения смертности. Применение стимуляторов роста в Европейском Союзе утверждена Советской директивой от 23 ноября 1970 г. в отношении смесей (70/524/ЕЕС).

Количество видов антибиотиков, разрешенных к применению в кормлении животных, постоянно ограничено. С 1 января 2006 года Евросоюз полностью запретил использование стимуляторов в кормах для сельскохозяйственных животных. Запрет был введен одновременно во всех странах ЕС. С этого времени антибиотики в качестве лекарства разрешается использовать только в лечебных кормах для животных или в виде профилактических добавок. К смесям, используемым в кормлении животных, Европарламент и регламент ЕС от 22 августа 2003 г. №1831/2003 включают в качестве кормовых добавок пробиотики и альтернативы антибиотик-стимуляторам.

При применении микробных препаратов в животноводстве повышается качество и использование кормов, ускоряется рост животных, их продуктивность, а также снижается себестоимость продукции, резко сокращается количество случаев заболеваний и летальных исходов.

На современном этапе одной из проблем птицеводства является обеспечение высокой рентабельности производства. Вместе с тем, интенсивное использование птиц в условиях высокой концентрации поголовья скота и значительного воздействия факторов техногенного характера сопровождается снижением резистентности организма, повышением заболеваемости и смертности. В связи с этим стоит проблема обеспечения устойчивости поголовья к вредному воздействию факторов внешней среды при производстве органической продукции. Таким образом, применение пробиотических препаратов на основе лактобацилл в качестве средства профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний при кормлении молодняка сельскохозяйственных животных, птиц и рыб позволяет повысить иммунитет животных, сохранить их здоровье и получить экологически безопасную животноводческую продукцию.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Методологической основой работы явились труды отечественных и зарубежных ученых, направленных на исследования по использованию в хозяйствах для производства молока, современных средств для обработки помещений и улучшения качества сырого молока. Для реализации поставленных задач применялись общепринятые и специальные методы исследований, включая зоотехнические, зоогигиенические, клинико-физиологические, гематологические, биохимическими иммунобиологические, ветеринарно-санитарной экспертизы, спектрометрические и экономические.

Научно-исследовательские работы проводились с применением следующих методов:

1. Клинико-физиологические - определяли у животных контрольных и опытных групп температуру тела, частоту пульса и частоту дыхания общепринятыми в ветеринарной медицине методами.

2. Оценка качества молока проводили в соответствии с требованиями ГОСТ 31449-2013 «Молоко коровье сырое. Технические условия»:

– отбор проб и подготовка их к испытанию по ГОСТ 13928-84 «Молоко и сливки заготавливаемые. Правила приемки. Методы отбора проб»;

– определение цвета, запаха, вкуса и консистенции - органолептическим методом по ГОСТ 28283-89 «Метод органолептической оценки. Запах и вкус»;

– определение температуры - методом измерения температуры по ГОСТ 26754-85 «Молоко. Методы определения температуры»;

– определение плотности - ареометрическим методом по ГОСТ 3625-84 «Молоко и молочные продукты. Методы определения плотности»;

– определение кислотности - методом титрования по ГОСТ 3624-92 «Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности»;

– определение чистоты - методом фильтрования по ГОСТ 8218-86 «Молоко. Методы определения чистоты»;

– определение массовой доли жира - кислотным методом Гербера по ГОСТ 5867-90 «Молоко и молочные продукты. Методы определения жира»;

– определение массовой доли белка - методом измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю по ГОСТ 23327-98 «Молоко и молочные продукты. Метод измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю и определение массовой доли белка»;

– определение массовой доли сухого вещества и сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО) - арбитражным методом по ГОСТ 3626-73 «Молоко и молочные продукты. Методы определения влаги и сухого вещества» и расчетным методом;

– определение КМАФАнМ - методом подсчета колоний мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов по ГОСТ 9225 «Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа»,

– определение ингибирующих веществ - с применением индикатора метиленового голубого по ГОСТ 23454-07 «Молоко. Методы определения ингибирующих веществ»;

– определение патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл - по ГОСТ 30519 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*»;

– определение количества соматических клеток - по изменению вязкости визуальным способом и с применением вискозиметра ГОСТ Р 23453 «Молоко. Методы определения количества соматических клеток по изменению вязкости».

3. ГОСТ 2668-85. Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов.

ГОСТ 26669-85. Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов.

ГОСТ 52814-2007. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода сальмонелла.

ГОСТ 10444.12-88. Методы выявления и определения количества бактерии группы кишечных палочек. Метод определения дрожжей и плесневых грибов

ГОСТ 12.1.004-91. Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования.

ГОСТ 12.1.005-88. Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 12026-76. Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.

ГОСТ 1770-74. Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 24104-2001. Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия.

ГОСТ 6709-72. Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 9147-80. Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия.

ГОСТ 2668-85. Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов.

ГОСТ 26669-85. Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов.

ГОСТ 52814-2007. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода сальмонелла.

ГОСТ 52816-2007. Методы выявления и определения количества бактерии группы кишечных палочек.

4. Экономическую эффективность от применения средств обработки вымени коров Skin Cleaner, PIP Cow Teat Cleaner и Биомастим вычисляли по методике, утвержденной Министерством сельского хозяйства Российской Федерации (Никитин И.Н., 1999);

5. Статистическую обработку проводили методом вариационной

статистики на достоверность различия сравниваемых показателей. Значения средних арифметических (M), среднеквадратических отклонений (a), средних ошибок (t) были вычислены с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel 2007. Степень достоверности различий средних величин в случаях нормального распределения определялась с помощью критерия Стьюдента: где t - значение критерия Стьюдента; M^2 - средняя арифметическая; t^2 - средняя ошибка.

Для достоверности суждений вероятность ошибки P должна была быть менее 5%, $P < 0,05$, а также разделялись уровни значимости $P < 0,01$ и $P < 0,001$.

Экспериментальные исследования проведены в условиях молочно-товарной фермы ТОО АФ «Родина» в Акмолинской области в соответствии с планом научных исследований НАО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина». Обработку материалов проводили на базе технопарка Назарбаев Университет в лаборатории ТОО «Экостандарт.kz», в 2015-2018 годы.

Объектами исследований были коровы Голштинской и Казахской-белоголовой породы. В научно-хозяйственном опыте были подобраны три группы дойных коров по принципу аналогов с учетом клинико-физиологического состояния, возраста и живой массы по 20 животных в каждой группе.

В период исследования коровы получали однотипный рацион, находились в равных условиях содержания и доения. В подготовительный период провели анализ молока по массовой доли жира, белка, сухого вещества, а так же по кислотности и плотности. Молоко по этим показателям было однородным. Доение коров на молочно-товарной ферме осуществляется при помощи доильных аппаратов в молокопровод два раза в сутки с интервалом 12 часов.

Для улучшения качества молока по микробиологическим показателям применяли пробиотические средства при содержании коров.

Средство для дезинфекции PIP Hause Cleaner – концентрированное средство для ежедневной обработки. Содержит в составе 3 компонента: моющую (достаточно 10-20 с. для отделения грязи с вымени), ферментную (более глубокая очистка поверхности кожи вымени), пробиотическую (*Bacillus subtilis* колонизирует поверхность кожи вымени, вытесняя патогенную микрофлору). Продукт не является лекарственным средством или дезинфектантом. Имеет нейтральный pH, не содержит красителей и отдушек, экономичен в использовании, создает устойчивую здоровую микрофлору на сосках животных и имеет длительное бактериальное воздействие. Данный очиститель безопасен для всех видов материалов, кожи рук и одежды, полностью биоразлагаемый, неаллергичный, негорючий, нелетучий.

В весенне-летний период 2017-2018 гг. провели исследования по использованию пробиотических средств и химических средств (PIP Hause Cleaner) и (Кристалл-900).

В хозяйстве разводят крупный рогатый скот Голштинской и Казахской-белоголовой породы. Животные крупные, пропорционального телосложения, с крепкой конституцией и хорошо выраженной формой вымени.

По результатам исследований, полученных в условиях хозяйства, разработали рекомендации, направленные на повышение качества и безопасности молока коров при использовании пробиотических средств

Научно-исследовательские работы проводились с применением следующих методов: 1) зоогигиенические – на молочно-товарной ферме определяли температуру, влажность воздуха комбинированным прибором «ТКА-ПКМ» (модель 42), скорость передвижения воздуха – термоанемометром «ТКА-ПКМ» (модель 50), содержание в воздухе углекислого газа – по Гессу, аммиака и сероводорода – универсальным газоанализатором УГ-2, микробную обсемененность и содержание пыли в воздухе помещения – аппаратом Кротова. Параметры микроклимата в животноводческих помещениях учитывали в каждый месяц три дня подряд в трех зонах: середина помещений, углы торцов по диагонали (на расстоянии 1,0-3,0 м от стен; на высоте 0,6 и 1,2 м от пола); 2) клинико-физиологические – определяли у животных контрольных и опытных групп температуру тела, частоту пульса и частоту дыхания общепринятыми в ветеринарной медицине методами; 3) оценку качества молока проводили в соответствии с требованиями ГОСТ 31449-2013 «Молоко коровье сырое. Технические условия»: – отбор проб и подготовка их к испытанию по ГОСТ 13928-84 «Молоко и сливки заготавливаемые. Правила приемки. Методы отбора проб»; – определение цвета, запаха, вкуса и консистенции – органолептическим методом по ГОСТ 28283-89 «Метод органолептической оценки. Запах и вкус»; – определение температуры – методом измерения температуры по ГОСТ 26754-85 «Молоко. Методы определения температуры»; – определение плотности – ареометрическим методом по ГОСТ 3625-84 «Молоко и молочные продукты. Методы определения плотности»; – определение кислотности – методом титрования по ГОСТ 3624-92 «Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности»; – определение чистоты – методом фильтрования по ГОСТ 8218-86 «Молоко. Методы определения чистоты»; – определение массовой доли жира – кислотным методом Гербера по ГОСТ 5867-90 «Молоко и молочные продукты. Методы определения жира»; – определение массовой доли белка – методом измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю по ГОСТ 23327-98 «Молоко и молочные продукты. Метод измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю и определение массовой доли белка»; – определение массовой доли сухого вещества и сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО) – арбитражным методом по ГОСТ 3626-73 «Молоко и молочные продукты. Методы определения влаги и сухого вещества» и расчетным методом; – определение КМАФАнМ – методом подсчета колоний мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов по ГОСТ 9225 «Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа», определение ингибирующих веществ – с применением индикатора метиленового голубого по ГОСТ 23454-07 «Молоко. Методы определения

ингибирующих веществ»; – определение патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл – по ГОСТ 30519 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*»; – определение количества соматических клеток – по изменению вязкости визуальным способом и с применением вискозиметра ГОСТ Р 23453 «Молоко. Методы определения количества соматических клеток по изменению вязкости»; 4) экономическую эффективность от применения средств обработки вымени коров Skin Cleaner, PIP Cow Teat Cleaner и Биомастим вычисляли по методике, утвержденной Министерством сельского хозяйства Российской Федерации (Никитин И.Н., 1999); 5) статистическую обработку проводили методом вариационной статистики на достоверность различия сравниваемых показателей. Значения средних арифметических (M), среднеквадратических отклонений (a), средних ошибок (t) были вычислены с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel 2007. Степень достоверности различий средних величин в случаях нормального распределения определялась с помощью критерия Стьюдента.40 где t – значение критерия Стьюдента; M1; M2 – средняя арифметическая; m1; m2 – средняя ошибка.

Для достоверности суждений вероятность ошибки P должна была быть менее 5%, $P \leq 0,05$, а также разделялись уровни значимости $P \leq 0,01$ и $P \leq 0,001$.

Приготовление растворов и красителей. Для проведения экспресс-теста по Граму использовали свежеприготовленный раствор 3% КОН на дистиллированной воде.

Насыщенные растворы метиленового синего и фуксина основного для микроскопии готовили заранее и хранили в темноте в стеклянных сосудах с притертыми пробками. Для этого 3.0 г метиленового синего или 10.0 г фуксина основного растворяли в 100 мл 96%-го этанола, оставляли на 2-3 суток, несколько раз перемешивали и фильтровали. Для окраски препаратов небольшие количества насыщенных растворов разводили дистиллированной водой (фуксин – 1:9; метиленовый синий – 1:40). 0,05%-й раствор бромтимолблау для индикации рН среды готовили, растворяя краситель в 20%-ном этаноле.

Оценка эффективности комплекса профилактических мероприятий, основанная на использовании пробиотических продуктов проводилась также на базе модельных предприятий. Обработку сосков вымени перед доением проводили обмыванием сосков вымени и молочной железы 0,2-0,5% растворами Animal House Cleaner фирмы Chrisal (Бельгия). После доения наносили погружением в стакан для дезинфекции или орошали соски из пульверизатора 4% раствором PIP Cow Teat Cleaner. Активная основа указанных средств представлена комплексом штаммов микроорганизмов: *Bac. subtilis*, *Bac. pumilus*, *Bac. licheniformis* и *Bac. megaterium*, являющихся строго сапрофитными аэробными микроорганизмами. В комплексную программу был включен ряд пробиотических средств: Pip Plus Water (PIP PW) – для добавления в воду и опрыскивания кормов (0,5%), Pip Cow Teat Cleaner (PIP CTC) – для обработки сосков вымени коров и Pip Animal Housing Stabilizer (PIP AHS) – для орошения животноводческого помещения.

Распыление средства РІР АНS, проводили с использованием опрыскивателя объемом 5 литров с телескопическим распылителем. Препарат наносили на элементы конструкции, а также настил и животных в объеме на 300 м² площади 1 л концентрированного раствора. Первые 7 дней проводили ежедневную обработку помещения, затем 1 раз в 3 дня до окончания исследования.

Учет результатов проводили на основании клинического осмотра молочной железы с определением состояния сосков вымени с использованием диагностической шкалы, а также определяли наличие воспалительных заболеваний молочной железы с применением быстрого маститного теста Кенотест или прямым подсчетом соматических клеток.

Экономическую эффективность лечебно-профилактических мероприятий рассчитывали по «Методике определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий», М., 1997.

Статистическую обработку данных производили в программах Microsoft Excel 2010 и STATISTICA 10 с вычислением средней арифметической, стандартного отклонения, средней ошибки показателей по параметрическому t-критерию Стьюдента, для независимых групп непараметрическому критерию Манн-Уитни, для зависимых групп – по непараметрическому критерию Вилкоксона.

2.1.1 Метод определения бактериологической обсемененности поверхности помещения для содержания животных

Оценку микробной обсемененности объектов животноводческого помещения выполняли на базе лаборатории ТОО «Экостандарт.kz». В качестве материалов для исследований были приняты смывы со стен, пола, кормушек и металлических перегородок, которые служили показателями санитарно-гигиенического состояния животноводческих помещений, взятые в ТОО АФ «Родина».

Взятие проб и их транспортировка, методы выделения проводились согласно общепринятым методикам санитарной микробиологии. Смывы с поверхности стен, пола, кормушек брали в стерильные пробирки для санитарных смывов, в соответствии с рисунком 1.



Рисунок 1 – Набор для санитарных смывов

Бактериологические исследования проводили по показателям: количество мезофильных и анаэробно-факультативных микроорганизмов (КМАФАнМ) и наличие бактерий группы кишечных палочек в соответствии с методиками, изложенными в Инструкции «Проведение ветеринарной дезинфекции объектов животноводства» (1989). Осуществляли посевы на питательные среды, постановку реакции и окраску по Грамму с последующим микроскопированием.

Видовой состав микроорганизмов, содержащихся на поверхностях исследуемого объекта, определяли на базе ТОО «Экостандарт.kz», от коров принадлежащих ряду сельхозпредприятий, таких как АО «Астана-Өнім» и ТОО АФ«Родина».

Исследования микробной обсемененности проводили непосредственно до и после проведения дезинфекции животноводческих помещений (крупного рогатого скота). Объектами контроля служили 3 опытные группы, в которых проверялись смывы с пола, ограждающих конструкций, стен, кормушек и поилок. Всего было исследовано 60 смывов на определение КМАФАнМ и обсемененности бактериями.

Видовая идентификация микроорганизмов проводилась по морфологокультуральным свойствам путем посева на питательные среды. Для получения консорциумов был использован метод совместного культивирования активных штаммов лактобацилл.

В животноводческих комплексах молочного направления ТОО АФ «Родина» животных содержали в типовом двухрядном коровнике без привязи. Летом коров содержали в летнем лагере на привязи под тенью навесом, им ежедневно предоставлялся активный моцион (на пастбище)

продолжительностью 3-4 ч.

Зимние рационы коров включали кукурузный силос, сено бобовых культур (люцерновое) и концентраты. В рационах коров в летнее время преобладали зеленая масса зернобобовых культур и концентрированные корма.

На ферме принято двухразовое машинное доение коров. За каждой дояркой закреплено 40-45 коров и три доильных аппарата. При доении вымя обмывали теплой водой из общего ведра и вытирали общим полотенцем. В процессе доения по мере загрязнения и охлаждения воды ее сменяли, а полотенце прополаскивали.

Микробный пейзаж животноводческого помещения в хозяйстве ТОО АФ «Родина» где содержатся высокопродуктивные коровы, изучали седиментационным методом, путем высева смыва пробы из поверхности стен, пола, ограды и осадения микроорганизмов из воздуха на поверхность чашки Петри с твердыми питательными средами МПА, Эндо, Сабуро. Оценка микробной обсемененности учитывали после истечения 1, 5, 10 и 30 суток после дезинфекции.

При проведении мониторинга микробной обсемененности молочных ферм ТОО АФ «Родина» после использования средств для санации для выявления микроорганизмов использовали следующие виды питательных сред:

Мясо-пептонный агар (МПА) производство Himedia, (Индия), (г/л) дистиллированной воды: мясная вода – 1,0; хлорид натрия (NaCl) – 5,0; пептон – 10,0; агар-агар – 20,0; pH 6,8-7,0; Стерилизация при 1 атм. (121 °C) – 20 мин.

Сухой питательный бульон (СПБ) произведено в г. Оболенск, Московской области, г/л дистиллированной воды: панкреатический гидролизат рыбной муки – 18,0; NaCl - 2,0; pH 7,3±0,2. Стерилизовали при 0,1 МПа атм. 15 минут.

Для выделения и культивирования энтеробактерий использована дифференциально-диагностическая питательная среда Эндо.

Для выделения и культивирования молочнокислых микроорганизмов использована элективная среда MRS (Man-Rogosa-Sharpe, HiMedia, Индия) Среда MRS (г/л): молоко гидролизованное - 500,0 мл, экстракт печеночный – 100,0 мл, дрожжевой аутолизат – 50,0 мл, твин-80 – 1,0 мл, агар-агар – 30,0 г, глюкоза – 20,0 г, пептон – 10,0 г, калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный – 2,0 г, цистин солянокислый – 0,2 г, марганец сернокислый 4-водный – 0,05 г, магний сернокислый 7-водный – 0,2 г, вода дистиллированная.

Для выделения и культивирования патогенных грибов, дрожжей и ацидофильных бактерий использована элективная среда Сабуро. Среда Сабуро (г/л): глюкоза или мальтоза (40 г), пептон (10 г), агар-агар (18 г), дистиллированная вода (1000 мл). Приготовление: мелконарезанный агар заливают водой и оставляют на 30 мин. для разбухания; затем добавляют глюкозу (или мальтозу) и пептон, стерилизуют в течение 15 мин. при 110-115°.

Получение чистой культуры (рисунок 2).

Выделение состоит из следующих этапов:

– бактериологической петлей проводили отбор изолированных колоний накопительной культуры, различных по культуральным признакам, и высеив их

на твердую питательную среду продольным штрихом (2-5 штрихов в одной чашке Петри, которые помещали в термостат при 24,5 на 16-18 часов);

- микроскопия выросших культур;
- высев чистых культур в пробирки на скошенную питательную среду;
- пересев колоний, состоящих из консорциума микроорганизмов, на твердую питательную среду методом последовательного разведения 1:20000 и 1:200000:

а) для получения равномерного роста изолированных колоний применяли стеклянные бусы. Стеклянные круглые бусы 8-12 штук (заранее простерилизованные) опускали в чашку Петри с посевным материалом. Легко покачивали чашку в течении 1 мин. После чего бусы извлекали и отправляли на стерилизацию;

б) чашки Петри помещали в термостат при 24,5 на 16-18 часов.

- пересев изолированных колоний, отличающихся по культуральным признакам, в пробирки на скошенную питательную среду;
- микроскопия выросших культур;
- в случае выявления в пробирках консорциума микроорганизмов, проводился повторный пересев методом последовательного разведения;
- при подтверждении чистоты выделенного штамма пробирки с чистыми культурами закладываются на хранение при $T=+4-+5^{\circ}\text{C}$;
- пересев чистых культур проводится не реже одного раза в месяц (30 календарных дней) в пробирки на скошенную питательную среду.



а



б

а – высев чистых культур в пробирки на скошенную питательную среду; б – пересев колоний, состоящих из консорциума микроорганизмов, на твердую питательную среду

Рисунок 2 – Получение чистой культуры

Молочное животноводство в Акмолинской области

Поголовье КРС в Республике Казахстан в 2019 году достигло 7,4 млн. голов, на 4% выше 2018 года, по сравнению с 2003 годом рост составил 52,7% (Комитет по статистике Республики Казахстан).

Молочный рынок Республики Казахстан 35 место в мире по производству молока по данным за 2018 год 883 тыс. молочных ферм в стране 4 коровы – средний размер фермы 9 место в мире по площади (2 724 902 км²) 18 611 095 человек – численность населения на 1 декабря 2019 41,56% - доля сельского населения.

Поголовье коров в 2018 году составило 3,6 млн. голов, по сравнению с 2017 годом рост составил 6,3%, по сравнению с 1996 годом поголовье выросло на 40%. В Казахстане действует 883 тыс. молочных ферм. Средний размер молочной фермы - 4 коровы на ферму (IFCN).

Производство молока в Республике Казахстан. В 2019 году в Республике Казахстан было произведено 5,8 млн. тонн молока, на 2,4% выше уровня 2018 года и на 34,8% выше 2003 года (Комитет по статистике Республики Казахстан).

Потребление молока в Республике Казахстан. Средний уровень потребления молока на душу населения по данным IFCN за 2017 году составил 264 кг, на 9% ниже 2016 года.

Производство молочной продукции в Республике Казахстан (по данным Комитета статистики Республики Казахстан) Объем производства молока и сливок жидких обработанных в Казахстане составил в 2017 году 481,9 тыс. тонн, на 3,6% ниже уровня 2016 года.

Производство кисломолочных продуктов в 2017 году составило 192,9 тыс. тонн, на 0,7% выше 2016 года. Объем выпуска сухого молока составил всего 4,9 тыс. тонн (+2,9%), объем выпуска сгущенного молока и сливок составил 9,2 тыс. тонн (+0,3%).

Производство сыров и творога в 2017 году выросло до 25,2 тыс. тонн, на 2% выше 2016 года и на 15% выше 2014 году.

Производство масла сливочного в 2017 году составило 16,8 тыс. тонн, на 1,5% выше уровня 2016 года. Внешняя торговля молочной продукцией в республике Казахстан (по данным Комитета статистики Республики Казахстан).

Объем импорта молока и сливок несгущенных в Казахстан в 2019 году составил 21,5 тыс. тонн или 17,2 млн. долларов в денежном выражении, в сравнении с 2018 годом в физическом объеме импорт вырос на 1,3 и на 0,4% в денежном выражении. По сравнению с 2015 годом объем импорта в физическом выражении упал на 53,5%, в денежном выражении на - 48,2%.

Импорт в молока и сливок сгущенных в 2019 году составил 37,6 тыс. тонн или 73,5 млн. долларов, по сравнению с 2018 году в тоннаже импорт снизился на 14,7% в денежном выражении на - 8%.

Кисломолочной продукции в 2019 году было закуплено 36 тыс. тонн на сумму 42,9 млн. долларов, на 12,9% больше в тоннаже и на 14,7% больше в денежном выражении, чем в 2018 году.

Казахстан импортировал также в 2019 году 11,3 тыс. тонн сгущенной и несгущенной молочной сыворотки на сумму 12 млн. долларов, на 18% больше в тоннаже и на 44% больше в денежном выражении, чем в 2018 году.

Сливочного масла в 2019 году было закуплено почти 5 тыс тонн на сумму 20,5 млн. долларов, на 22,3% меньше в тоннаже и 25% меньше в денежном выражении, чем в 2018 года.

Импорт сыров и творога в 2019 году составил 25,6 тыс. тонн на сумму 86,3 млн. долларов, на 16,3% выше, чем в 2018 году, тоннаже и на 13% больше в денежном выражении.

Общий объем импорта данных продуктов составил в 2019 году 137 тыс. тонн на сумму 252 млн. долларов, на 1,15% выше 2018 года в физическом объеме и на 2,3% выше в денежном выражении.

Экспорт молока и сливок несгущенных из Казахстана в 2019 году составил 39,4 тыс. тонн или 17 млн. долларов в денежном выражении, в сравнении с 2018 годом в физическом выражении объем импорт вырос на 43,8% (и в 5 раз выше уровня 2015 года) и на 40,7% в денежном выражении (в 4 раза выше 2015 года).

Объем экспорта молока и сливок сгущенных в 2019 году составил 910 тонн или 1,8 млн. долларов, по сравнению с 2018 годом в тоннаже импорт вырос на 24% в денежном выражении на 68%.

Экспорт кисломолочных продуктов из Казахстана в 2019 году составил 11 тыс. тонн, на 15% выше уровня 2018 года, на сумму 10 млн. долларов, на 18,8% выше 2018 года.

Поставки сыворотки сгущенной и несгущенной на рынки третьих стран в 2019 году составили 748,7 тонн (+74,6% к 2018 году) на сумму 402 тыс. долларов (в 3 раза выше уровня 2018 года). Пик экспорта сыворотки из Казахстана за последние пять лет пришелся на 2016 год, когда объем экспорта достиг 1,3 тыс тонн на сумму 741,6 тыс долларов.

Сливочного масла было экспортировано в 2019 году 2,8 тыс. тонн на сумму 13,7 млн. долларов, по сравнению с 2018 годом рост составил 57% в тоннаже и 54,5% в денежном выражении.

Экспорт сыров и творога в 2019 году составил 3,4 тыс. тонн на сумму 10,8 млн. долларов, рост по сравнению с 2018 годом составил 44,6% в физическом выражении и 20,8% в денежном выражении.

Общий объем экспорта данных молочных продуктов из Республики Казахстан в 2019 году составил 58,5 тыс. тонн на сумму 53,5 млн. долларов, на 38,3% выше 2018 года в тоннаже и на 35,9% выше в денежном выражении.

Содержание коров

На молочно-товарной ферме ТОО АФ «Родина» используется беспривязное содержание коров.

Преимущества беспривязного содержания коров:

Главная особенность беспривязного способа содержания состоит в том, что скот собран в технологические группы, в которых животные свободно перемещаются и общаются по своему желанию. Это сильно влияет на поведение коров и накладывает на скотоводов требования по формированию

технологических групп по физиологическому и продуктивному состоянию.

1) обеспечение постоянного доступа к кормовой смеси, рассчитанной для определенной группы животных;

2) снижение стрессовых ситуаций во время технологических операций.

Животных содержат в помещении без постоянной фиксации в стойле.

Для доения оборудуется отдельный доильный зал. Коровы могут свободно передвигаться в пределах зала или выгульной площадки, полностью реализуя физиологическую потребность в движении.

У коров лучше развит скелет, что способствует более полному раскрытию потенциала продуктивности. Свободно содержащиеся животные реже болеют.

В целом комплекс рационального использования преимуществ позволяет повысить молочную продуктивность на 15% и снизить затраты на корма на 10%.

Имеются прилегающие к коровникам выгульные площадки, которые играют важную роль.

В коровнике три кормовых ряда и 6 навозных проходов. Кормление двукратное, раздача корма осуществляется с помощью кормораздатчика КТУ-10 в кормушки. Запас концентрированных кормов хранится в помещении, который расположен в торце коровника. Индивидуальные поильники АП-1 установлены по одной на 2 стойла.

Доение коров производится в стойлах линейной доильной установкой АДМ-8 в молокопровод. Доение проводится два раза в сутки, выдоенное молоко поступает в молочный блок – в танк-охладитель.

На дойку затрачивают в среднем 3-3,5 часа. Дойку начинают с первотелок, затем доят всех остальных здоровых коров. Отелившихся коров и коров, прошедших лечение, доят отдельно с помощью переносного доильного 58аппарата. Доярка тщательно обмывает вымя коровы, затем сдаивает первые струйки молока в специальную кружку и подсоединяет доильные стаканы.

Первичная обработка молока проводится в молочном блоке. Мойку доильного оборудования, аппаратов и посуды проводят доярки сразу после доения. Мойка молочного танка осуществляется после каждого его опустошения. Для мойки молокопровода сначала применяют воду температурой около 40°C. Это нужно для того, чтобы не образовался молочный камень на внутренних стенках молокопровода. Затем оборудование моют специальным моюще-дезинфицирующим средством при температуре 65-80°C в течение 8-15 минут, затем тщательно ополаскивают водой.

Животные в стойле находятся в течение 200-220 дней. Пол в стойле дощатый, под наклоном к навозному лотку. Навоз вручную сталкивается с пола стойла в открытый канал на транспортер и механически удаляется из помещения. Пол в навозном проходе бетонный. Навоз удаляется ежедневно с помощью скребкового транспортера ТСН-3,0Б с погрузкой в прицеп транспортного средства. Навоз вывозится на навозохранилище, в хозяйстве это поле, где его складывают штабелями, предварительно утрамбовав каждую порцию. Система вентиляции оборудована приточными и вытяжными каналами.

На молочно-товарной ферме ТОО АФ «Родина» приняты следующие

технологические операции по первичной обработке молока: отчистка от механических примесей с помощью трубчатых одноразовых фильтров из синтетической ткани; охлаждение молока в танке-охладителе, хранение и транспортирование на молокоперерабатывающие предприятия.

Кормление коров

Рационы кормления коров молочно-товарной фермы ТОО АФ «Родина» были разработаны в соответствии с требованиями современных детализированных норм кормления лактирующих коров с учетом фактической продуктивности и физиологического состояния. Контроль полноценности рационов осуществляли по 24 показателям энергетической, протеиновой, углеводной, жировой, минеральной и витаминной питательности. Кормление животных осуществляли два раза в день.

Согласно схеме опыта, животные всех групп содержались на рационе, состоящего из сенажа люцернового, сена люцернового, силоса кукурузного, пивной дробины, кондитерских отходов, ячменно-пшеничного размола и кукурузного крахмала.

Структура рациона была следующей (% по питательности): грубые корма – 35, сочные – 25, кондитерские отходы – 5, концентрированные корма – 35. Рацион кормления представлен в таблице 10.

Животные всех групп получали 3,38 кг сухого вещества на 100 кг живой массы. Доля сырого протеина в сухом веществе составляла 11,97%. В 1 кг сухого вещества содержалось 0,96 ЭКЕ. В 1 ЭКЕ содержалось перевариваемого протеина 85,1 г. В сухом веществе рациона коров содержание сырой клетчатки составило 24,97% соответственно.

Сахаропротеиновое отношение рационов составляло 1,02:1. Отношение крахмал-сахар составило 1,75:1.

Таким образом, рационы соответствовали нормам кормления коров живой массой 550 кг с суточным удоем 20 кг молока с жирностью 4,0% (таблица 1).

Таблица 1 – Рацион кормления лактирующих коров живой массой 500 кг, суточным удоем 20 кг молока жирностью 4,0%

| Показатель | Требуется по норме | Содержится | Разница к норме, (±) |
|-------------------------|--------------------|------------|----------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Концентраты, кг: | | 6,3 | |
| в т.ч. ячмень | | 3,6 | |
| Пшеница | | 2,0 | |
| дёрть кукурузная | | 0,5 | |
| БВМК | | 0,8 | |
| Сено люцерновое, кг | | 3,5 | |
| Сенаж люцерновый, кг | | 13,0 | |
| Силос кукурузный, кг | | 16,0 | |
| Пивная дробина, кг | | 10,0 | |
| Кондитерские отходы, кг | | 1,0 | |

Продолжение таблицы 1

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------------------------------|--------|--------|---------|
| Питательность рациона: | | | |
| ЭКЭ | 17,7 | 18,09 | +0,39 |
| Обменной энергии, МДж | 177,0 | 180,9 | +3,9 |
| Сухого вещества, кг | 18,9 | 18,9 | 0 |
| Сырого протеина, г | 2440,0 | 2427,5 | -12,5 |
| Перевариваемого протеина, г | 1610,0 | 1699,8 | +89,8 |
| Лизина, г | 132,0 | 139,4 | +7,4 |
| Метионин + цистин, г | 66,0 | 72,7 | +6,7 |
| Сырой клетчатки, г | 4540,0 | 4670,5 | +130,5 |
| Крахмал, г | 2124,0 | 2818,4 | +694,4 |
| Сахара, г | 1416,0 | 1744,6 | +328,6 |
| Соль поваренная, г | 105 | 115 | +10 |
| Кальция, г | 150,0 | 173,6 | +23,6 |
| Фосфора, г | 78,0 | 78 | 0 |
| Магния, г | 30,0 | 34,2 | +4,2 |
| Калия, г | 118,0 | 262,8 | +144,8 |
| Сера, г | 38,0 | 38,2 | +0,2 |
| Железа, мг | 1210,0 | 3899,2 | +2689,2 |
| Меди, мг | 140,0 | 160,1 | +20,1 |
| Цинка, мг | 905,0 | 562,6 | -342,4 |
| Марганца, мг | 905,0 | 1717,2 | +812,2 |
| Кобальт, мг | 10,6 | 11,5 | +0,9 |
| Иод, мг | 12,1 | 17,1 | +5 |
| Каротина, мг | 680,0 | 909,1 | +229,1 |
| Витамина Д ₃ , тыс. МЕ | 15,1 | 15,9 | +0,8 |
| Витамина Е, мг | 605,0 | 1553,5 | +948,5 |

Выделение бактериальной ДНК

Протокол выделения ДНК «Power Soil® DNA Isolation Kit» (MO BIO). Предварительно 0,25 г. образца внесли в пробирки *PowerBead*. Осторожно вортексировали для смешивания. Добавили 60 мкл Раствора С1, перемешали несколько раз инвертированием. Гомогенизировали в горизонтальном положении на шейкере в течение 10 минут. Центрифугировали 30 секунд при 10 000 g. оборотах. Перенесли супернатант в чистые 2 мл микроцентрифужные пробирки (использованные пробирки прилагаются в наборе). Так как, супернатант все еще может содержать некоторые частицы образца, необходимо ожидать примерно 400-500 мкл супернатанта. Добавили 250 мкл Раствора С2, затем вортексировали в течение 5 секунд. Инкубировали при 4°C в течение 5 минут. Центрифугировали при комнатной температуре 10 000 g 1 минуту. Перенесли супернатант (не более чем 600 мкл.) в чистые 2 мл микроцентрифужные пробирки (использованные пробирки прилагаются в наборе) избегая захвата осадка. Добавили 200 мкл Раствора С3, краткое вортексирование. Инкубировали при 4°C в течение 5 минут. Центрифугировали при комнатной температуре 10 000 g 2минуты. Перенесли 750 мкл супернатанта

в чистую 2 мл микроцентрифужную пробирку (использованные пробирки прилагаются в наборе) избегая захвата осадка. Добавили 1200 мкл Раствора С4 (Раствор С4 перемешать перед использованием) к супернатанту, затем вортексировали 5 секунд. Примерно 675 мкл. перенесли в *Spin Filter* и центрифугировали при 10 000 g. 1 минуту при комнатной температуре. Повторить процедуру несколько раз до исхода образца. Затем добавили 500 мкл Раствора С5, центрифугировали при комнатной температуре 30 секунд при 10 000 g. Отобрали супернатант и отбросили. Центрифугировали при комнатной температуре 1 минуту при 10 000 g. Аккуратно переустановили *Spin Filter* в чистые 2 мл микроцентрифужные пробирки (использованные пробирки прилагаются в наборе). Избегать попадания Раствора С5 на фильтр. Добавили 100 мкл. Раствор С6 в центр мембранного фильтра. Альтернативно для элюции можно использовать стерильную ДНК свободную воду. Центрифугировали при комнатной температуре 30 секунд при 10 000 g. Отбросили *Spin Filter*. ДНК может храниться при -20°C или -80°C.

Генотипирование с использованием гена 16S rRNA

PCR амплификация проводилась с использованием праймеров: 8F - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG и 806R – GGACTACCAGGGTATCTAAT для определения нуклеотидных последовательностей. Отобрать необходимое количество микропробирок, стрипов или планшет для ПЦР, а также пробирки для приготовления реакционной смеси.

1. Плавно вортексируйте все компоненты ПЦР реакции (за исключением TaqPolymerase), осадите капли с крышки кратким центрифугированием в течение 5 сек при 1000-3000об/мин.

2. Приготовить реакционную смесь согласно прописи в таблице 2 ниже (соблюдайте последовательность), тщательно перемешивайте смесь:

Таблица 2 – Пропись с использованием ПЦР буфера без MgCl₂

| | |
|---|------|
| Вода (свободная от ДНКаз/РНКаз) | 13,8 |
| 10 x ПЦР буфер (без MgCl ₂) | 3,0 |
| MgCl ₂ 25mM* | 3,0 |
| dNTP 2 mM | 3,0 |
| Праймер прямой 10 pmol/μl** | 1,0 |
| Праймер обратный 10 pmol/μl | 1,0 |
| TaqPolymerase 5U/μl | 0,2 |
| * – конечный объем с пробой 30 μl; ** – при расчете на каждые 10 проб добавляйте еще одну на случаи ошибки пепетирования | |

Амплификация будет осуществляться в соответствии с условиями в соответствии с условиями стандартизованными в ходе работы. Кроме того, будет проведен гель электрофорез в 1,5% агарозном геле. Результаты будут задокументированы с помощью регистрации видео гелей «BIO-RAD».

Очистка ПЦР-продуктов (дефосфорилирование)

Дефосфорилирование 5'-концевых фосфатных групп в прошедшей амплификацию реакционной смеси проводили в ходе инкубации с 0,5 ед.

щелочной фосфатазы арктических креветок (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) в течение 30 мин при температуре 37°C и последующей инактивации фермента прогреванием в течение 10 мин при температуре 85°C.

Определение прямой нуклеотидной последовательности

Определение прямой нуклеотидной последовательности была проведена по методу Сэнгера с применением набора “BigDye Terminator v 3.1 Cycle sequencing Kit” таблица 3 [61, р. 201-204].

Очистка реакционной смеси от не связавшихся нуклеотидов

Очистку реакционной смеси от не связавшихся компонентов проводили ацетатно-спиртовой смесью.

Ацетатно-спиртовая смесь (40 мкл):

3М CH₃COONa (рН 4,6-5,2) - 1,5 мкл.

C₂H₅OH (95%) – 31,3 мкл.

dH₂O – 7,25 мкл.

1. 40 мкл ацетатно-спиртовой смеси вносили в каждую пробирку, перемешивали. Выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали при 13200 об/мин 30 мин.

2. Супернатант удаляли, к осадку добавляли 80 мкл C₂H₅OH (75%), перемешивали, затем центрифугировали при 13200 об/мин 30 мин.

3. Супернатант удаляли, осадок подсушивали при комнатной температуре в течение 15 мин.

4. Затем добавляли Hi-Di Formamida (Applied Biosystems) по 14 мкл. Выдерживали в течение 20 мин при комнатной температуре.

5. денатурировали при 95°C – 2 мин; охлаждали во льду в течение 5 мин.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационная работа выполнена на кафедре «Ветеринарной санитарии» в АО Казахском агротехническом университете им. С. Сейфуллина (АО КАТУ), на базе Назарбаев Университет в лаборатории ТОО «Экостандарт.kz».

В диссертации обобщены результаты научно-исследовательской работы в период 2015-2018 гг., проведенных в соответствии с планом научно-исследовательских работ АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина», по теме «Ветеринарно-санитарная оценка молочной продукции при использовании химических и биологических средств для санации помещений». Схема исследований представлена на рисунке 3 [65, р. 673-761].

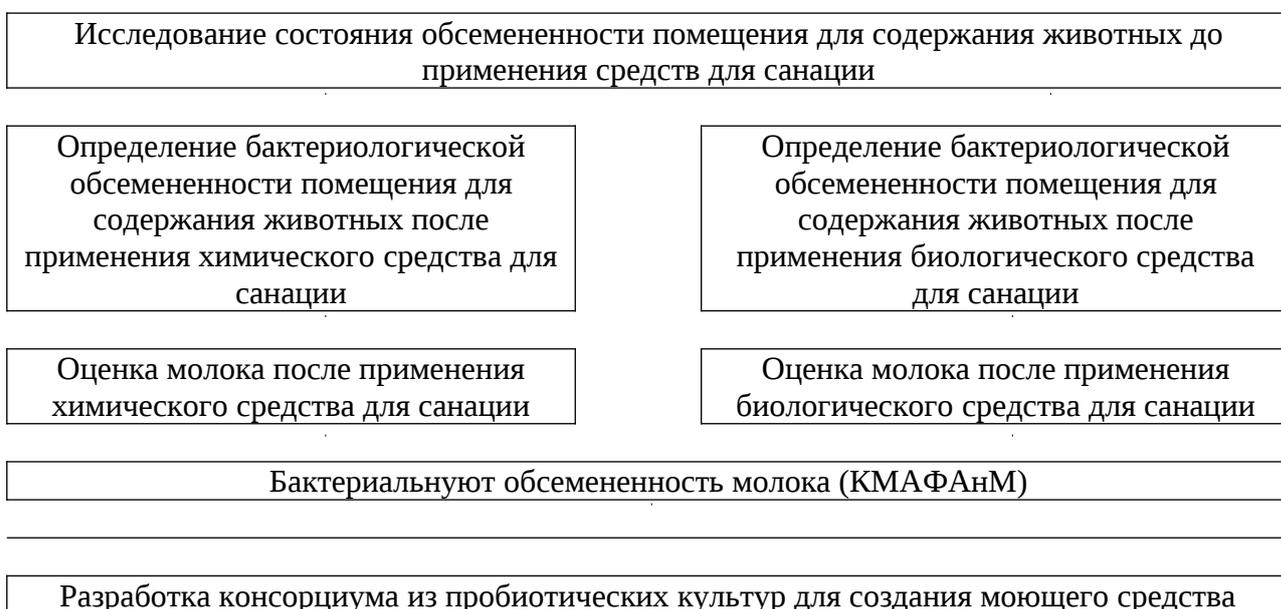


Рисунок 3 – Схема исследований

Используемые материалы для исследования данной работы смывы с мест содержания животных, образцы молока и молочных продуктов, полученных от животных, при содержании которых применялись биологические средства санации и сельскохозяйственные животные. В ходе выполнения диссертационной работы были использованы органолептические, физико-химические и статистические методы исследований.

Характеристика базового хозяйства

ТОО АФ «Родина» – это многопрофильное развитое сельхозформирование, где применяются самые современные технологии, а союз науки и практики позволяет получить отличные результаты. Хозяйство вносит достойный вклад в формирование продовольственного пояса столицы и реализацию концепции продовольственной безопасности страны. Расположение объектов животноводческого хозяйства ТОО АФ «Родина»

представлено снимке со спутника в соответствии с рисунком 2.

Из них ежегодно по ветеринарной отчетности фиксируется заболевшими маститом 25-30 коров.

На молочно-товарной ферме ТОО АФ «Родина», с целью проведения мониторинга микробной обсеменности и производственных опытов, направленных на улучшение качества молока коров сформировали 3 группы по 20 голов в соответствии со схемой проведения исследований (рисунок 1), приведенной в разделе «Место, сроки и условия проведения опытов».

В начальном этапе производственных опытов провели исследования качества молока коров двух опытных и одной контрольной групп.

Животноводческий комплекс ТОО АФ «Родина», благополучны по инфекционным и инвазионным заболеваниям. Ежегодно поголовье коров исследуется на туберкулёз, бруцеллез, лейкоз. Четыре раза в год коров обследуют на наличие субклинического мастита и больных подвергают лечению.

Последовательность действий при проведении исследования показана в виде схемы в соответствии с рисунком 3.

3.1 Мониторинг и оценка микробной обсеменности животноводческих помещений до и после применения химических и биологических средств дезинфекции

3.1.1 Изучение микробной обсеменности, проведенных до и после дезинфекции помещений для содержания коров

В данной работе мы изучили общую микробную обсеменность поверхностей помещения. При исследовании микробной обсеменности, проведенных до дезинфекции помещений для содержания коров, установили, что большее количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов обнаружено в смывах поверхностей пола и металлических перегородках помещения в соответствии с рисунком 4.

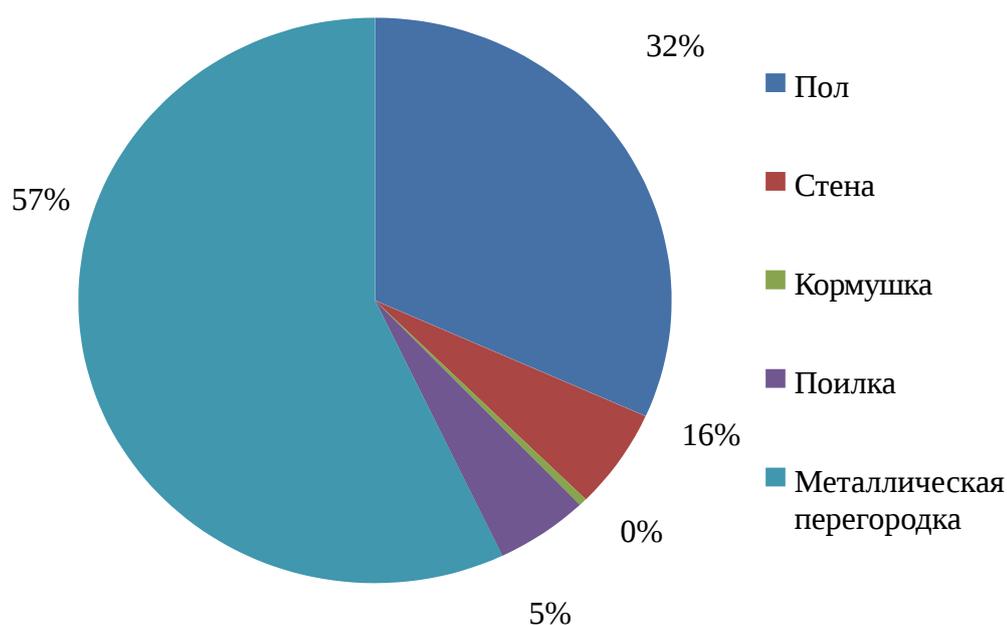


Рисунок 4 – Микробная обсемененность мест содержания животных до использования средств для санации

Наименьшее число содержания бактериальной обсемененности отмечено на поверхностях поилок, кормушек и стен. Количественный состав микроорганизмов до использования дезинфекционных средств, представляется следующим образом в таблице 3.

Таблица 3 – Количественный состав микрофлоры исследуемых поверхностей до проведения обработки дезсредством

| Объект | Количество микроорганизмов на 1см ² , КОЕ |
|---------------------------|--|
| Пол | 7*10 ⁵ |
| Стена | 10*10 ⁴ |
| Кормушка | 8*10 ³ |
| Поилка | 9*10 ⁴ |
| Металлическая перегородка | 8*10 ⁵ |

До начала работы проанализировали качественное содержание исследуемой поверхности. Были отобраны смывы исследуемых образцов, затем были посеяны на чашки Петри со средой МПА, MRS-4.

Разновидности микроорганизмов выделенных из образцов, отобранных в животноводческом помещении до использования дезинфицирующего средства, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Качественный состав микрофлоры исследуемых поверхностей

| Наименования выделенных микроорганизмов | Наименование объектов ветеринарного надзора | | | | |
|---|---|----------|--------|-------|---------------------------|
| | пол | кормушка | поилка | стена | металлическая перегородка |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Pr. Mirabilis</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Pr. Vulgaris</i> | + | + | + | + | + |
| <i>B. coagulans</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Ent. Faecalis</i> | + | + | + | + | + |
| <i>B. mycoides</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Enterobacter</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Klebsiella pneumonia</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | + | + | + | + | + |
| <i>E. coli</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Pseudomonas</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Myroides odoratus</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Streptococcus</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Staphylococcus aur.</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Lactobacillus.</i> | + | + | + | + | + |

В таблице 10 можно увидеть содержание поверхности животноводческого помещения до использования дезинфицирующего средства. В частности данная микрофлора состоит из грамм положительных и грамм отрицательных микроорганизмов. Видовой состав микроорганизмов, животноводческого помещения до использования дезинфицирующего средства представлен следующим образом: *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeryginosa*, *Mycoides odoratus*, *Pseudomona scomposti*, *Pseudomonas mendocina*, *Lactobacillus sp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus coagulans*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus mycoides*, *Enterobacter sp*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*,.

Проводили сравнительный анализ исследуемых микроорганизмов выделенных из поверхностей животноводческого помещения после обработки дезинфицирующими химическим препаратом «Кристалл-900 и пробиотическим препаратом «Pip House Cleaner» в таблице 4.

Таблица 4 – Количественный состав микрофлоры исследуемых поверхностей после проведения обработки дезсредством

| Объект | Количество микроорганизмов на 1см ² , КОЕ | | |
|----------|--|-------------------|-------------------|
| | до обработки | после обработки | |
| | | Кристалл-900 | Pip House Cleaner |
| Пол | 7*10 ⁵ | 6*10 ⁵ | 3*10 ⁵ |
| Стена | 10*10 ⁴ | 5*10 ⁴ | 5*10 ⁴ |
| Кормушка | 8*10 ³ | 4*10 ³ | 4*10 ³ |
| Поилка | 9*10 ⁴ | 3*10 ⁴ | 3*10 ⁴ |

| | | | |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Металлическая перегородка | $8 \cdot 10^5$ | $4 \cdot 10^5$ | $4 \cdot 10^5$ |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|

В таблице 11 можно увидеть снижение числа микробов во время применения исследуемых дезинфицирующих средств. Снижение числа микробов происходило в некоторых случаях в 2 раза (микробная обсеменность стен, кормушек, металлических перегородок), в 3 раза – поилок.

Различие в действенности средств дезинфекции обнаружили во время обработки пола, из этого следует, что препарат «Рip House Cleaner» показал наиболее высокое бактерицидное влияние, чем «Кристалл-900».

По рисункам 5 и 6 можно увидеть обсеменность микроорганизмов после применения средств дезинфекции.

Количество микроорганизмов на 1см^2 , КОЕ

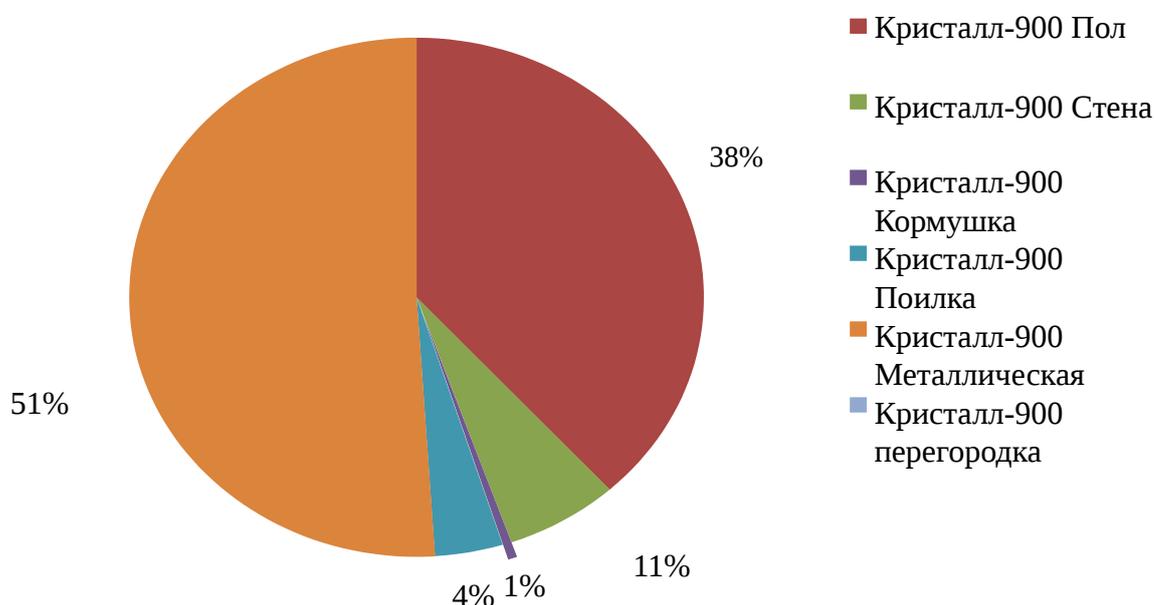


Рисунок 5 – Микробная обсеменность мест содержания животных после применения средств Кристалл-900

Диаграмма (рисунок 5) показывает, что обсеменность микроорганизмов высокая в образцах с пола и металлических перегородок, это металлических перегородок 51, пола 38% от общей обсеменности микроорганизмов.

При выполнении данной работы определили, что обработка дезинфицирующим препаратом поверхностей оказывает значительное влияние на общее число микроорганизмов.

Из таблицы 4 видно, что общее число микроорганизмов сократилось, наибольшая обсеменность выявлена в смывах с поверхностей стен, а наименьшее количество микроорганизмов было обнаружено в смывах с поилок. При выполнении данной работы выяснилось, что дезинфицирующий препарат

оказывает значительное действие на общее число микроорганизмов. В таблице 11 указано, что сократилось общее число микроорганизмов. Наибольшая обсемененность в образцах с поверхностей стен, а наименьшее число микроорганизмов было обнаружено в образцах с поилок. И так, применяемые препараты оба оказались действенными, но в результате проведенного сравнительного анализа выяснилось, что против микробные способности пробиотического препарата «PiP House Cleaner» выше чем у химического препарата.

Количество микроорганизмов на 1см², КОЕ

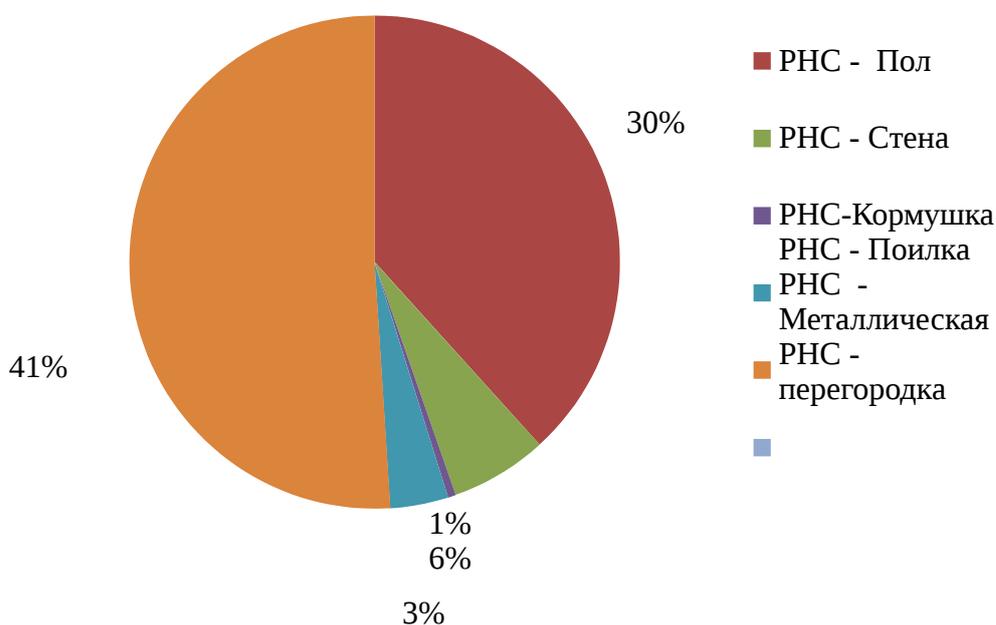


Рисунок 6 – Микробная обсемененность мест содержания животных после применения средств для санации «PiP House Cleaner» (PHC)

Как мы видим на рисунке 6, обсемененность микроорганизмов в образцах с поверхностей пола и металлических перегородок выше, что составляет 41% от общей микробной обсемененности металлических перегородок, 30% пола. Это на 10 и 8% результатнее показателей действия препарата «Кристалл-900».

Во время выполнении данной работы выяснилось, что дезинфицирующий препарат оказывает значительное действие на общее число микроорганизмов. В таблице указано, что сократилось общее число микроорганизмов. Наибольшая обсемененность в образцах с поверхностей стен, а наименьшее число микроорганизмов было обнаружено в образцах с поилок. И так, применяемые препараты оба оказались действенными, но в результате проведенного сравнительного анализа выяснилось, что против микробные

способности пробиотического препарата «Pip House Cleaner» выше чем у химического препарата.

3.1.2 Эффективность применения химических и биологических средств дезинфекции

При изучении эффективности применения химических и биологических средств дезинфекции в сравнительном аспекте в помещениях молочных ферм в качестве дезинфицирующих средств нами были испытаны химический препарат «Кристалл-900», и пробиотический препарат PIP House Cleaner.

«Кристалл-900» выпускается в виде прозрачной голубой, пенистой жидкости, в которых действующим веществом является глутаровый альдегид, глиоксалевый альдегид, бензалкония хлорид.

Препарат «PIP House Cleaner» представляет собой водный раствор без запаха, котрый состоит из пробиотического культуры штамма *Bacillus subtilis*.

Указанный препарат Кристалл-900 имеет Свидетельство о государственной регистрации, Сертификаты соответствия, занесены в государственный реестр и применяются в качестве дезинфицирующих средств. Учитывая вышеизложенное, а также положительные результаты, полученные при их применении, нами были проведены исследования по возможности использования этих препаратов для профилактической дезинфекции объектов животноводческого хозяйства молочного направления.

Концентрацию и время выдержки производственных препаратов брали в соответствии с инструкциями по применению данных дезинфицирующих средств.

Изучение эффективности производственных препаратов проводились с экспозицией 48, 72, 96, 240 часов и 30 дней.

Эффективность препаратов определяли путем смыва поверхностей полов, стен, кормушек, поилок и железных перегородок с мест содержания животных.

После механической очистки провели дезинфекцию их раствором дезинфицирующего химического средства Кристалл-900 и пробиотического моющего средства Pip House Cleaner.

Дезинфекцию поверхностей объектов ветеринарного надзора полов, стен, кормушек, поилок и железных перегородок проводили растворами Кристалл-900 и PipHouseCleaner путем крупнокапельного орошения (опрыскивания) без протирания поверхностей.

Предполагаемый экономический эффект рассчитывали методом приведенных затрат.

Статистическую обработку результатов исследований проводили методом вариационной статистики с вычислением средней арифметической величины (M) и средней ошибки ($\pm t$) (П. Рокитский, 1961).

Бактериологические исследования животноводческих помещений. Оценку бактериологической обсемененности животноводческих помещений проводили ежеквартально путем осаждение микроорганизмов из воздуха на

поверхность чашки Петри с плотной питательной средой (МПА, Эндо, Сабуро). Бактериальную обсемененность помещений (стена, пол, перегородки) проводили методом отбора смыва пробы из поверхности стен, пола и оградки.

Учет выросших колоний проводили после термостатирования при температуре 37,0°C в течение от 2 до 7 суток и подсчете числа колоний микроорганизмов, выросших на поверхности. Количество микробных клеток вычисляли путем умножения среднего количества выросших колоний в трех чашках Петри на степень разбавления (1:10; 1:100).

3.1.3 Изучение влияния применения химических и биологических средств дезинфекции в помещениях молочных ферм

Для изучения влияния применения химических и биологических средств дезинфекции в помещениях молочных ферм на заболеваемость коров маститом, нами предварительно было проведено обследование поголовья животных на субклинический мастит.

Всего было подвергнуто исследованию 60 голов ТОО АФ «Родина».

Диагностику субклинического мастита у лактирующих коров проводили в следующей последовательности: наружный осмотр и пальпация молочной железы, пробное сдаивание с органолептической оценкой секрета, лабораторное исследование секрета.

При осмотре молочной железы определяли состояние кожных покровов, форму вымени, степень развития долей, величину и форму симметричных долей вымени, величину и расположение сосков.

Пальпацией определяли наличие болезненности, местную температуру на симметричных участках молочной железы, консистенцию органа до и после доения. При пальпации надвыменных лимфоузлов учитывали их величину, подвижность, консистенцию, болевую чувствительность в соответствии с рисунками В.1 и В.2 в (Приложение В).

Субклинический мастит у лактирующих коров диагностировали с помощью раствора Калифорнийского мастит-теста и молочно-контрольной пластины. Пробы секрета брали в конце доения.

В качестве реактивов использовали физиологический раствор натрия хлорида, 2%-ный водный раствора Калифорнийский мастит-тест.

Для изучения влияния дезинфекции помещений химическими и пробиотическими препаратами на развитие субклинического мастита, нами были подобраны три группы коров, по 20 голов в группах с применением дезинфектантов и контрольная группа из 21 животного.

Перед обработкой нами были взяты пробы молока на определение соматических клеток. Во всех группах их содержание превышало 500 тыс в 1 см³, что указывает на примесь маститного молока (до 30%). Количество соматических клеток в пробах молока определяли на молочном анализаторе ЕКОМІLK АМВ- 1-03.

Исследование молока проводили через 48 ч, 72 ч, 96 ч, 240 ч, 30 дней при

испытании дезинфицирующих средств в помещениях.

3.2 Определение качественных показателей молока при применении химических и биологических средств дезинфекции

При определении качественных показателей молока при применении химических и биологических средств дезинфекции нами были изучены физико-химические показатели молока коров у которых диагностировали субклиническую форму мастита, после применения дезинфицирующих препаратов в помещениях в течении 10 дней.

Все исследования проводились согласно требований государственного стандарта СТ РК 1760-2008 «Молоко коровье. Технические условия».

Отбор проб молока для определения физико-химических и органолептических показателей осуществляли по ГОСТ Р ИСО 707-2010 «Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб».

Анализ молока производят сразу после отбора пробы.

Контроль качества молока по физико-химическим показателям проводится путем анализа объединенной пробы для каждой партии продукции.

При физико-химическом анализе молока нами были определены следующие показатели: кислотность, плотность, жирность, содержание общего белка, лактозы. Кроме того, была определена общая бактериальная обсемененность молока.

Физико-химические показатели молока были исследованы на аппарате «ЕСОМІLK», определение общей бактериальной обсемененности молока проводили по редуктазной пробе согласно ГОСТ 9225-84. Внешний вид анализатора представлен на рисунке 7.

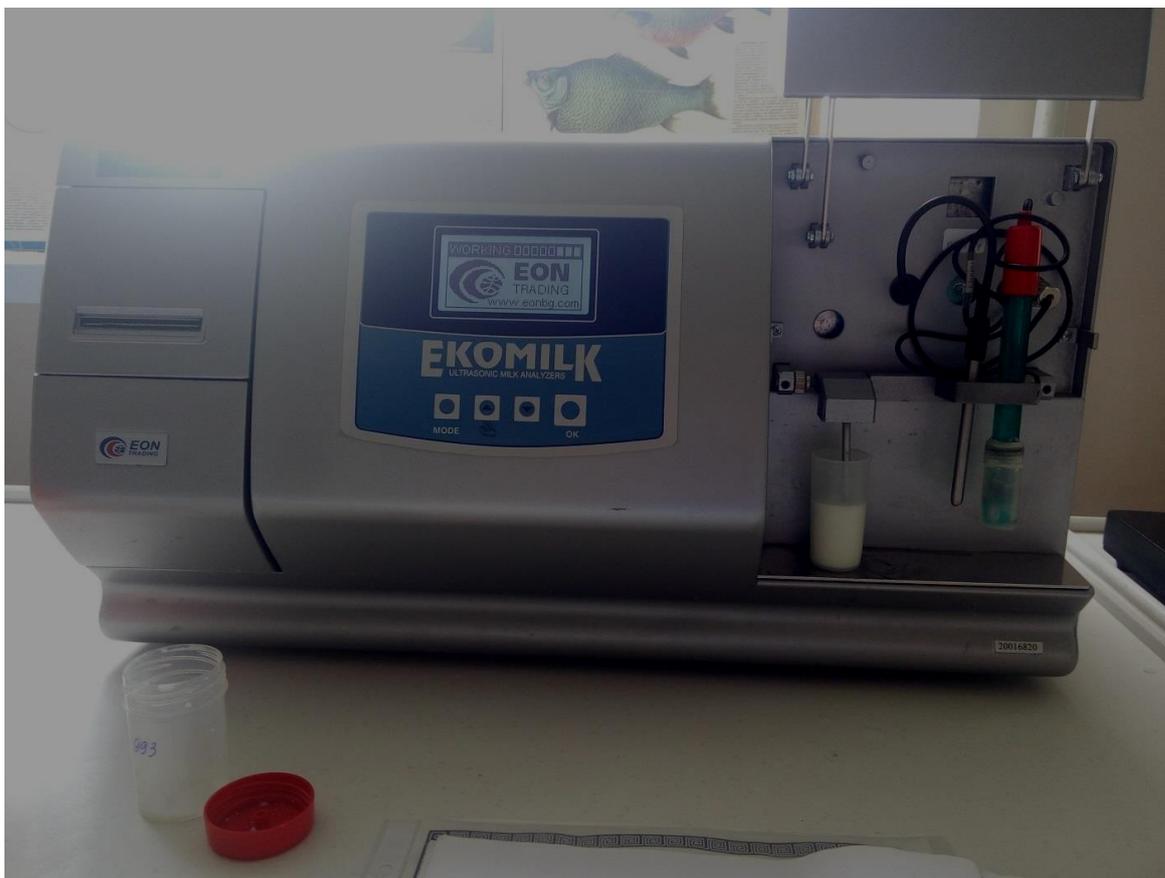


Рисунок 7 – Анализатор ECOMILK

Технические условия» является хорошим сырьем для молокоперерабатывающих предприятий. Согласно требованиям этих нормативных документов молоко определяется по органолептическим, физико-химическим, микробиологическим показателям. Выявили, что молоко, заготавливаемое на молочно-товарной ферме, не имеет посторонних запахов и привкусов, цвет и консистенция молока соответствуют предъявляемым требованиям.

Анализатор ECOMILK– применяется для измерения массовой доли (м.д.) жира, белка, плотности (приведенной к 20°C), сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО), кислотности (рН) и титрируемой кислотности (Тн в цельном, консервированном, пастеризованном, стерилизованном, концентрированном (сгущенном без сахара) молоке.

Анализатор применяется для индикации значений измеренных физических величин а также: точки замерзания, удельной электрической проводимости, лактозы, массовой доли добавленной воды в пробе, которая исследуется.

Анализатор используется для экспресс-определения показателей качества молока, продуктов его переработки и контроля параметров технологических молочных смесей, которые не содержат сахара и солей (хлорида натрия, хлорида кальция и др.), в измерительных лабораториях предприятий пищевой

промышленности, при проведении научно - исследовательских работ, в ветеринарных лабораториях, на молочных фермах и молокоприемных пунктах при приемке и переработке молока.

Технические характеристики:

- быстрый анализ молока - возможность измерения параметров большого числа проб;
- легкая конструкция, удобные, портативные;
- экономичность;
- расходуют мало электроэнергии;
- требуют очень малого количества молока для анализа - 25 куб.см;
- не требуют химических реактивов;
- возможность подключения к компьютеру - интерфейс rs232;
- возможность подключения к принтеру с серийным интерфейсом;
- возможность автоматизированного сбора данных (по договоренности с клиентом) - прибор сохраняет в своей энергонезависимой памяти код поставщиков и данные (количество и качество поставляемого ими молока). максимальное число поставщиков – 200;
- время измерения – 30-180 сек., зависит от типа «екомилк»

Определение бактериальной обсемененности. Пробы для микробиологических анализов отбирают в стерильную посуду с помощью стерильных приспособлений, которые каждый раз перед использованием должны быть простерилизованы фламбированием или в автоклаве.

Ход анализа: для проведения редуцтазной пробы из объединенной пробы молока выделяют пробу объемом 50-60 см³.

В пробирки выливают по 1 см³ рабочего раствора резазурина и по 10 см³ исследуемого молока, закрывают резиновыми пробками и смешивают путем медленного трехкратного перевертывания пробирок. Пробирки помещают в редуцтазник с температурой воды 37±1°C.

Вода в редуцтазнике после погружения пробирок с молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше. Пробирки с молоком и резазурином на протяжении анализа должны быть защищены от света прямых солнечных лучей. Время погружения пробирок в редуцтазник считают началом анализа. Показания снимают через 1 час.

3.2.1 Физико-химические свойства молока коров

Молоко, отвечающее требованиям ГОСТ 31449-2013«Молоко коровье сырое». Технические условия» является хорошим сырьем для молокоперерабатывающих предприятий. Согласно требованиям этих нормативных документов молоко определяется по органолептическим, физико-химическим, микробиологическим показателям. Выявили, что молоко, заготавливаемое на молочно-товарной ферме, не имеет посторонних запахов и привкусов, цвет и консистенция молока соответствуют предъявляемым требованиям.

Молочный жир рассматривается как ценная составная часть молока, которую связывают с количеством белка. Содержание жира и удой молока увеличиваются с возрастом животного, а затем постепенно уменьшаются. Массовая доля жира в молоке коров в основной период исследования представлена на рисунке 8.

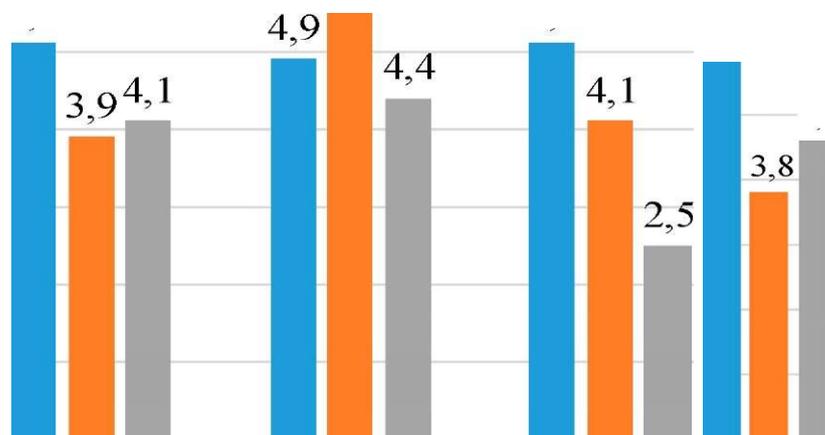


Рисунок 8 – Массовая доля жира в молоке коров, %

Жирность молока коров в среднем составила в 1 опытной группе – 4,70%, во 2 опытной группе – 4,60%, в 3 контрольной группе – 4,46%. Требования ГОСТ 31449-2013 «Молоко коровье сырое» по массовой доле жира не менее 2,8%.

Массовая доля белка является важным показателем качества молока. Массовая доля белка в молоке коров опытных и контрольной групп представлены на рисунке 9.

Массовая доля белка в молоке коров за период проведения исследований составила в 1 опытной группе - 3,29%, во 2 опытной группе - 3,28%, в 3 контрольной группе - 3,30%. По требованиям ГОСТ 31449-2013 «Молоко коровье сырое. Технические условия» массовая доля белка должна быть не менее 2,8%. Таким образом, массовые доли жира и белка соответствуют современным требованиям.

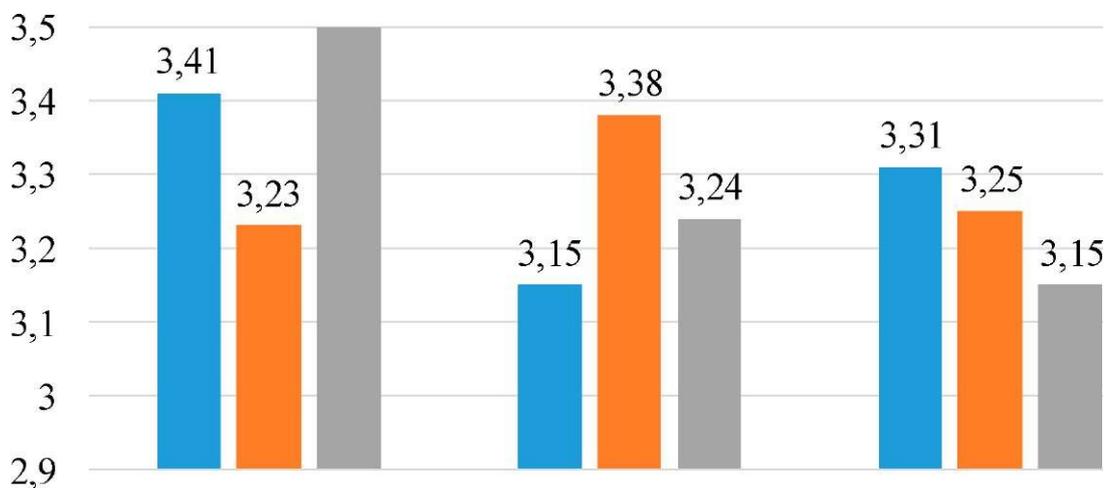


Рисунок 9 – Массовая доля белка в молоке коров, %

Примечание – начало опытов середина опытов конец опытов ■ 1 опытная группа ■ 2 опытная группа ■ 3 контрольная

Важным показателем качества является массовая доля сухих обезжиренных веществ в молоке коров (рисунок 10).

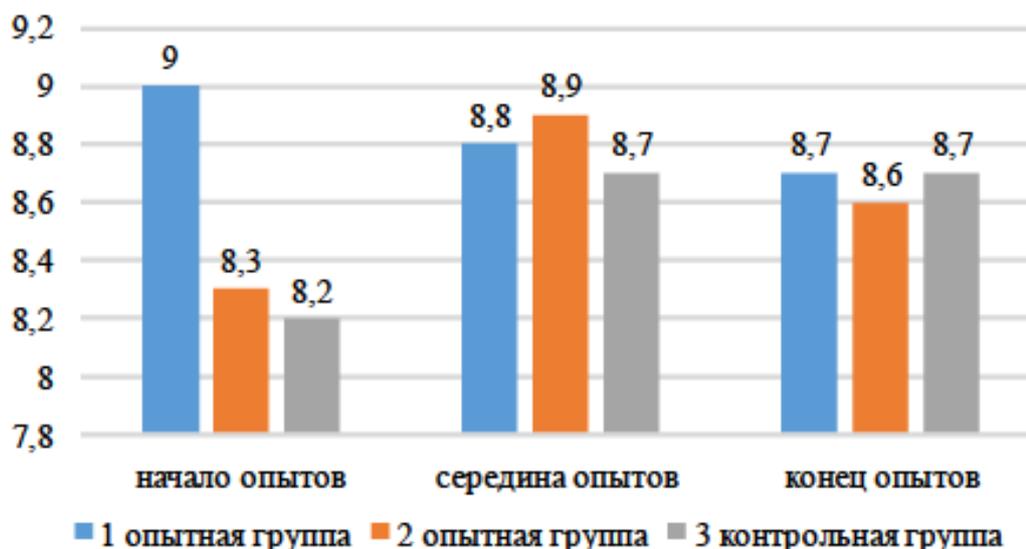


Рисунок 10 – Массовая доля сухих обезжиренных веществ в молоке коров, %

Примечание – начало опытов середина опытов конец опытов ■ 1 опытная группа ■ 2 опытная группа ■ 3 контрольная группа

За период проведения исследований выявили, что в молоке коров 1 опытной группы массовая доля сухих обезжиренных веществ составляет - 8,8%, 2 опытной группы - 8,6% и 3 контрольной группы - 8,5%. Допустимый уровень СОМО по НД составляет не менее 8,2%.

Кислотность является показателем качества молока. Молоко имеет кислотность в пределах 16-20°Т, его отклонение от нормы может указывать на различные заболевания коров.

Плотность молока - показатель, по которому судят о натуральности продукта. Плотность натурального молока изменяется в пределах 1027-1033 кг/м. Плотность молока определяется: химическим составом молока (понижается при увеличении содержания жира и повышается при увеличении количества солей, белков, лактозы); соблюдением правил определения показателя (не ранее чем через 2 часа после дойки, в противном случае значение показателя занижается на 0,8-1,5 кг/м); стадией лактации (плотность молока 1037-1055 кг/м³); состоянием здоровья животных (плотность молока, полученного от животных, больных маститом, составляет 1024-1025 кг/м³).

В наших исследованиях плотность молока коров 1 опытной группы составила 1028,9 кг/м, 2 опытной группы-1029 кг/м, в 3 контрольной группы - 1029 кг/м (рисунок 11).

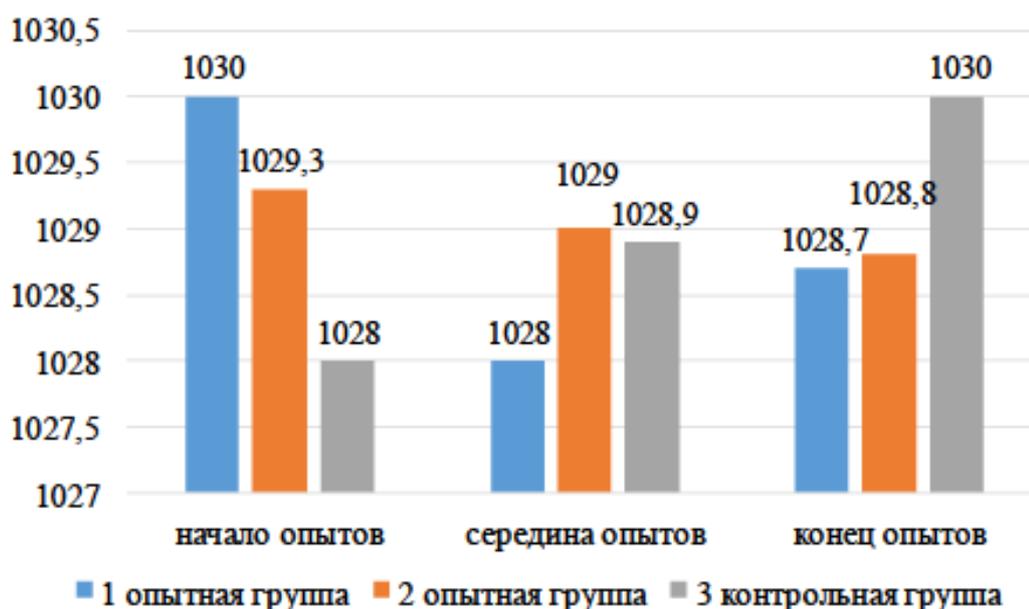


Рисунок 11 - Плотность молока коров, кг/м

Примечание – начало опытов середина опытов конец опытов 1 опытная группа ■ 2 опытная группа ■ 3 контрольная группа

3.2.2 Диагностика мастита коров прибором «Маститон»

Микробиологическое исследование молока является необходимым условием для проведения профилактических программ. В молоке от здоровых коров наблюдается небольшой процент соматических клеток. В группу соматических клеток входят лейкоциты, макрофаги и нейтрофилы. Лейкоциты, макрофаги и нейтрофилы созданы для борьбы с инфекцией, их

количество резко возрастает при возникновении воспалительных процессов в организме животного. Кроме того, есть группа лейкоцитов, которые действуют как координаторы мер для борьбы с бактериальными инфекциями. Соматические клетки в молоке производятся иммунной системой, кроме отживших секреторных клеток железистого эпителия. На молочно-товарной ферме ТОО АФ «Родина» используют молочно-контрольные пластинки (МКП-1) и реактивы (2% раствор мастидина, 5% раствор димастина, мастоприма, 2% раствор мастотеста или калифорнийский тест). Для диагностики субклинического мастита из каждой доли молочной железы выдаивается по 1 мл молока, а затем по 1 мл реактивов, при помощи стеклянной палочки смешивают молоко и реактив в лунках. Учет реакции проводят в течение 15-20 сек. Образование желеобразного сгустка, хорошо выбрасываемого палочкой из луночки пластинки при перемешивании или изменение цвета смеси характеризует воспалительный процесс в молочной железе. Экспресс-тест является простым и экономичным способом для выявления мастита инфицированной доли вымени на ранних стадиях заболевания. Состояние здоровья молочной железы оценивали по количеству

соматических клеток в пробах молока от каждой коровы с применением экспресс теста и показателем индикатора мастита «Маститон» производства фирмы ООО НПП «Биомер», г. Новосибирск (рисунок 12).

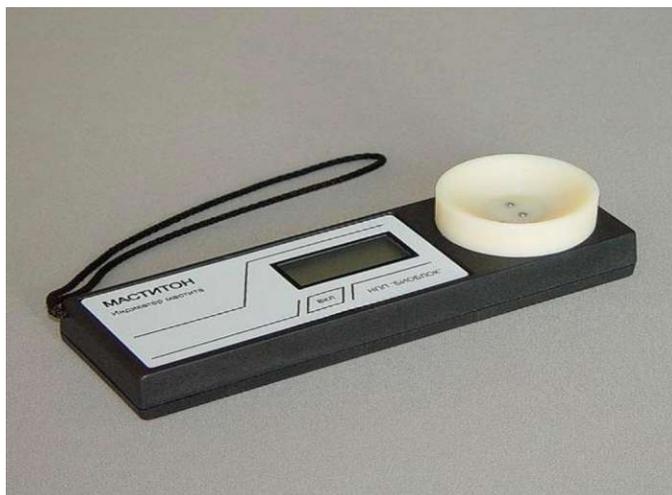


Рисунок 12 - Внешний вид индикатора «Маститон»

Для выявления заболевания коров маститом в 1, 2 опытной и 3 контрольной группах провели исследования молока при помощи индикатора мастита «Маститон». Индикатор мастита «Маститон», благодаря высокой чувствительности, позволяет выявить субклинический мастит. Индикатор работает на принципе измерения электрического сопротивления.

Молоко в воспаленном вымени, характеризуется повышенным содержанием соли, что вызывает его низкую сопротивляемость. Индикатор с подсветкой позволяет работать при слабом освещении в доильном зале. Для проведения исследования требуется 15-20 мл молока. Необходимо сдоить первые порции молока на чашу прибора. Только первые порции молока будут самыми точными.

В наших исследованиях применение «Маститона» осуществляли в соответствии с разработанной производителем инструкцией.

Шкала показаний прибора обладает широкой градацией, что позволяет получить правдоподобные результаты исследования. Показания устройства имеют следующую расшифровку:

- значение в 450 ед. и менее свидетельствует о том, что взятый образец высокого качества, вероятность присутствия заболевания минимальна;
- от 450 до 600 баллов - допустима возможность образования инфекции закрытого типа;
- выше 600 показывает, что ситуация обострена, весьма вероятен переход в клиническую форму.

До использования пробиотических средств провели исследования первых струек молока коров 1, 2 опытной и 3 контрольной групп. Результаты исследований по выявлению субклинического мастита коров опытных и

контрольной группах приведены в таблицах 5, 6 и 7.

Таблица 5 – Результаты исследования молока индикатором «Маститон» до использования средств для санации, 1 опытная группа

| № коров | Доли вымени коров | | | | M±m |
|---------|-------------------|----------------|---------------|--------------|--------------|
| | правая передняя | левая передняя | правая задняя | левая задняя | |
| 1 | 734 | 641 | 600 | 530 | 626,25±42,60 |
| 2 | 945 | 736 | 710 | 643 | 758,50±65,18 |
| 3 | 501 | 430 | 553 | 589 | 518,25±34,50 |
| 4 | 401 | 544 | 531 | 433 | 477,25±35,50 |
| 5 | 670 | 634 | 704 | 715 | 680,75±18,29 |
| 6 | 714 | 755 | 644 | 603 | 679,00±34,15 |
| 7 | 945 | 883 | 894 | 955 | 919,25±18,01 |
| 8 | 433 | 457 | 488 | 402 | 445,00±18,22 |
| 9 | 350 | 367 | 280 | 301 | 324,50±20,38 |
| 10 | 244 | 365 | 226 | 289 | 281,00±30,97 |

Таблица 6 – Результаты исследования молока индикатором «Маститон» до использования средств для санации, 2 опытная группа

| № коров | Доли вымени коров | | | | M±m |
|---------|-------------------|----------------|---------------|--------------|---------------|
| | правая передняя | левая передняя | правая задняя | левая задняя | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | 1318 | 1145 | 1189 | 1256 | 1227,00±37,95 |
| 2 | 350 | 389 | 402 | 280 | 355,25±27,40 |
| 3 | 233 | 256 | 203 | 289 | 245,25±18,17 |
| 4 | 465 | 501 | 478 | 499 | 485,75±8,65 |

Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----|-----|-----|-----|-----|--------------|
| 5 | 134 | 241 | 189 | 174 | 184,50±22,12 |
| 6 | 945 | 978 | 844 | 801 | 892,00±41,62 |
| 7 | 750 | 678 | 756 | 889 | 768,25±43,97 |
| 8 | 134 | 189 | 104 | 90 | 129,25±21,92 |
| 9 | 777 | 457 | 563 | 344 | 535,25±92,15 |
| 10 | 156 | 90 | 467 | 233 | 236,50±82,20 |

Таблица 7 – Результаты исследования молока до использования средств для санации, 3 индикатором «Маститон» контрольная группа

| № коров | Доли вымени коров | | | | M±m |
|---------|-------------------|----------------|---------------|--------------|--------------|
| | правая передняя | левая передняя | правая задняя | левая задняя | |
| 1 | 389 | 389 | 381 | 329 | 372,00±14,45 |
| 2 | 750 | 756 | 465 | 801 | 693,00±76,84 |

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|---------------|
| 3 | 134 | 104 | 134 | 889 | 315,25±191,38 |
| 4 | 777 | 563 | 945 | 90 | 593,75±185,21 |
| 5 | 156 | 467 | 750 | 344 | 429,25±124,57 |
| 6 | 644 | 345 | 600 | 550 | 482,50±31,43 |
| 7 | 501 | 400 | 478 | 551 | 1242±45,63 |
| 8 | 1323 | 1145 | 1318 | 1185 | 129,25±21,92 |
| 9 | 844 | 444 | 756 | 801 | 711,25±90,15 |
| 10 | 1234 | 956 | 1034 | 1167 | 1097,75±62,20 |

В 1 опытной группе выявили 2 коровы с возможностью образования инфекции закрытого типа и 5 голов с вероятностью перехода в клиническую форму.

Выявили, что во 2 опытной группе у 50% коров есть признаки скрытого мастита, так как показания прибора «Маститон» превышают 450 единиц.

По результатам исследований на приборе «Маститон» выявили, что у 7 коров 3 контрольной группы проявляются признаки скрытого мастита.

Таким образом, прибор «Маститон» является эксперсс-анализатором и позволяет своевременно выявить субклинический мастит коров.

3.3 Мероприятия по снижению содержания микроорганизмов и соматических клеток в молоке коров

3.3.1 Обработка помещения для содержания коров пробиотическим средством PIP Hause Cleaner и химическим Кристалл-900

Современные требования к качеству молока коров ставят жесткие требования по микробной обсемененности молока и количеству соматических клеток. В связи с этим актуальным является проведение мероприятий по улучшению санитарно-гигиенического состояния помещений где содержатся коровы.

Молоко коров молочной фермы ТОО АФ «Родина» по органолептическим и физико-химическим показателям соответствует ГОСТ 31449-2013 «Молоко коровье сырое. Технические условия». Однако в весенне-летний период КМАФАнМ и количество соматических клеток в молоке не всегда соответствует современным требованиям. На наш взгляд это вызвано тем, что в хозяйстве для преддоильной обработки вымени ограничиваются использованием теплой воды температурой 40-45°C. В ведре с водой смачивают салфетку, которым обмывают соски вымени коровы, вытирают отжатой салфеткой и подсоединяют доильные стаканы. Затем прополаскивают салфетку и обтирают соски и вымя у другой коровы и т.д. Вода сильно загрязняется, тем самым являясь источником патогенной микрофлоры. Риск заболевания маститом в таком случае очень велик, так как происходит увеличение количества микроорганизмов в воде. Через открытый сосковый канал патогенная микрофлора проникает в вымя, вызывая мастит. Для решения этой задачи нами были проведены санитарно-гигиенические мероприятия с использованием пробиотических средств PIP Hause Cleaner.

Пробиотики – это безопасные и полезные бактерии, оказывающие положительный эффект на здоровье людей и животных. Умение подбирать и использовать положительные бактерии для колонизации патогенной флоры привело к созданию нового класса продуктов – моющих пробиотиков.

Попадая на благоприятную поверхность, многие бактерии начинают формировать биопленку, обеспечивающую защитный механизм от негативных условий окружающей среды. Биопленка (колония) формируется одним либо многими видами микроорганизмов. Формирование занимает от нескольких часов до нескольких дней. В биопленке бактерии выдерживают до 1000 раз больше воздействие антибиотика, чем доза, смертельная для свободной бактерии. Биопленка поддерживает благоприятную для размножения бактерий среду. При нанесении на поверхность непатогенные бактерии, содержащиеся в пробиотических очистителях, заселяют ее конкурентоспособными штаммами пробиотиков, осуществляющих неспецифический контроль над численностью условно-патогенной и патогенной флоры путем вытеснения ее с поверхности.

Бактерии, содержащиеся в моющих средствах не являются патогенными, не вырабатывают биопленки и выделяют ферменты, разлагающие биопленку, созданную патогенными бактериями. Лишенные биопленки условно патогенные (становящиеся патогенными при увеличении их количества или процентного соотношения по сравнению с нормальной флорой) и патогенные микроорганизмы проигрывают в конкурентной борьбе за пищу, и их количество снижается естественным путем.

Механизм действия пробиотических микроорганизмов основан на принципе «конкурентного ингибирования (вытеснения)» в сочетании с влиянием на разобщение патогенных организмов через способность к «чувству кворума». Принцип «конкурентного вытеснения» таков, что слой пробиотических бактерий наносится на обрабатываемую поверхность и приводит к немедленному их распространению. Они стремительно поглощают всю оставшуюся пищу (включая мертвый органический материал путем некротрофии), ничего не оставляя потенциальным патогенным захватчикам, стремящимся найти пространство для обитания и пищи. Помимо конкурентного вытеснения, оказывается влияние и на «чувство кворума», которое представляет собой чрезвычайно быстрый способ общения бактерий друг с другом посредством сигнальных молекул. Как только пробиотические бактерии нанесены на поверхность, патогенные организмы, обладая способностью к «чувству кворума», посылают друг другу сообщение о наступлении неблагоприятных условий, погружающих их в пассивное метаболическое состояние.

В нашей работе представлены результаты исследований, полученные при использовании пробиотических средств PIP Hause Cleaner и Кристалл-900.

В 2017 г на молочно-товарной ферме ТОО АФ «Родина» провели научно-производственные опыты с применением пробиотических средств для дезинфекции PIP Hause Cleaner и Кристалл-900. PIP Hause Cleaner (PIP СТС)

производства фирмы «Кризал» Бельгия.

В летний период 2017 г. проводились с экспозицией 48, 72, 96, 240 часов, в помещениях где содержатся коровы, до и после доения. Для изучения влияния дезинфекции помещений химическими и пробиотическими препаратами на развитие субклинического мастита, нами были подобраны три группы коров, по 20 голов в группах с применением дезинфектантов и контрольная группа из 21 животного. В 1 опытной группы обрабатывали помещение распыляя с помощью цветочного распылителя биологический препарат РІР Hause Cleaner. Во 2 опытной группе обрабатывали помещение распыляя Кристалл-900.

Результаты исследований качества молока, проведенных на кафедре «Ветеринарной санитарии» в АО Казахском агротехническом университете им.С.Сейфуллина (АО КАТУ), на базе Назарбаев Университет в лаборатории ТОО «Экостандарт.kz», приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Влияние химических и пробиотических средств на количество соматических клеток в молоке (КСК в 1 см³)

| Группа животных | Срок проведения исследований | КСК в 1 см ³ молока |
|--------------------------|---|--------------------------------|
| 1 опытная | Начало опыта - до использования пробиотических средств | (3,9±0,07)х10 ⁵ |
| | Окончание опыта - после применения пробиотических средств | (3,4±0,04)х10 ⁵ |
| 2 опытная | Начало опыта - до использования химических средств | (3,8±0,07)х10 ⁵ |
| | Окончание опыта - после применения химических средств | (3,1±0,04)х10 ⁵ |
| Контрольная | Начало опыта | (4,0±0,06)х10 ⁵ |
| | Окончание опыта | (3,9±0,05)х10 ⁵ |
| Норма по ГОСТ 31449-2013 | | Не более 4,0 х10 ⁵ |

Обработка помещений коров пробиотическими средствами до и после доения в течение 240 часов (10 суток) обеспечила снижение КСК в молоке коров 1 опытной группы на 18,4%, 2 опытной группы - на 12,8%. Тогда как в контрольной группе этот показатель составил 2,5%.

Следовательно, КСК в молоке коров опытных и контрольной групп соответствовало требованиям межгосударственного стандарта ГОСТ 31449. 2013 «Молоко коровье сырое. Технические условия».

Необходимо отметить, что обработка вымени привела к уменьшению числа коров, имеющих воспаления. На наш взгляд, это положительно повлияло на КМАФАНМ в молоке, так как было установлено, что после использования пробиотических очистителей бактериальная обсемененность молока коров 1 опытной группы снизилась на 80,0%, 2 опытной - на 79,6%, контрольной группы - 1,8% (таблица 9).

В 2017 году проводили анализ качества молока коров молочно-товарной

фермы ТОО АФ «Родина» без применения пробиотических средств.

В летний период 2017 г. провели повторные исследования. В течение 10 суток помещение для содержания коров 1 опытной группы обрабатывали и распыляли.

Таблица 9– Влияние химических и пробиотических средств на бактериальную обсемененность молока (КМАФАнМ, КОЕ/см³)

| Группа животных | Срок проведения исследований | КМАФАнМ, КОЕ/см ³ |
|--------------------------|---|------------------------------|
| 1 опытная | Начало опыта - до использования пробиотических средств | (5,4±0,39)х10 ⁵ |
| | Окончание опыта - после применения пробиотических средств | (1,1±0,35)х10 ⁵ |
| 2 опытная | Начало опыта - до использования пробиотических средств | (5,0±0,39)х10 ⁵ |
| | Окончание опыта - после применения пробиотических средств | (1,0±0,39)х10 ⁵ |
| Контрольная | Начало опыта | (5,5±0,44)х10 ⁵ |
| | Окончание опыта | (5,4±0,41)х10 ⁵ |
| Норма по ГОСТ 31449-2013 | | Не более 1,0х10 ⁵ |

Во 2 опытной группе до доения вымя коров обмывали теплой водой, вытирали индивидуальной салфеткой, подключали доильные аппараты.

Гигиену вымени животных контрольной группы поддерживали обработкой теплой водой до доения с использованием индивидуальных салфеток.

Результаты исследований качества молока, проведенных на базе Назарбаев Университет в лаборатории ТОО «Экостандарт.kz», приведены в таблицах 23 и 24.

Влияние пробиотических средств на бактериальную обсемененность представлена в таблице 10

Таблица 10 – Влияние химических и пробиотических средств на бактериальную обсемененность молока (КМАФАнМ, КОЕ/см³)

| Группа животных | Срок проведения исследований | КМАФАнМ, КОЕ/см ³ |
|-----------------|---|--------------------------------|
| 1 опытная | Начало опыта - до использования пробиотических средств | (1,9±0,07)х10 ⁶ |
| | Середина опыта - после применения пробиотических средств | (1,8±0,04)х10 ⁴ |
| | Окончание опыта - после применения пробиотических средств | (2,7±0,05)х10 ^{4*} |
| 2 опытная | Начало опыта - до использования пробиотических средств | (1,2±0,38)х10 ^{5*} |
| | Середина опыта - после применения пробиотических средств | (5,5±0,25)х10 ^{4****} |
| | Окончание опыта - после применения пробиотических средств | (1,8±0,06)х10 ⁴ |

| | | |
|--------------------------|------------------------|------------------------------|
| | пробиотических средств | |
| Контрольная | Начало опыта | $(2,1 \pm 0,06) \times 10^5$ |
| | Середина опыта | $(2,2 \pm 0,07) \times 10^5$ |
| | Окончание опыта | $(1,6 \pm 0,44) \times 10^6$ |
| Норма по ГОСТ 31449-2013 | | Не более $1,0 \times 10^5$ |

Установили, что после использования пробиотических средств бактериальная обсемененность молока коров 1 опытной группы снизилась в 70,4 раза, 2 опытной групп - 6,6 раза. В контрольной группы микробиологическая обсемененность молока коров выросла в 7,6 раза.

Таким образом, в молоке коров 1 опытной группы при первичном использовании для обработки PIP House Cleaner микробиологическая обсемененность уменьшилась 4,9 раза, при повторном использовании - 70,4 раза. Во 2 опытной группе, после применения Кристал-900 при первичном использовании привело к снижению в молоке коров КМАФАнМ в 5,0 раз, при повторном использовании 6,6 раза. В 1 опытной группе к концу исследований КМАФАнМ составило $(2,7 \pm 0,05) \times 10^4$, 2 опытной группе - $(1,8 \pm 0,06) \times 10^4$ при норме не более $1,0 \times 10^5$ КОЕ/см³.

В молоке коров контрольной группы установили повышение микробиологической обсемененности, т.к. в начале исследований КМАФАнМ составило $(5,5 \pm 0,44) \times 10^5$, в конце исследований - $(1,6 \pm 0,44) \times 10^6$ при норме не более $1,0 \times 10^5$ КОЕ/см³.

Результаты наших исследований показывают, что технология производства не всегда позволяет получать молоко, отвечающее современным требованиям по количеству соматических клеток и микробиологической обсемененности.

В связи с этим дальнейшие наши исследования направили на использование пробиотического средства PIP House Cleaner для стабилизации мест содержания животных и улучшения микробиологических показателей качества молока.

Далее в своей работе определяли органолептические свойства молока. В зависимости от продолжительности обесцвечивания или изменения цвета, молоко относят к одному из четырех классов, указанных в таблице 11.

Молоко, имеющее через 1,5 часа окраску, соответствующую 1-му классу, относят к высшему классу.

Таблица 11 – Определение класса бактериальной загрязненности

| Класс | Оценка качества молока | Продолжительность изменения цвета | Окраска молока | Ориентировочное количество бактерий в 1 см ³ молока |
|--------|------------------------|-----------------------------------|---|--|
| Высший | Отличное | 1.5 часа | серо-сиреневая до сиреневой со слабым серым опенком | до 300 тыс. |

| | | | | |
|----------|--------------------|-------|--|-----------------------|
| 1 класс | Хорошее | 1 час | серо-сиреневая до сиреневой со слабым серым оттенком | от 300 до 500 тыс. |
| 2 класс | Удовлетворительное | 1 час | сиреневая с розовым оттенком или ярко-розовая | от 500 тыс. до 4 млн. |
| 3 класс- | Плохое | 1 час | бледно-розовая или белая | от 4 млн. до 20 млн. |

По результатам проведенной работы по изучению органолептических свойств молока установили, что в молоке 2, 3 классов обнаружены *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*.

Пробы молока для исследования предмьавлены на рисунке 13.



Рисунок 13 – Пробы молока для исследования

Таким образом, по данным исследования в молоке коров болеющих маститом встречается кишечная палочка (40% исследованных проб), которая в 25% случаев выявляется совместно с *Streptococcus agalactiae*, а также в молоке 50% коров *Staphylococcus aureus* встречается в ассоциации с *Proteus mirabilis* в 20% и *Escherichia coli* в 30%. Тем самым мы можем предположить что, возбудителем мастита Следующим этапом нашего исследования является изучение микрофлоры молока лактирующих коров с субклиническим маститом после применения химических и биологических средств дезинфекции.

3.4 Изучение микрофлоры молока после применения химических и биологических средств дезинфекции в лаборатории

Помимо возбудителей мастита, сырое молоко дойных коров может быть заражено микроорганизмами из окружающей среды. Эти организмы

окружающей среды могут быть переданы в молоко из-за плохой гигиены поверхности вымени и сосков, а также от неочищенного и не прошедшего дезинфекцию животноводческого помещения. Мастит вызывает резкое снижение производства молока и доходов фермерских хозяйств. Общественное здоровье потенциально подвержено риску, поскольку мастит может передавать зоонозы и болезни, связанные с пищевыми токсинами. По этой причине прямое потребление сырого молока не рекомендуется из-за высокой вероятности заражения микроорганизмами коровы, пастбища, доильного аппарата и контейнеров. Следовательно, пастеризация молока обязательна для обеспечения его безопасности, а также для продления срока годности

Для данного исследования мы применяли дезинфицирующее средство «Кристалл-900», а также пробиотический препарат «PIP House Cleaner».

При применении для определения действенности химического средства «Кристалл-900» и пробиотического препарата «PIP House Cleaner» мы получили следующие результаты приведенные в таблицах 12 и 13.

Были получены смывы после применения испытуемых препаратов. Полученные образцы были посеяны на питательные среды Мясо-пептонный агар (МПА), Эндо, Сабуро. Посеянные микроорганизмы инкубировались при комнатной температуре 7 суток. Общую обсемененность смывов и молока микроорганизмами исследовали методом последовательных разведений с подсчетом колоний на питательных средах в чашках Петри. Далее получали изоляты из отдельно выросших чистых колонии для определения видовой принадлежности исследуемых микроорганизмов.

В таблице 12 указаны данные о содержании бактериального состава микрофлоры исследуемых проб смыва из вымени до и после проведения дезинфекции препаратом «Кристалл-900».

Таблица 12 – Бактерицидная действенность химического препарата «Кристалл-900»

| Наименование выделенных микроорганизмов | До обработки | После обработки | | |
|---|--------------|------------------|-----------|---------|
| | | время экспозиции | | |
| | | 48 часов | 240 часов | 30 дней |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | + | + | + | + |
| <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | + | + | – | – |
| <i>Klebsiella pneumonia</i> | + | + | + | + |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | + | + | + |

| | | | | |
|--|---|---|---|---|
| <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Str. pyogenes</i> , <i>Str. cremoris</i> , <i>Str. faecalis</i> , <i>Str. xylosus</i> | + | + | + | + |
| <i>Citrobacter diversus</i> , <i>freundii</i> | + | - | - | - |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | + | + | + | + |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | + | + | + | - |
| <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pr. vulgaris</i> | + | - | - | - |
| <i>Candida</i> | + | + | + | - |

Таким образом, до применения препарата «Кристалл-900» были выделены микроорганизмы такие как, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus lactis*, *Str. pyogenes*, *Str. cremoris*, *Str. faecalis*, *Str. xylosus*, *Citrobacter diversus*, *freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia liquefaciens*, *Proteus mirabilis*, *Pr. vulgaris*, *Candida*.

Из приведенных выше данных в таблице № 8 следует, что при применении раствора «Кристалл-900» в течении 48 часовой экспозиции проявляет бактерицидность к таким микроорганизмам как *Citrobacter diversus*, *freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pr. vulgaris*. А также в течение 240 часовой экспозиции раствора *Streptococcus agalactiae*, *Citrobacter diversus*, *freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pr. vulgaris*. В течение 30 дневной экспозиции раствора *Streptococcus agalactiae*, *Citrobacter diversus*, *freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pr. vulgaris*, *Serratia liquefaciens*, *Candida*.

Тем самым мы определили, что длительное использование пробиотического препарата «Кристалл-900» не показывает наиболее подавляющий результат. Однако, оба препарата не оказывают бактерицидную активность к бактериям рода *Staphylococcus aureus*, которая является возбудителем заболевания мастит.

В таблице 13 указаны данные по исследованиям бактерицидной действенности биопрепарата «Pip House Cleaner».

Таблица 13 – Изучение бактерицидной действенности препарата «Pip House Cleaner»

| Наименование выделенных микроорганизмов | До обработки | После обработки | | |
|---|--------------|------------------|-----------|---------|
| | | время экспозиции | | |
| | | 48 часов | 240 часов | 30 дней |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | + | + | + | + |
| <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | - |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | + | + | + | - |
| <i>Klebsiella pneumonia</i> | + | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | + | + | + |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Str. pyogenes</i> , <i>Str. cremoris</i> , | + | + | + | + |
| <i>Str. faecalis</i> , <i>Str. xylosus</i> | + | - | - | - |
| <i>Citrobacter diversus</i> , <i>freundii</i> | + | + | + | + |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | + | - | - | - |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | + | + | + | + |
| <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pr. vulgaris</i> | + | + | + | + |
| <i>Candida</i> | + | + | - | - |

До применения пробиотического препарата «Pip House Cleaner» были выделены микроорганизмы такие как, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus lactis*, *Str. pyogenes*, *Str. cremoris*, *Str. faecalis*, *Str. xylosus*, *Citrobacter diversus*, *freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia liquefaciens*, *Proteus mirabilis*, *Pr. vulgaris*, *Candida*.

Препарат «Pip House Cleaner» после 48 часовой экспозиции проявляет бактерицидную активность к микроорганизмам, таким как *Klebsiella pneumonia*, *Str. faecalis*, *Str. xylosus*, *Enterobacter aerogenes*. А также после 240 часовой экспозиции препарат «Pip House Cleaner» проявляет бактерицидную активность к микроорганизмам *Str. faecalis*, *Str. xylosus*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida*, после экспозиции в течение 30 дней к *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumonia*, *Str. faecalis*, *Str. xylosus*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida*.

Таким образом, по результатам данной работы установлено, что после экспозиции в течение 30 дней пробиотический препарат «Pip House Cleaner» проявляет бактерицидные свойства к бактериям таким как *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumonia*, *Str. faecalis*, *Str. xylosus*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida*, у химического препарата «Кристалл-900» бактерицидные свойства проявляются к бактериям рода *Streptococcus agalactiae*, *Citrobacter diversus*, *freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pr. vulgaris*, *Serratia liquefaciens*, *Candida*. Тем самым мы определили, что длительное использование пробиотического препарата «Pip House Cleaner» показывает наиболее подавляющий результат. Однако, оба препарата не оказывают бактерицидную активность к бактериям рода *Staphylococcus aureus*, которая является возбудителем заболевания мастит [1, p. 1280].

3.5 Использование пробиотических культур для разработки дезинфицирующих препаратов и создание консорциумов из отобранных культур

3.5.1 Разработка технологии создания консорциума из пробиотических культур для дезинфекции помещений молочных ферм

Бациллы и лактобактерии способны закислять среду обитания и являются антагонистами ряда микроорганизмов, таких как сальмонелла, протей, стафилококки, кишечная палочка, псевдомонады, аэромонады, стрептококки, дрожжевые грибки итд с помощью продуцентов, а также синтезируют

аминокислоты, витамины и иммунноактивные факторы.

При разработке технологии создания консорциума из пробиотических культур для использования при санации помещений молочных ферм нами были выделены изоляты из смыва кожи вымени здоровых коров. С помощью разведения выселили образцы на питательные среды СПА, МПА, МРС агар. Затем, для получения чистой культуры образцы выселили методом штирха в соответствии с рисунком 14.

Из множества выселенных на различные питательные среды колоний нами было выбрано, 10 изолятов схожих на молочнокислые бактерии и пробиотические штаммы бацилл с целью генотипирования для создания консорциума.



А

а



Б

б

а - бациллы; б - лактобактерии

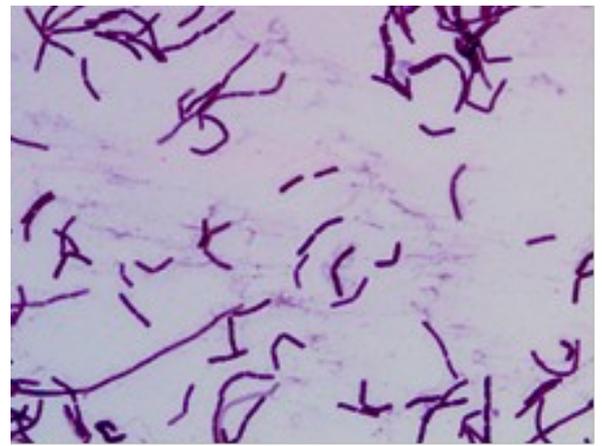
Рисунок 14 – Посев образцов на питательные среды

Примечание – а - спорообразующие колонии, бежевого цвета, края неровные; б - колонии молочного цвета, с глянцевой поверхностью, края ровные.

При проведении микроскопии определили видовые принадлежности выделенных изолятов. Для микроскопии изоляты были окрашены методом грама в соответствии с рисунком 15.



а



б

а, б – выделенные изоляты

Рисунок 15 – Микроскопия выделенных изолятов

Тем самым, из 10 культур 4 штамма выявлены как грам положительные, расположенные по цепочке, спорообразующие, с округленными концами палочковидные бактерии. 6 штамма грамположительные, расположенные по отдельности и по цепочке, а также удлененные с обрубленными концами палочки.

Видовую принадлежность полученных чистых колоний определяли генеотипированием с помощью 16S RNA. Для этого выделили ДНК из 10 выделенных изолятов с помощью набора «Power Soil® DNA Isolation Kit» (MO BIO). Затем проводили гельэлектрофорез выделенных ДНК в 1% агарозном геле в соответствии с рисунком 16.



Рисунок 16 – Гель электрофорез выделенных ДНК в агарозном геле.

Нуклеотидную последовательность 16s исследуемых культур определяли с помощью ПЦР амплификации. Программа ПЦР:

92°C-5 мин

92°C-1 мин

52°C - 1 мин 30с

} 25 цикл

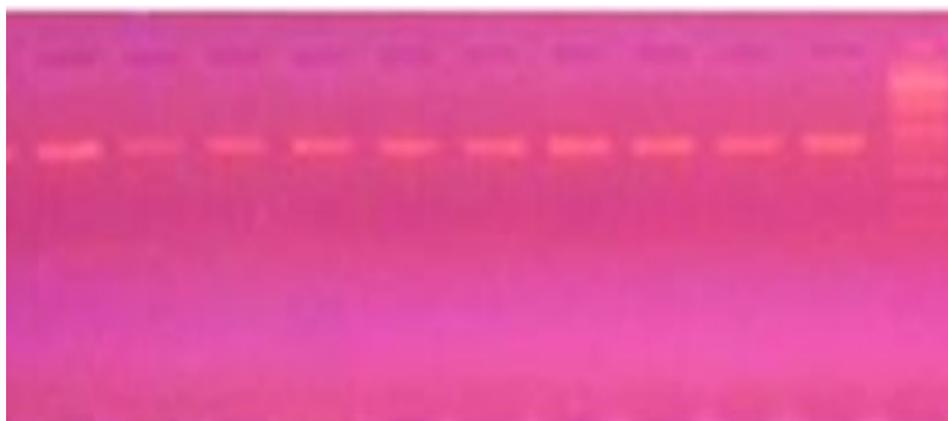
72°C-2 мин

72°C-5 мин

15°C - ∞.

Полученные результаты ПЦР амплификации зафиксировали в 2% агарозном геле в соответствии с рисунком 17.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 М



Рисунок

17 – Гель электрофорез ампликонов в 2% агарозном геле

Далее нами было проведено секвенирование гена 16s на генетическом анализаторе Applied Biosystems. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями типичных штаммов микроорганизмов в интернет системе BLAST. Анализ данных показал высокий уровень гомологии (более 97%).

Lactobacillus helveticus strain, 100 %

```
TTGTTTATCTTCAATACTCATTATATGTTCAATCTCAATAATTGTTTGAGGAAGACT
TTGTA
ATAGAGCGAAAATTTGTTTGCGACTATTATCATCAAGACCTGATAAACSTTCATCAA
CAAGTAAAAAGTC
CTTTTTATTCAATAATGCACGAGCAATTTCTACTTTTCGTTTCTCTCCACCAGATAA
AGATAATCSTTTA
TCACCAATTTGTGTGTCTAAATAATTTTTATTTGCTAAATATTCTAACTTAACTTTT
TTCAAAACTTTAA
TTAGACGAGAAGAAGGAATATCTTTTCCTAAAGTCAGATTGAAACGTAATGATTCTG
AAAAAATATATGT
ATCTTGCCCAACAATTCCAAAATTAGAAAGGAAATTATTTTTATTTAACTGCTTATC
AATTAATAATTTTA
CSTTTAATCAAAGGTAATTCATTTAACAACTTTTAAATAAAGTTGACTTGCCAATT
CCAGATCTTCCAG
TTATTAATAACTTTTATCTCSTTCAAAAATTTCAAAATTAATATTCTTTAATATAGCAT
GATTATTATATCC
AAGAGTACAATGATCAAAGATAATCTTTTTTTTGTCAGAAAG
```

Lactobacillus acidophilus, 99 %

CCCTTGAACGTGCGAGTTTATTAACCTCATGCTGGAAGAAACAATGTCGTAACCTTAA
CTTTGGATAC
TGAAAAGCAAACCTGCTAAGCTATCTGGTAAATCAGCTGAAATTGGTAATGTAGAAGA
AGATGTCAGCTTT
AGAAATCTCGAAGGAAATAACTTAGAAATTTCAATTTAATCCAGATTATATGCGTGAT
GCGCTTAGAGCTT
CAGTAACCGATTCTGTTATTATGAGTTTTACTAAGCCACTTCGTCCATTTATCATT
ATCCAGACAAGAA
AGATATTGAATTTGTTCAATTAATTACCCAGTTAGAACTTATTAATCATTTTTATA
ATTTTTAACTTAA
TAAAACCACCCTTCATGGGTGGTTTTTATTTTTGCATTTTCGCTTATACGCCGAAAA
AGACGTTCTTTTA
TTTTTTATAGGTATTAGTGTGTAATTAGTTTTGATTTTTAAAAAACGCTTAAAACGC
GTTAAACAGCGTT
TTAAGTTTGTTATTTAGCTTGAAAATAATAATTATATAGGTAAAAAGAGCATTG
AGGGTGAGTATTA
TCAAGTATTTTACAATTGATGGCGAGTACATAACTTTAGGACAATT

Bac.subtilis, 99 %

CTTAACTTTAAACAACCTCGATTTGTTTTTCCAGATCTTTAATATCCTCATCTGTAAGA
CCCTTTAGATCAA
ATATAAAAAGACTGCTATCTTCAGCTCTTTTTTCCACTCCAGATCGCTCTTCTTGTT
CTGTTATATATCC
TATCATTGTCAATAATTGATCATGAGGTATATTGTAGGCTTTAGCCAACCTTTTTTAG
GGTTTTTGCTGTT
GGATATTCTTTTTTACCTGTTTCAAGCATTGAAATGTATCCAGCCGATACCCCTGAT
TCTTCAGCAGCTT
TTTCTAGCGTTAATTGCCGCATTTTTCTTAGTTGTCGTAAGTAATCACTAACTTAA
ACTTCCCTTTCTT
CGTCATCGTACACACCTCACGGAAATGAATAATAAATTATGTATTTGCAATTAAGAA
TTCACTCTATATA
TTGATTTTTTAACTGAATTTAAAAAGAATAAGCTTATAATTGCTTTTTTCAGCGTTT
ATTCAAGGTAAAA
GTAGAAAAAAGACTAAAAAACCACTTTCATCGTGTTTTGGTTGAATTTTGTGTA
ATATTTTTTAACT
GGATTTAAAAAATATTTACTGGATTTAAAAAATGTGCTACCCTCAAATTATGGGAA
TTTTATTTGAAGG
GAGTATCTTATGGCGACTAAAAGAGTTTATCAACTGATG

Bacillus coagulans, 98 %

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGTGCGGACCTTTTAAAAGCTT
GCTTTTTAAAAGGT
TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGGATAACGC
CGGGAAACCGGGG
CTAATACCGGATAGTTTTTCTCCGCATGGAGGAAAAAGGAAAGACGGCTTYTGCT

GTCAC TTACAGAT
GGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCG
TAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTC
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGT
CGTAAAACCTCTGT
TGCCGGGGAAGAACAAGTGCCGTTGGAACAGGGCGGCGCCTTGACGGTACCCGGCCA
GAAAGCCACGGCT
AACTACGTGC

Bacillus amyloliquefaciens, 97%

GCTTGTATCAATAAGCGATACAAGCTCTTTTTAGATCAAATCTGAAGGGTGAATGAC
AAAGA
AAACAAGAGAATGGATAATCAATTTAAAAGAACTTGAGAAAGTGCCGGCGGAGGGTA
TGCAGCTCATTCA
AAAAAGATTAATCGAAAACTCGCCGATTGAAGAGCCAAATCAAAGAATAACTAGTC
CCTTGTGCAAAAG
TTATCGCTTTATTGATCTGGTCAAAGCAAGCAATTGCTTGAGCTGGTTTTATCAAAT
TCAATACCAGCCG
ACATCCGTGAGGTTGATGCTCCCGGAAAAATGGAAGCGAACATCTGATCTTGAAAAC
AACTCAGCAATAT
GTTGCTTGTGATGACCGGGACGTCTGCTATTTTCATCAACACTGTAGCGAAGTTTGT
GCTTTTGGAAAAT
GTCTCGAGCACCTTGAGGGCTTATTGGAATGTATTGAGTTTCGACGAAGGTTTTCCCA
ATCATAGTTTTAT
CTTGGTTGAGCCTGAGTGTCAGTTTGGTTTATGTATATTGCACACGGAATATGGGTG
CGATCTTGTATAT
TGGTAGATTGCTTTCCTAGGAGGAAATCTTTGTGGAAAAGCTTCAATATTATAGGGT
GCTTTGTATACTA
GAAACAAATTAGAATATGTGGTGATCAAATTGAGCGAGCC

Таким образом, исследование таксономических характеристик штаммов выделенных из пробы смыва кожи вымени с помощью системы BLAST полностью подтвердилось.

Данная работа проводилась на базе технопарка Назарбаев Университет в лаборатории ТОО «Экостандарт.kz».

Сотрудники ТОО «Экостандарт.kz» занимаются разработками биологических препаратов для охраны окружающей среды, пищевой перерабатывающей промышленности и пробиотических препаратов для животных и птиц.

Следующим этапом работы явился метод совместного культивирования активных штаммов лактобацилл.

Для проведения работ мы использовали следующие выделенные биосовместимые культуры:

1. *Bac.subtilis* C ; *Bacillus coagulans* П и *Bacillus amyloliquefaciens* Э.
2. *Lactobacillus helveticus* u *Lactobacillus acidophilus*.

Антагонистическая активность была изучена с использованием индикаторных тест-культур.: *S. typhimurium*, *Serratia marcescens*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Ps. aerogenosa*, *Bacillus cereus* u *Candida albicans*.

В лабораторных условиях были приготовлены по 10 мл каждого штамма в концентрации клеток 9,0 lg КОЕ/см³. Далее культуральные жидкости объединяли и разводили водой в соотношении 1:10, таким образом, получили готовый к внесению рабочий раствор культуральной жидкости. Рабочий раствор культуры опрыскивали путем крупнокапельного орошения опрыскивающим устройством. Через 3 суток проводили контрольный высеv из смыва поверхностей полов, стен, кормушек, поилок и железных перегородок с мест содержания животных. Также определяли активность консорциумов по способности к росту на навозе крс, а также по способности нейтрализовать неприятные запахи навоза.

В следующей серии экспериментов составили консорциумы. Штаммы, отобранные для составления консорциумов, продуцируют особые виды ферментов такие, как липаза для расщепления жира, протеаза для расщепления протеинов и амилаза для расщепления крахмала, кроме того, данные культуры обладают высокой антимикробной активностью.

Далее на их основе составили 2 вида консорциума микроорганизмов:

В 1-й консорциум вошли 3 культуры: *Bac. Amyloliquefaciens* Э, *Bac.coagulans* П и *Lactobacillus helveticus* Т.

2-ой консорциум составлен из 2 культур, в него вошли культуры *Bac.subtilis* С и *Lactobacillus acidophilus* В.

Для составления препаративной формы нами использован консорциум №2 состоящий из двух пробиотически активных штаммов. Штаммы, входящие в состав консорциума выращивали по отработанным ранее в ТОО Экостандарт.kz параметрам культивирования.

Культивирование штаммов *Bac.subtilis* С проводили на универсальной среде СПБ и штамм *Lactobacillus acidophilus* В на селективной среде MRS-1. Штаммы инокулировали в концентрации 100 000 000 кл/см³, инкубировали при температуре культивирования 30⁰С, в течение 48 ч., значение рН среды составил 6,7. При соблюдении указанных параметров культивирования максимальное накопление биомассы отмечалось 10⁸- 10⁹КОЕ/см³.

Дальнейшие исследования были направлены на концентрирование клеток путем осаждения на центробежной центрифуге. Культуральную жидкость центрифугировали при 4000, 10 000 и 13 000 об/мин в течение 30 минут.

Далее полученные осадки культур после центрифугирования объединяли, тщательно перемешивали, затем разводили с консервирующей средой в соотношении 1:1. В качестве консервирующей среды использовали стерильный 10% солевой раствор.

Способность готового биопрепарата подавлять рост и развитие

микробной обсеменности и запахи внутри помещения исследованы в лабораторных условиях в модельных экспериментах.

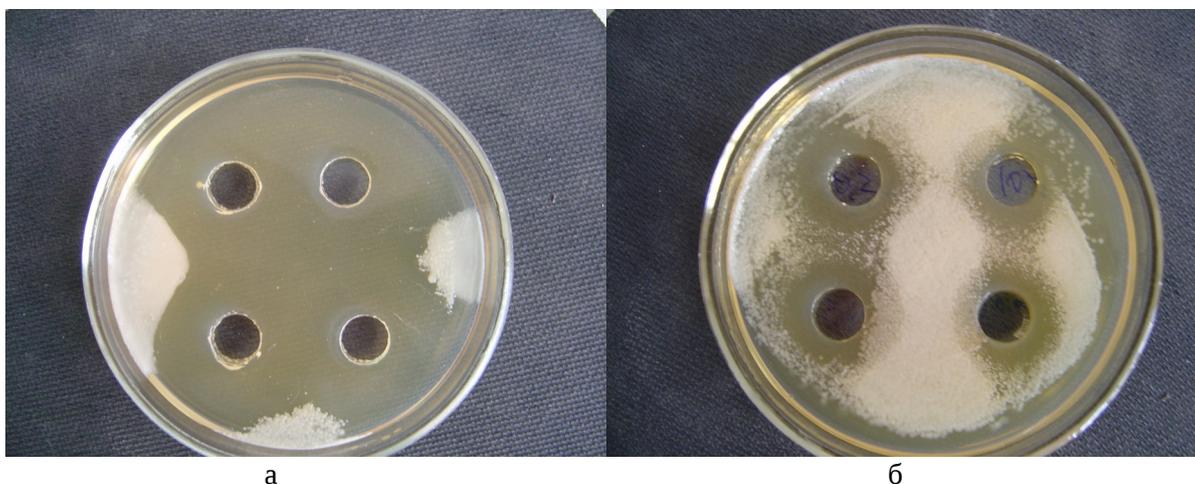
Для этой цели готовили рабочий раствор препарата в разведении 1:10 и 1:100. В качестве обсемененной поверхности пола использовали метод отпечатков, или контактный метод, который широко применяется для определения биологической контаминации ровной гладкой поверхности. Для проведения отпечатки поверхности пола использовали кусочки фильтровальной бумаги отрезанный в виде кружков диаметром 3-6 см, помещали в чашки Петри, стерилизовали, и заливали расплавленной агаровой средой. После остывания Чашку петри переворачивали стороной, пропитанной средой, на исследуемую поверхность. Затем прижимая осторожно пинцетом переворачивали чашку Петри с агаром, затем агаровую поверхность дополнительно обрабатывали приготовленным рабочим раствором и ставли на инкубацию. на МПА и МРС В качестве контроля оставили по одной Чашки Петри не обработанные препаратом отпечатки пола. Инкубировали отпечатки при температуре 37°C в течение 2-5 суток. Оценку бактериальной обсеменности учитывали по количеству выросших колонии на поверхности агаровой среды Данный метод отпечатков выгодно отличается от метода смывов возможностью непосредственного обнаружения загрязнения объектов окружающей среды и отсутствием потери микробов в исследуемых предметах (что всегда происходит при распределении микрофлоры со смывтой поверхности в смачивающей жидкости). Способность готового биопрепарата подавлять рост и развитие микробной обсеменности и запахи внутри помещения исследованы в лабораторных условиях в модельных экспериментах.

Для этой цели готовили раствор препарата в разведении 1:10 и 1:100. В качестве обсемененной поверхности пола использовали метод отпечатков, или контактный метод, который широко применяется для определения биологической контаминации ровной гладкой поверхности. Для проведения отпечатки поверхности пола использовали кусочки фильтровальной бумаги отрезанный в виде кружков диаметром 3-6 см, помещали в чашки Петри, стерилизовали, и заливали расплавленной агаровой средой. После остывания Чашку петри переворачивали стороной, пропитанной средой, на исследуемую поверхность. Затем прижимая осторожно пинцетом. переворачивали чашку Петри с агаром, затем агаровую поверхность дополнительно обрабатывали приготовленным рабочим раствором и ставли на инкубацию. на МПА и МРС В качестве контроля оставили по одной Чашки Петри не обработанные препаратом отпечатки пола. Инкубировали отпечатки при температуре 37°C в течение 2-5 суток.

Оценку бактериальной обсеменности учитывали по количеству выросших колонии на поверхности агаровой среды Данный метод отпечатков выгодно отличается от метода смывов возможностью непосредственного обнаружения загрязнения объектов окружающей среды и отсутствием потери микробов в исследуемых предметах (что всегда происходит при распределении

микрофлоры со смывой поверхности в смачивающей жидкости).

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики Ю.С. Малета и В.В. Тарасова (1982) и программы *Статистика 8*.



а, б – штаммы молочнокислых бактерий и бацилл

Рисунок 18 – Изучение антагонистической активности

Антагонистическая активность в соответствии с рисунком 18 оценена по величине зоны торможения роста чувствительной индикаторной культуры вокруг колонии испытанных штаммов молочнокислых бактерий и бацилл. Результаты сведены в таблицу 14, а также на рисунке 18 [116, р. 56-79].

Таблица 14 – Антимикробная активность пробиотических штаммов (зоны угнетения роста тест-штаммов, мм)

| Штаммы | Зоны угнетения роста тест-штаммов, мм | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|
| | <i>E.coli</i> | <i>B.cereu s</i> | <i>P.mirab ilis</i> | <i>Ps.aeru ginosa</i> | <i>S.aureu s</i> | <i>S.typhi murium</i> | <i>Ser.mar cescens</i> | <i>C.albic anis</i> |
| <i>B.subtilis C</i> | 11,6±0,03 | 11,3±0,05 | 10,3±0,05 | 13,3±0,05 | 14,0±0,16 | 11,5±0,13 | 12,3±0,04 | 13,3±0,18 |
| <i>B.coagulans П</i> | 12,9±0,07 | 11,3±0,07 | 10,4±0,07 | 9,8±0,12 | 11,2±0,19 | 10,6±0,14 | 13,3±0,05 | 10,3±0,18 |
| <i>B. amyloli guefac iens Э</i> | 13,3±0,03 | 14,3±0,03 | 8,8±0,11 | 13,6±0,14 | 11,0±0,14 | 9,5±0,07 | 11,7±0,07 | 00 |
| <i>L. fermentum Т</i> | 11,6±0,07 | 12,3±0,03 | 13,0±0,09 | 9,1±0,11 | 10,6±0,13 | 9,3±0,08 | 11,3±0,09 | 9,1±0,19 |
| <i>L.acidophilus В</i> | 8,6±0,14 | 10,3±0,08 | 9,3±0,05 | 10,1±0,11 | 10,1±0,16 | 8,9±0,07 | 11,3±0,08 | 10,1±0,14 |

По данным таблицы 15, можно судить о высокой антагонистической активности всех испытанных культур ко всем испытанным тест-штаммам. Среди исследованных культур все штаммы проявили активность к тест-

штаммам: *E.coli*, *B.cereus*, *S. aureus* и *Ser.marcescens*. В целом все штаммы способны подавлять рост *C. albicanis*, кроме штамма *B. Amyloliquefaciens* Э.

Культивирование штаммов *Vac.subtilis* С проводили на универсальной среде СПБ и штамм и *Lactobacillus acidophilus* В на селективной среде MRS- 1.

Штаммы инокулировали в концентрации 100000000 кл/см³, инкубировали при температуре культивирования 30⁰С, в течение 48 ч., значение рН среды составил 6,7. При соблюдении указанных параметров культивирования максимальное накопление биомассы отмечалось 10^8 - 10^9 КОЕ/см³ в соответствии с рисунком 19.



Рисунок 19 – Посев пробиотической культуры *Bacillus subtilis*

Дальнейшие исследования были направлены на концентрирование клеток путем осаждения на центробежной центрифуге. Культуральную жидкость центрифугировали при 4000, 10 000 и 13 000 об/мин в течение 30 минут. Результаты концентрирования бактериальных клеток до и после осаждения представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Показатели титра клеток до и после центрифугирования

| Наименование штаммов | Исходный титр | После центрифугирования, об/мин | | |
|------------------------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|
| | | 4000 | 10 000 | 13 000 |
| <i>Vac.subtilis</i> С | $8,5 \times 10^8$ | $9,2 \times 10^9$ | $7,2 \times 10^9$ | $6,5 \times 10^9$ |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> В | $7,4 \times 10^8$ | $8,7 \times 10^9$ | $7,9 \times 10^9$ | $2,5 \times 10^7$ |

Как видно из таблицы 15, осаждение клеток при различных оборотах в

целом незначительно повлияло на титр клеток. Центрифугирование штамма *Bac.subtilis* С в режиме от 4000 об/мин до 13000 об/мин повлияло только на количественное содержание клеток, при этом степень осталась на том же уровне. Однако, центрифугирование биомассы штамма *Lactobacillus acidophilus* при высоких оборотах отрицательно повлияло на титр клеток, так как при 13000 об/мин наблюдается уменьшение концентрации клеток, несмотря на тот факт, что молочнокислые микроорганизмы относятся к грамположительным бактериям с толстым слоем пептидогликанов, что позволяет им переносить большие центробежные обороты. При этом уровень концентрации клеток между 4000 об/мин и 10000 об/мин фактически сохранялся на том же уровне. Исходя из полученных данных рекомендуется осаждать клетки при 4000 об/мин в течение 30 минут.

Далее полученные осадки культур после центрифугирования объединяли, тщательно перемешивали, затем разводили с консервирующей средой в соотношении 1:1. В качестве консервирующей среды использовали стерильный 10% солевой раствор. В результате была получена концентрированная форма биопрепарата на рисунке 20.

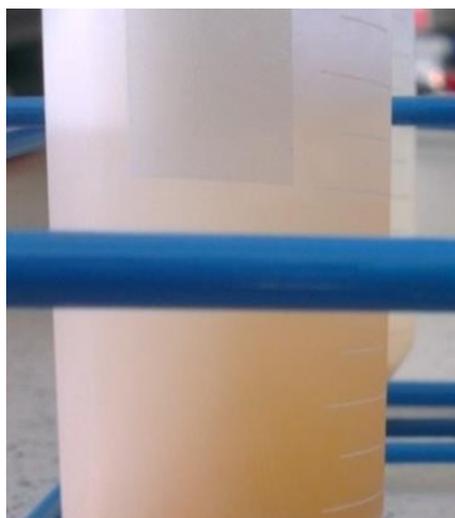


Рисунок 20 – Лабораторный образец концентрированной формы биопрепарата

Основной задачей технологии производства бактериальных препаратов на основе живых микроорганизмов заключается в обеспечении таких условий получения и переработки микробной массы, при которых в готовой продукции сохранилось бы максимальное число жизнеспособных клеток и не утрачивались бы их полезные свойства.

С этой целью приготовленный лабораторный образец концентрированного биопрепарата заложили на хранение при минус 20°С, +4°С. В настоящее время проводятся исследования по определению оценки сохраняемости и жизнеспособности культур. Общая микробная концентрация клеток биопрепарата определенная по методу Коха составила 10^9 КОЕ/см³. Контрольная микроскопия клеток показывает наличие в мазке препарата

грамположительных палочковидных форм клеток.

При оценке способности готового биопрепарата подавлять рост и развитие микробной обсеменности и запаха внутри помещения исследованы в лабораторных условиях в модельных экспериментах, рабочий раствор препарата в разведении 1:10 и 1:100 использовали метод отпечатков, или контактный метод. Кусочки фильтровальной бумаги отрезанный в виде кружков диаметром 3-6 см отпечатки с поверхности пола помещали в чашки Петри с агаром, затем агаровую поверхность дополнительно обрабатывали приготовленным рабочим раствором и ставили на инкубацию. на МПА и МРС. В качестве контроля оставили по одной Чашки Петри не обработанные препаратом отпечатки пола. Инкубировали отпечатки при температуре 37°C в течение 2-5 суток.

Оценку бактериальной обсеменности учитывали по количеству выросших колонии на поверхности агаровой среды.

В 50% отобранных проб были обнаружены патогенные микроорганизмы такие как бактерии группы *Staphylococcus aureus*. Так же в образцах (36%) обнаружены бактерии *Escherichia coli* группы кишечной палочки, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*. Результаты исследований отобранных проб представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Содержание бактериальной обсеменности молока (микроорганизмы в 1 мл смыва)

| Наименование выделенных микроорганизмов | До обработки | После обработки | | |
|--|--------------|------------------|-----------|---------|
| | | ВРЕмя экспозиции | | |
| | | 48 часов | 240 часов | 30 дней |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | + | + | + | - |
| <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | + | + | - | - |
| <i>Klebsiella pneumonia</i> | + | + | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | + | - | - |
| <i>Streptococcus lactis</i> , Str. <i>pyogenes</i> , Str. <i>cremoris</i> , <i>Str. faecalis</i> , Str. <i>xylosus</i> | + | - | - | - |
| <i>Citrobacter diversus</i> , <i>freundii</i> | + | - | - | - |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | + | + | + | - |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | + | - | - | - |
| <i>Proteus mirabilis</i> , Pr. <i>vulgaris</i> | + | + | + | + |
| <i>Candida</i> | + | + | - | - |

По данным результатам проведенной работы мы видим, что длительное применение консорциума оказывает бактерицидную активность ко всем

исследуемым культурам кроме *Proteus mirabilis*, *Pr. vulgaris*, *Escherichia coli*. В особенности к возбудителю заболевания мастит *Staphylococcus aureus*.

Технологический процесс производства пробиотического препарата, показанный на рисунке 21, включает в себя следующие стадии: получение биомассы; получение суспензии клеток центрифугированием; подготовка защитной среды; смешивание защитной среды с бактериальной массой. Кроме того, отработана рабочая концентрация препарата способная подавлять рост бактериальных клеток.

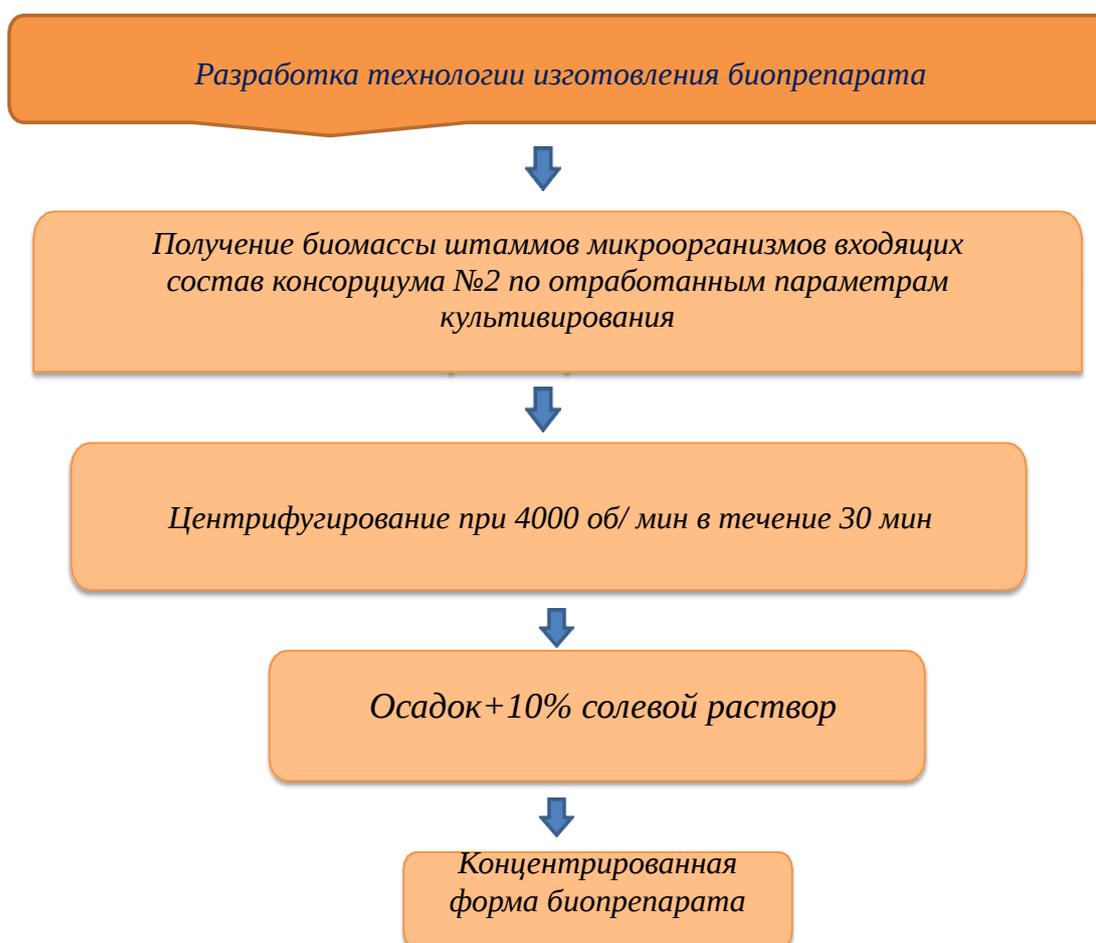


Рисунок 21 – Технологическая схема приготовления биопрепарата

В результате было установлено, что на поверхности агара в разведении 1:10 выросли в основном колонии пробиотических культур. Принадлежность выросших колонии определяли путем микроскопии. А вот в разведении 1:100 были обнаружены колонии желтого, матового цветов различных размеров, но в данном случае превалировали рост колонии пробиотических культур.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных нами разработана технология приготовления пробиотического препарата предназначенного для подавления роста и развития бактериальной обсемененности.

3.5.2 Изучение эффективности комплексных мероприятий при использовании консорциума для профилактики мастита на ферме ТОО АФ «Родина»

Мастит вызывается широким спектром патогенов и эпидемиологически классифицируется как инфекционный мастит, не связанный с окружающей средой [3, р. 48]. Инфекционные патогены - это те, для которых вымя инфицированных коров служит основным резервуаром. Они передаются от коровы к корове, в основном во время доения, и, как правило, приводят к хроническим субклиническим инфекциям с обострениями клинических эпизодов. К инфекционным патогенам относятся: золотистый стафилококк, *Streptococcusagalactiae*, *Mycoplasmaspp.* и *Corynebacterium bovis* [4, р. 18]. С другой стороны, экологический мастит можно в широком смысле определить как инфекции внутри молочной железы, вызванные патогенами, основным резервуаром которых является среда, в которой живет корова [5, р. 4730]. Экологические патогены включают *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Strept. дисгалактии* и *Strept. uberis*, и большинство инфекций, вызываемых этими патогенами, являются клиническими и непродолжительными [6, р. 154].

Различные исследования показали, что мастит в основном вызывается коагулазонегативными стафилококками (ЦНС), золотистым стафилококком (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*Str. Agalactiae*), другими видами стрептококков и колиформными бактериями [9, р. 305; 16, р. 150].

Исследования клинической эффективности пробиотических средств были проведены на базе нескольких сельхозпредприятий Акмолинской области (ТОО АФ «Родина»). В указанных сельхозорганизациях содержатся коровы с молочной продуктивностью от 6000 до 9000 кг молока.

На базе одного предприятия нами было выполнено исследование эффективности *полного комплекса* пробиотического консорциума, непосредственно предназначенного для обработки вымени и для санации помещений. Принцип действия основан на создании безопасной и здоровой микрофлоры на поверхности вымени за счет активного воздействия на патогенные микроорганизмы.

Научно-производственный опыт по использованию комплекса пробиотических средств был выполнен в ТОО АФ «Родина», с использованием консорциума.

В связи с тем, что кроме непосредственной обработки сосков вымени проводилась также санация помещений и обработка кормов и воды в качестве опытной и контрольной групп были выбраны коровы, находившиеся в двух отдельно стоящих корпусах. В опытную группу было включено 40 коров в период лактации, в контрольную – 21 коров. Продолжительность исследования составила 30 дней.

Распыление консорциума, направленного на создание благоприятного

микроклимата в животноводческом помещении, проводили опрыскивателем объемом 5 литров с телескопическим распылителем. Консорциум наносили на элементы конструкции, а также настил и животных в объеме на 300 м² обрабатываемой площади 1 л концентрированного раствора. Первые 7 дней проводили ежедневную обработку помещения, затем 1 раз в 3 дня до окончания исследования. Пробиотические средства и оборудование для их применения показаны на рисунке 22.

Распыление на кормовой стол проводили 1 раз в сутки средством PIP PW в концентрации 0,5%. Также этим средством в 5% концентрации 2 раза в день обрабатывали внутреннюю поверхность доильных стаканов непосредственно после мойки оборудования. Соски молочной железы перед доением после очистки вымени чистой водой от крупных механических частиц обтирали нетканым материалом, пропитанным раствором консорциума [218, р. 1841-1847].



Рисунок 22 – Пробиотические средства и оборудование для их применения

Обработку сосков вымени после доения проводили средством консорциум, которое распыляли вертикально на поверхность сосков вымени снизу вверх в течение 2-3 секунд непосредственно после снятия доильного аппарата. Процесс распыления консорциума на поверхность вымени после доения показан на рисунке 23.

Консорциум применяли в понижающей концентрации: 7% – течение первой недели, 5% – в течение 2 недели, в дальнейшем применяли в концентрации 3%.

В обеих группах уход и содержание осуществлялись идентично. Для доения использовали доильную систему АДМ-8. Доение выполнялось 2 раза в день. В контрольной группе дезинфекция корпуса не проводилась. Обмывание вымени до доения проводили чистой водопроводной водой из общего ведра,

общей тряпкой, обработку сосков молочной железы после доения осуществляли препаратом Diral, который содержит в качестве активного компонента йод, а в качестве смягчающего агента – сорбитол. Препарат наносили на соски после доения погружением в специальный стаканчик.



Рисунок 23 – Распыление консорциума на поверхность вымени после доения

До начала исследования уровень сосков, имеющих физиологический ответ на машинной доение в опытной группе составил 85,3% всех обследованных сосков, гиперкератоз регистрировался на 10,8% сосков, а осложненный гиперкератоз – на 1,2% сосков.

Повторное исследование состояния сосков вымени после месяца применения консорциума пробиотических препаратов показало высокую эффективность их воздействия на ткани молочной железы, что подтверждается увеличением в 1,1 раза количества сосков с физиологической реакцией, а также сокращение в 2 раза таких патологических изменений как гиперкератоз. Результаты исследования состояния сосков вымени сведены в таблицу 17.

Таблица 17 – Состояния сосков вымени у коров. ТОО АФ «Родина»

| Этапы проведения | Физиологическая реакция, % | Мастит, % |
|-----------------------|----------------------------|-----------|
| До начала опыта | 85,3 | 10,8 |
| После окончания опыта | 92,4 | 5,5 |

Важным показателем эффективности консорциума для обработки вымени является уровень распространения мастита. Проведенные исследования показали, что в опытной группе произошло сокращение в 1,2 раза количества коров с маститом в одной или нескольких четвертях, при этом преимущественно отмечено сокращение количества животных с клинически выраженным маститом в 1,5 раза.

В связи со значительным распространением заболеваний сосков вымени было проведено исследование молока на наличие скрытого мастита у 41 коров с использованием быстрого маститного теста Кенотест. Полученные нами результаты показали значительное распространение по стаду скрытого мастита. Так положительная и резко-положительная реакция с быстрым маститным тестом регистрировалась у 14,5 и 45,2% коров соответственно, отрицательная реакция – у 32,2%, а сомнительная – у 4,8% коров. Клинический мастит отмечен у двух животных, что составило 3,2%. Распространение скрытого мастита в ТОО АФ «Родина» представлено в виде круговой диаграммы на рисунке 24.

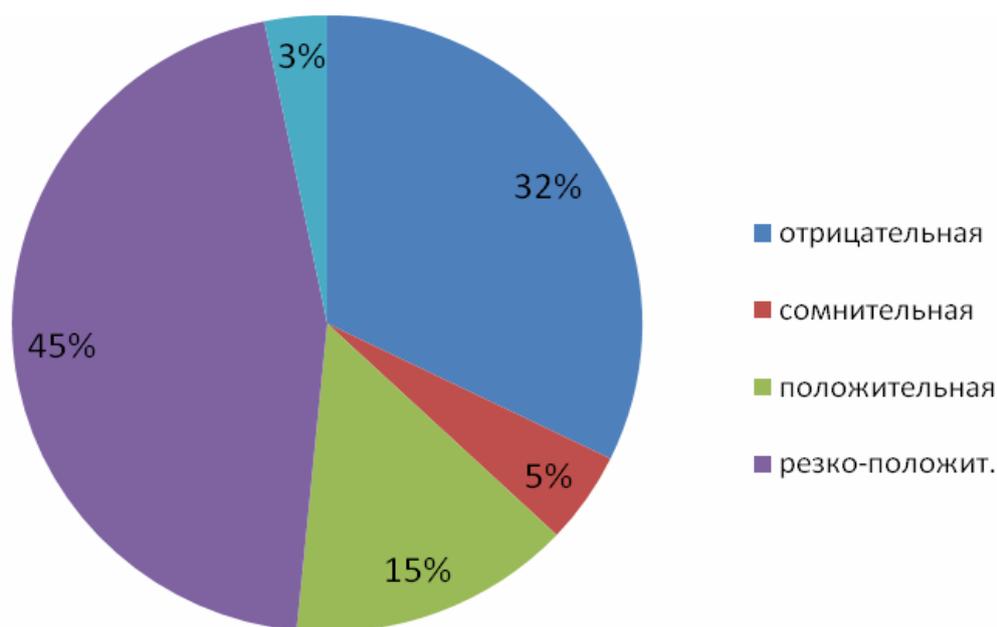


Рисунок 24 – Распространение скрытого мастита в ТОО АФ «Родина»

Для определения эффективности пробиотической профилактики заболеваний маститом была сформирована опытная группа из 41 коровы, содержащихся в одном корпусе. До начала исследования, через 1 и 2 месяца применения профилактических средств была проведена оценка определение скрытого мастита в каждой четверти вымени с помощью быстрого маститного теста – Кенотест.

Полученные результаты, приведенные на рисунке 25, показали, что через 1 месяц применения пробиотических средств отмечается значительное улучшение состояния сосков вымени. Нормальная физиологическая реакция на доение отмечалась на 60,7% сосков, что в 1,2 раза выше исходных показателей. Установлено снижение количества долей с осложненным гиперкератозом сосков вымени до 0,8% и, соответственно, увеличение количества сосков с неосложненным маститом в 2,4 раза за счет переход из осложненной формы.

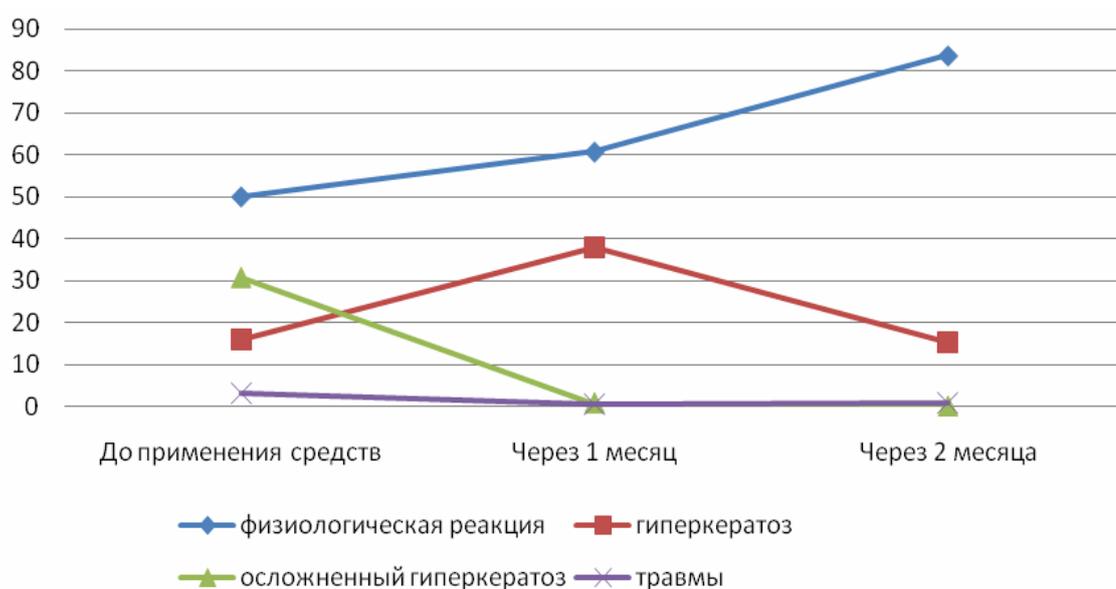


Рисунок 25 – Изменение состояния сосков вымени при использовании пробиотических средств для обработки вымени

Оценка влияния консорциума на состояние здоровья вымени показала, что на фоне его применения до 35,4% снизилось количество коров с резко-положительной реакцией в четвертях вымени с быстрым маститным тестом. Одновременно с этим возросло количество коров с отрицательной реакцией до 9,7%, с сомнительной – до 19,4%. При этом выявлено увеличение в 1,5 раза количества животных с положительной реакцией в 1,5 раза и коров с клинической формой мастита в 2 раза (с одной до двух голов).

Данные динамики изменения уровня воспалительных заболеваний вымени на фоне применения консорциума приведены в таблице 18.

Таблица 18 – Динамика изменения уровня воспалительных заболеваний вымени на фоне применения пробиотических средств

| Реакция с БМТ | Исходные данные | | 1 месяц применения | | 2 месяца применения | |
|---------------------|-----------------|------|--------------------|------|---------------------|------|
| | коров | % | коров | % | коров | % |
| Отрицательная | 2 | 6,5 | 3 | 9,7 | 3 | 9,7 |
| Сомнительная | 3 | 9,7 | 6 | 19,4 | 6 | 19,4 |
| Положительная | 6 | 19,4 | 9 | 29 | 13 | 41,9 |
| Резко-положительная | 19 | 61,3 | 11 | 35,4 | 5 | 16,1 |
| Клинический мастит | 1 | 3,2 | 2 | 6,5 | 4 | 12,9 |

При исследовании через 2 месяца применения консорциум установлено, что количество животных с отрицательной и сомнительной реакцией с быстрым маститным тестом осталось без изменений. За счет сокращения количества коров с резко-положительной реакцией произошел рост количества животных с положительной реакцией, с 29 до 41,9% и клинических маститов. При анализе распространения мастита по долям вымени было установлено,

что через 2 месяца применения пробиотических средств для обработки вымени количество долей вымени с положительной реакцией с Кенотестом сократилось в 1,4 раза, при этом увеличилось количество четвертей с отрицательной и сомнительной реакцией в 1,2 раза (с 51,6 до 62,1%). Отмечено повышение количества долей с клиническим маститом с 1 четверти до 5.

Анализ распространения воспаления по четвертям вымени показал значительное снижение количества долей со скрытым маститом – в 1,2 раза (с 80 до 66) и в 1,6 раза долей с клиническим маститом. Распространение маститов на фоне применения пробиотических средств в ТОО АФ «Родина» показано на рисунке 26.



Рисунок 26 – Распространение маститов на фоне применения пробиотических средств в ТОО АФ «Родина»

В контрольной группе отмечено снижение количества коров, с поражением одной и более четвертей вымени, однако при анализе распространения мастита по долям вымени было установлено, что изменение количества пораженных маститом четвертей за период проведения исследования практически не произошло. Количество четвертей со скрытым маститом составило 75 до начала опыта и 73 – после окончания, с клиническим маститом – 6 четвертей до начала эксперимента и 5 после.

Также для определения эффективности консорциума было проведено исследование проб молока индивидуально от каждой коровы исследуемых групп (сборная проба из всех долей вымени) для количественного определения содержания соматических клеток. Кроме этого, до начала эксперимента и после завершения применения средств, проводили индивидуальный учет количества молока. Исследование проб молока на содержание соматических клеток проводилось на базе ТОО АФ «Родина».

Для определения ситуации по каждой группе было проведено исследование молока. Пробы молока отбирали до начала проведения научно-производственного опыта и повторно через 30 дней применения препаратов. Лабораторное исследование образцов для определения уровня соматических

клеток проводили на счетчике соматических клеток фирмы DeLaval, с флуорисцентно-оптическим методом определения клеток, еженедельно в течение 30 дней использования консорциума. Исследование проб молока показано на рисунке 27.



Рисунок 27 – Исследование проб молока индивидуально от каждой коровы на протяжении опыта в ТОО АФ «Родина»

Данные изменения мы связываем преимущественно с выявленными нарушениями машинного доения, такими как снятие доильного аппарата, без отключения от вакуума, длительное «холостое» доение, нестабильный уровень вакуума, что проявлялось выраженным беспокойством животных, а также наличием крови в остаточных порциях молока, которая определялась органолептически. Уровень соматических клеток в молоке показан на рисунке 28.

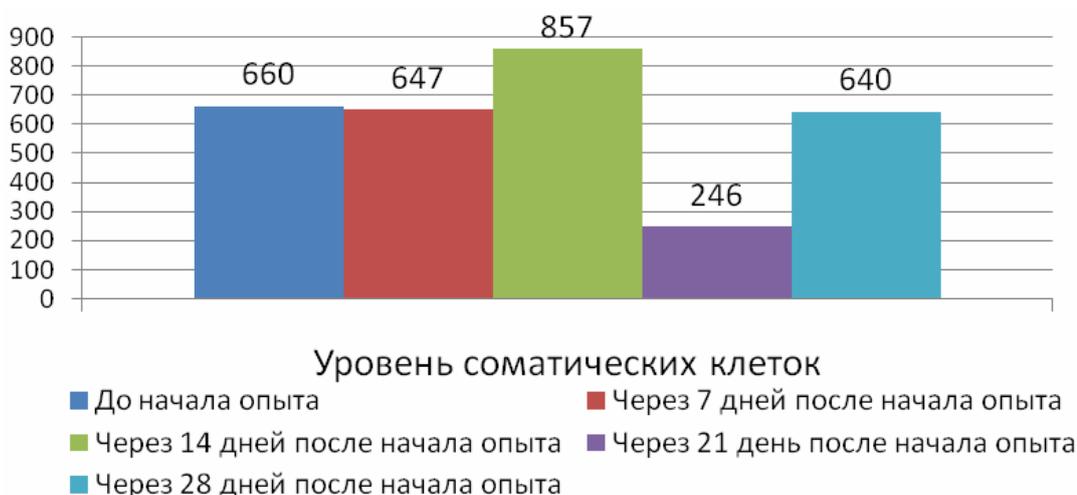


Рисунок 28 – Уровень соматических клеток в молоке на протяжении опыта в ТОО АФ «Родина»

Проведенные исследования молока из опытного корпуса представленные на рисунке 28, показали скачкообразные изменения содержания соматических клеток у коров. До начала применения комплекса пробиотических средств уровень соматических клеток составлял 660 тыс./мл, затем отмечалось его резкое увеличение в 1,3 раза по сравнению с исходным, через 14 дней применения препаратов произошло снижение соматических клеток в 3,2 (до 246 тыс./мл), однако в дальнейшем отмечен рост соматических клеток до исходного уровня (640 тыс./мл).

Анализ полученных данных показал, что в опытной и контрольной группах произошло незначительное снижение количества молока, а также зафиксирован рост количества соматических клеток по группам, в 1,2 раза в опытной и в 1,1 раза в контрольной. Результаты анализа данных сведены в таблицу 19.

Таблица 19 – Показатели удоя и соматических клеток в опытной и контрольной группах

| Показатель | Исходные данные | | Окончание опыта | |
|----------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | опытная группа n=40 | контрольная группа n=21 | опытная группа n=40 | контрольная группа n=21 |
| Удой, кг | 21,2±0,5 | 20,8±0,6 | 20,3±0,6 | 19,3±0,6 |
| Сом. клетки, тыс./мл | 295,98±24,37 | 260,29±24,31 | 280,11±23,78 | 261,27±23,15 |

Разность достоверна, $p \leq 0,05$

Дополнительно нами были проанализированы данные по коровам с уровнем соматических клеток более 1000 тыс./мл, что является свидетельством развития воспалительного процесса в одной или нескольких четвертях молочной железы.

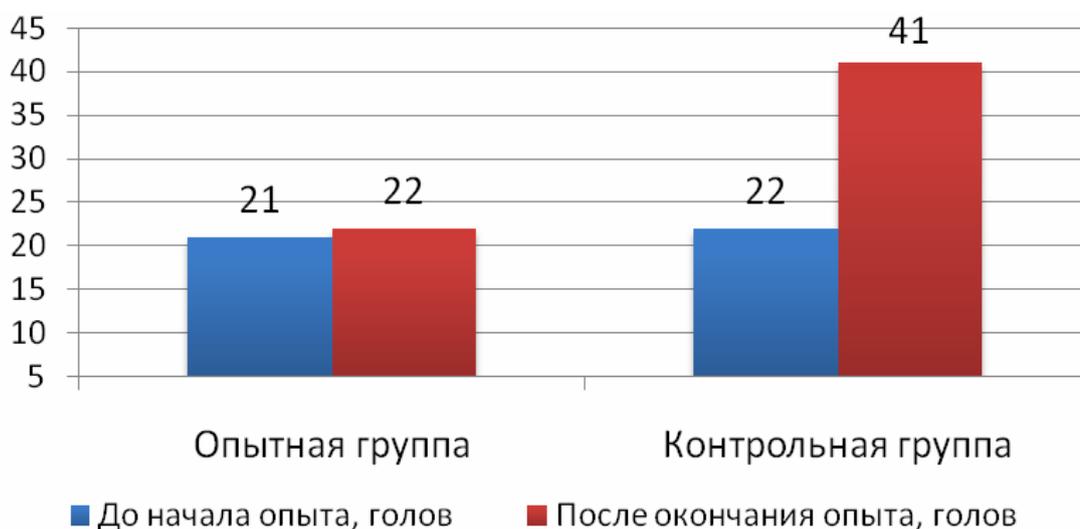


Рисунок 29 – Количество коров с воспалительным процессом в одной или нескольких четвертях вымени.

Полученные результаты, представленные на рисунке 29, показали, что в опытной группе существенных изменений в количестве животных с высоким уровнем соматических клеток не произошло – 21 корова до начала исследования, 22 коровы – после окончания применения консорциума.

В контрольной группе было выявлено до начала эксперимента 11 головы с повышенным уровнем соматических клеток, а через месяц зафиксирован значительный рост больных животных – в 2 раза, что составило 22 корову.

Распространение скрытого мастита по четвертям вымени при применении консорциума показано на рисунке 30.

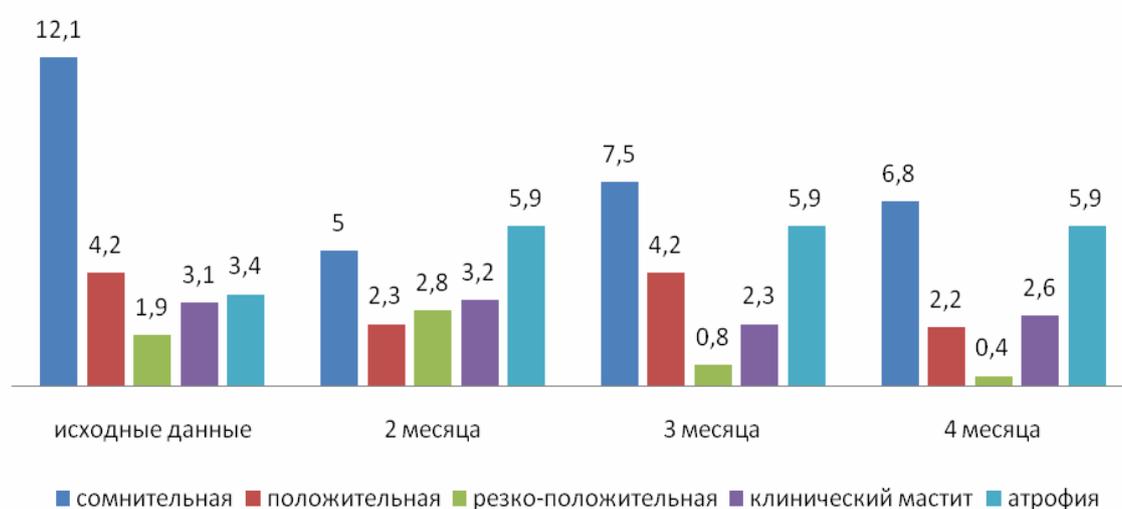


Рисунок 30 – Распространение скрытого мастита по четвертям вымени при применении консорциума

На основании проведенных исследований можно заключить, что использование средств, содержащих в качестве активного вещества пробиотические микроорганизмы, оказывает выраженное положительное влияние на ткани вымени коров в период лактации. Отмечена эффективность мероприятий с применением консорциума, который включает санацию животноводческого помещения, так и непосредственно средств для обработки вымени до и после доения. При использовании консорциума, содержащих пробиотические микроорганизмы положительное влияние на состояние молочной железы возникает быстрее, чем при использовании только средств для профилактики мастита. Однако нами было установлено, что использование в монорежиме средств для профилактики воспалительных заболеваний молочной железы также приводит к сокращению скрытых маститов и гиперкератоза сосков вымени по стаду преимущественно при длительном использовании средств (не менее 3-4 месяцев).

3.6 Экономическая эффективность использования пробиотических средств для профилактики мастита

Данные для расчета экономической эффективности профилактических мероприятий в ТОО АФ «Родина» представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Данные для расчетов эффективности профилактических мероприятий

| Показатель | Контрольная группа | Опытная группа |
|---|--------------------|----------------|
| Продуктивность на одну фуражную корову, кг | 4960 | 4960 |
| Среднесуточный удой на 1 корову, кг | 16,3 | 16,3 |
| Количество молока за сутки, кг | 2070,1 | 1597,4 |
| Средняя цена реализации 1 ц молока, тг. | Первый сорт | Высший сорт |
| | 9600 | 11700 |
| Ветеринарные затраты. | 81600 | 190080 |
| Количество дней со сниженной продуктивностью | 92 | 14 |
| Снижение удоев на один день заболевания молочной железы, кг | 1,6 | 1,6 |
| Количество коров в группах, голов | 127 | 98 |

Формулы расчетов:

$$U_0 = U_1 + U_2$$

где U_0 – общий ущерб;

U_1 – ущерб от снижения продуктивности;

U_2 – ущерб от снижения качества продукции.

$$U_1 = M_3 \cdot (B_3 - B_6) \cdot T \cdot Ц$$

где M_3 – количество животных с пониженной продуктивностью (гол);

$B_3 - B_6$ – среднесуточная продуктивность здоровых и больных животных (кг);

T – количество дней жизни животных с пониженной продуктивностью;

$Ц$ – закупочная цена 1 ц молока.

$$U_2 = B_p \cdot (Ц_3 - Ц_6)$$

где B_p – количество реализованной продукции пониженного качества;

$Ц_3$ и $Ц_6$ – цены реализации единицы продукции, получаемой

соответственно от здоровых и больных животных, тг.

$$Пу = У_0(\text{контроль}) - У_0(\text{опыт})$$

где Пу – предотвращенный экономический ущерб.

$$Эв = Пу - Зв$$

где Эв – экономический эффект;

Зв – дополнительные затраты;

Эв : М – экономическая эффективность на одну голову. Эр = Эв : Зв Эр – экономический эффект на рубль затрат.

Результаты расчетов сведены в таблицы 21, 22.

Таблица 21 – Результаты расчета предотвращенного ущерба при применении пробиотических средств, тг.

| Показатель | Контрольная группа | Опытная группа |
|----------------|--------------------|----------------|
| У1 | 1794662,4 | 210739,2 |
| У2 | 3999433,2 | 469635,6 |
| У ₀ | 4461453,6 | 680374,8 |
| Пу | - | 3781078,8 |

Таблица 22 – Результаты расчета экономического эффекта при применении пробиотических средств

| Показатель | Опытная группа |
|------------|----------------|
| Эв | 3590998,8 |
| Эв : М | 36642,6 |
| Эр | 113,34 |

Применение пробиотического средства является экономически целесообразным, так как экономический эффект композиций, на затрат при применении пробиотических средств профилактики заболеваний молочной железы у лактирующих коров составляет 113,34 тг., в связи с чем оно является экономически целесообразным и позволяет рекомендовать их использование для профилактики заболевания мастит.

Применение пробиотического средства является экономически целесообразным, так как экономический эффект композиций, на затрат при применении пробиотических средств профилактики заболеваний молочной железы у лактирующих коров составляет 113,34 тг., в связи с чем оно является экономически целесообразным и позволяет рекомендовать их использование для профилактики заболевания мастит.

При выращивании культур штаммов *B. subtilis* глубинным способом их биологические свойства и специфическая активность не изменялись. Питательные среды, используемые для выращивания изучаемых культур

удовлетворяют их физиологические потребности, они являются стандартными по составу и недорогими. Важно отметить, что штаммы *B. Subtilis* могут служить стабильным материалом для получения экспериментального препарата, так как они сохраняют жизнеспособность и активность при лиофильном высушивании и в процессе хранения (не менее двух лет).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ввиду отсутствия данных о применении в сравнительном аспекте препаратов пробиотического «Pip House Cleaner» и химического «Кристалл» в животноводческих предприятиях молочного направления, нами было принято решение провести исследования в условиях хозяйства ТОО АФ «Родина».

В Казахстане молочное скотоводство считается одной из наиболее социально значимых отраслей сельского хозяйства. Удельный вес продукции этой отрасли в общем объеме валовой продукции сельского хозяйства составляет 17%, а в общем объеме продукции животноводства - 35%.

Одним из основных критериев безопасности и качества сырого молока - общая бактериальная обсемененность. Этот показатель должен учитывать наличие в молоке любых видов молока, способных оказать влияние на безопасность и качество молочных продуктов.

Содержание соматических клеток является важным показателем безопасности молока и показывает его пригодность для переработки.

Пробиотические препараты позволяют эффективно контролировать болезненное состояние вымени коров. Это не лекарственные препараты и их целью является не лечение, а профилактика соответствующего заболевания.

Они также продуцируют большое количество антибиотикоподобных, биологически активных и других веществ, подавляющих патогенные микроорганизмы, в том числе и, тех, что утратили чувствительность к обычным антибиотикам.

При этом одновременно существует необходимость и целесообразность проведения научно-исследовательских работ по проблеме пробиотиков в аспекте совершенствования имеющихся и создания новых МИБП данного вида для повышения их эффективности, в особенности для лечения тяжелых форм названных заболеваний, осложненном иммунном статусе.

В обследованном хозяйстве на частоту роста заболевания коров субклиническим маститом оказывали влияние, прежде всего условия содержания, эксплуатации, уровень ветеринарного обслуживания. При машинном доении нарушаются санитарно-гигиенические правила. На ферме отсутствует изолятор, здоровые и больные животные содержатся совместно, что ведет к накоплению во внешней среде патогенной, условнопатогенной микрофлоры. Таким образом, на ферме хозяйства на организм животного действует целый ряд негативных факторов.

Однако, в связи со значительным ростом молочной продуктивности у

коров происходят морфологические изменения тканей молочной железы, что приводит к появлению и широкому распространению такого заболевания как гиперкератоз сосков вымени (Дойтц А., Обритхауз В., 2010; Данилов М.С., 2012; Mein G.A., Neijenhuis F. et al., 2001; Haghkhab M. et al., 2011; Sterrett A.E. et al., 2013).

В результате проведенной работы по изучению микробной обсемененности, проведенных до и после дезинфекции помещений для содержания коров выяснилось, что препарат «Pip House Cleaner» оказывает значительное действие на общее число микроорганизмов. Наибольшая обсемененность в образцах с поверхностей стен, а наименьшее число микроорганизмов было обнаружено в образцах с поилок. И так, применяемые препараты оба оказались действенными, но в результате проведенного сравнительного анализа выяснилось, что противомикробные способности пробиотического препарата «Pip House Cleaner» выше чем у химического препарата. Наши данные подтверждаются материалами исследований ряда авторов таких как Омарова А.Б. в своей работе «Пробиотикалық препараттар өндірісінің технологиясын және нормативтік құжаттарын әзірлеу» (2019), в работе которой, показывается высокая ценность и значимость пробиотических штаммов. Так же в работе Плохушко Е.Н. «Разработка нового пробиотика на основе бактерий видов *Lactobacillus plantarum* и *Bacillus subtilis*» автор отмечает, что создание нового эффективного бактериального препарата целесообразнее всего проводить на основе культур активных штаммов *Bacillus subtilis* обладает высокими адгезивными свойствами, а также высокой антимикробной активностью в отношении различных видов патогенных и условно -патогенных микроорганизмов.

Сходные данные о частоте заболевания лактирующих коров субклиническим маститом приводят Павленко О.Б. своей работе на тему «Применение пробиотика «Ветом-3» для лечения коров при субклиническом мастите», а так же такие авторы как О.А. Липатова с соавт. (2004), В.А. Париков с соавт. (2002).

Результаты наших исследований подтверждают ряд авторов.

Кравченко Г.А. (2014) отмечает в своих исследованиях, что комплекс пробиотических средств серии РІР оказывает положительное влияние на ткани молочной железы и особенно сосков вымени. Применение указанных средств позволяет сократить количество в стаде животных, имеющих субклинический мастит, так как пробиотические агенты препятствуют размножению патогенных микроорганизмов на коже сосков и вымени. На фоне применения пробиотических средств фирмы Chrisal из серии РІР для обработки вымени коров происходит снижение количества соматических клеток в сборном молоке в 1,5-1,7 раза.

Перспективной альтернативой применению химиотерапевтических средств являются пробиотические препараты (Кулаков Г.В., 2003). Штаммы бактерий, которые являются действующим началом пробиотиков, обладают

четко выраженной антагонистической активностью к широкому спектру патогенных и условнопатогенных микроорганизмов, выделяют биологически активные вещества, необходимые макроорганизму (ферменты, витамины). Пробиотики не оказывают вредного побочного действия, нетоксичны, продукция после их применения может использоваться без ограничений.

Результаты проведенного нами анализа применения средств на основе пробиотиков как альтернатива использованию дезинфицирующих средств и антибиотиков для аэрозольной обработки животноводческих помещений для создания в них благоприятного микроклимата по данному вопросу имеются и аналогичные данные работы у авторов А.С. Баркова, А.Ф. Колчина, Е.И. Шурманова, М. И. Барашкин (2013) наименование статьи «Опыт применения пробиотических средств для профилактики мастита и повышения качества молока у коров. По данным исследований авторов А.С. Баркова, А.Ф. Колчина, Е.И. Шурманова, М.И. Барашкин (2013) анализ полученных через месяц после начала опыта данных показал, что использование пробиотических средств оказало положительное влияние на состояние вымени у коров. В опытной группе было выявлено значительное увеличение процента животных со здоровым выменем – 30,3%, что в 2,9 раза выше, чем в контрольной. Кроме того, на значительно более низком уровне регистрировалось наличие у коров скрытого мастита – 39,7% в опытной группе и 54,2% в контрольной (ниже в 1,4 раза). Процент животных, имеющих сомнительную реакцию с маститным тестом, в обеих группах находился на уровне 30-35%. Так же как и в нашей работе, результаты исследований оказывают положительное влияние после применения средства «PIP» в общем на молочные, в частности на состояние сосков вымени.

Культура штамма *Bacillus subtilis* 3, в свою очередь, проявляет высокую антагонистическую активность в отношении многих патогенных и условно-патогенных мик-роорганизмов из родов *Candida*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Campilobacter*, *Shigella*, *Salmonella*. В то же время культура *Bacillus subtilis* не оказывает антагонистического действия на представителей нормальной микрофлоры, что создает условия для бесконкурентного восстановления аутофлоры. Бациллы уступают лактобактериям в формировании колонизационной резистентности.

Ограждающие конструкции, технологическое оборудование и воздух производственных помещений цехов первичной переработки мясокомбинатов в значительной степени обсеменены мезофильными аэробными и факультативно анаэробными микроорганизмами, что требует включения в технологический процесс дезинфекционных мероприятий с профилактической целью. Сравнительный анализ химического препарата «Кристалл-900 и пробиотического препарата «Pip House Cleaner» на микроорганизмы показал снижение числа микробов в 2 раза (стен, кормушек, металлических перегородок), в 3 раза – поилок после обработки пола препаратом «Pip House Cleaner». Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных

микроорганизмов в поверхностях животноводческого помещения составляет от $16 \pm 0,02$, $1030 \pm 0,2$, $3,6 \pm 0,002$, $3,4 \pm 0,05$, $4,3 \pm 0,06$, $17 \pm 0,3$, $1023 \pm 0,04$, $2,9 \pm 0,02$, $3,6 \pm 0,01$, $3,7 \pm 0,02$. в зависимости от времени экспозиции.

По данным исследования проведенного в лабораторных условиях, в молоке коров после смыва вымени с маститом встречается кишечная палочка (40% исследованных проб), которая в 25% случаев выявляется совместно с *Streptococcus agalactiae*, а также в молоке 50% коров *Staphylococcus aureus* встречается в ассоциации с *Proteus mirabilis* в 20% и *Escherichia coli* в 30%.

После экспозиции в течение 30 дней пробиотический препарат «Pip House Cleaner» проявляет бактерицидные свойства к бактериям таким как *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumonia*, *Str. faecalis*, *Str. xylosus*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida*, у химического препарата «Кристалл-900» бактерицидные свойства проявляются к бактериям рода *Streptococcus agalactiae*, *Citrobacter diversus*, *freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pr. vulgaris*, *Serratia liquefaciens*, *Candida*. Тем самым мы определили, что длительное использование пробиотического препарата «Pip House Cleaner» показывает наиболее подавляющий результат. Однако, оба препарата не оказывают бактерицидную активность к бактериям рода *Staphylococcus aureus*, которая является возбудителем заболевания мастит [218, р. 1841-1847].

Оценка эффективности пробиотических средств проводилась на базе двух сельхозпредприятий. При этом учитывали влияние пробиотических средств фирмы Chrisal как на состояние микробного фона животноводческого помещения так и на состояние сосков вымени и на уровень распространения скрытого мастита. В своем составе указанные средства содержат живые культуры пробиотиков, животного происхождения энзимы, поверхностно активные вещества и очищенную воду. Пробиотические бактерии, в продуктах фирмы Chrisal, относятся к семейству Bacillus, к биологически безопасному классу: непатогенные, в частности это *Bac. subtilis*, *Bac. pumilus*, *Bac. licheniformis* и *Bac. megaterium*.

Полученные результаты показали эффективность пробиотических продуктов при их применении как в комплексной программе использования пробиотических продуктов в условиях сельхозорганизаций, так и при использовании непосредственно только для обработки вымени. Наибольший положительный эффект наблюдается через 3-4 месяца применения. Также отмечалось сокращение количества соматических клеток по стаду. Выявлена более быстрая реакция при внедрении комплексной программы, с обработкой животноводческого помещения аэрозольным методом продуктами, содержащими пробиотические бактерии, а также выпаивание их в незначительных концентрациях внутрь. Применение пробиотических средств показало себя высокоэффективным и перспективным направлением, так как они не вызывают привыкания у животных, а также являются экологически безопасными продуктами.

На основании проведенных исследований можно заключить, что

использование средств, содержащих в качестве активного вещества пробиотические микроорганизмы, оказывает выраженное положительное влияние. Отмечена эффективность мероприятий с применением консорциума, который включает санацию животноводческого помещения, так и непосредственно средств до и после доения. При использовании консорциума, содержащих пробиотические микроорганизмы положительное влияние на состояние молочной железы возникает быстрее, чем при использовании только средств для профилактики мастита. Однако нами было установлено, что использование в монорежиме средств для профилактики воспалительных заболеваний молочной железы также приводит к сокращению скрытых маститов по стаду преимущественно при длительном использовании средств (не менее 3-4 месяцев).

Исследования молока дойных коров на мастит прибором «Маститон» или другими способами должны быть регулярными. Необходимо своевременное медикаментозное лечение коров, имеющих подозрения на мастит. Кроме того, необходимо уделять должное внимание доильному оборудованию, в частности резине доильного стакана. Его износ отрицательно воздействует на кожу соска, вызывая микротрещины, которые в свою очередь являются благоприятной средой для патогенной микрофлоры, вызывающей инфицирование вымени. В наших исследованиях установили, что использование пробиотических средств Pip House Cleaner оказывает положительное влияние на качество молока.

Соглашусь с утверждениями авторов таких как Павленко О.Б. и Плохушкр Е.Н. о том, что мастит невозможно ликвидировать. Его можно лишь сдерживать на уровне, отвечающем той или иной технологии содержания, доения животных и санитарному статусу фермы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования сделаны следующие **выводы**:

1. В результате мониторинга микробной обсемененности выявлено что наименьшая загрязненность получена на поверхностях поилок, кормушек и стен, что составило на металлических перегородок 51%, в образцах с пола 38% от общей обсемененности микроорганизмов.

2. Сравнительный анализ химического препарата «Кристалл-900 и пробиотического препарата «Рip House Cleaner» на микроорганизмы показал снижение числа микробов в 2 раза (стен, кормушек, металлических перегородок), в 3 раза – поилок после обработки пола препаратом «Рip House Cleaner». Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в поверхностях животноводческого помещення составляет от $16 \pm 0,02$, $1030 \pm 0,2$, $3,6 \pm 0,002$, $3,4 \pm 0,05$, $4,3 \pm 0,06$, $17 \pm 0,3$, $1023 \pm 0,04$, $2,9 \pm 0,02$, $3,6 \pm 0,01$, $3,7 \pm 0,02$. в зависимости от времени экспозиции.

3. Обработка помещений для содержания коров пробиотическими средствами до доения и после доения Рip House Cleaner, на первом этапе исследований привело к снижению количества соматических клеток в молоке на 18,4%, на втором этапе – на 84,0%, что составило $(1,5 \pm 0,09) \times 10^5$ в 1 см^3 , при использовании химического средства Кристалл-900 на первом этапе показало к снижению соматических клеток на 12,8%, на втором этапе – 51,9%, соответственно соматических клеток составило $(2,6 \pm 0,06) \times 10$ в 1 см .

4. Ветеринарно-санитарная оценка молока по микробной обсемененности при применении Рip House Cleaner, уменьшилась в 4,9 раза, при повторном использовании – в 70,4 раза и КМАФАнМ составило $(2,7 \pm 0,05) \times 10^4$ КОЕ/ см^3 , после применения Кристалл-900 выявлено снижение КМАФАнМ в 5,0 раз, при повторном использовании – в 6,6 раза, что составило $(1,8 \pm 0,06) \times 10^4$ КОЕ/ см^3 . Качество молока коров опытных групп по КМАФАнМ соответствует требованиям современных нормативных документов. Максимальное снижение микробиологической обсемененности молока выявили при использовании пробиотического средства.

5. Отработана технология получения биомассы для создания консорциума, при этом установлено, что экспериментальный образец консорциума оказывает положительное влияние на состояние молочной железы, идет восстановление молочной железы и подавляющее действие на

развитие бактериальной обсемененности.

Предложения:

1. При производстве консорциума рекомендуется использовать технологию глубинного выращивания культур *B. subtilis*.

2. Комплексный бактериальный препарат использовать в качестве saniрующего средства в хозяйствующих объектах, при организации профилактических мероприятий.

3. Для улучшения качества молока коров по микробиологической обсемененности и количеству соматических клеток предлагаем использовать пробиотическое средство.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Lucy M.C. Reproduction loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? // *J. Dairy Sci.* – 2001. – Vol. 84. – P. 1277-1293.
- 2 De Vliegher S., Fox L.K., Piepers S. et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of disease, potential impact, prevention and control // *J. Dairy Sci.* – 2003. – Vol. 95. – P. 1025-1040.
- 3 Ruegg P.L. Investigation of mastitis problems on farms // *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* – 2003. – Vol. 19. – P. 47-73.
- 4 Halasa T., Huijps K., Østerås O. et al. Economic effects of bovine mastitis management: A review // *Vet. Quart.* – 2007. – Vol. 29. – P. 18-31
- 5 Jamali H., Barkema H.W., Jacques M. et al. Invited review: Incidence, risk factors, and effects on clinical mastitis recurrence in dairy cows // *J. Dairy Sci.* – 2018. – Vol. 101. – P. 4729-4746
- 6 Philpot W.N. A backward glance—A forward look // *Proceed. of the 42nd British natl. conc. – Stoneleigh; Houston, 2003.* – P. 144-155
- 7 Ullah S. Effect of Mastitis on Milk Composition in Buffaloes under Field Conditions. MSc (Hons.): thes. ... veter – Faisalabad: University of Agriculture, 2004. – 208 p.
- 8 Heikkilä A.M., Nousiainen J.I., Pyörälä S. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling // *J. Dairy Sci.* – 2012. – Vol. 95. – P. 139-150.
- 9 Bezman D., Lembierskiy-Kuzin L., Katz G. et al. Influence of intramammary infection of a single gland in dairy cows on the cow's milk quality // *J. Dairy Res.* – 2015. – Vol. 82. – P. 304-311.
- 10 Sánchez-Macías D., Morales-delaNuez A., Torres A. et al. Effects of somatic cells to carpine milk on cheese quality // *Int. Dairy. J.* – 2013. – Vol. 29. – P. 61-67.
- 11 Sánchez-Macías D., Hernández-Castellano L.E. et al. Somatic cells: A potential tool to accelerate low-fat goat cheese ripening // *Int. Dairy J.* – 2020. – Vol. 102. – P. 104598.
- 12 Blum S., Heller E.D., Krifucks O. et al. Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset // *Vet. Microbiol.* – 2008. – Vol. 132. – P. 135-148.
- 13 Zouharova M., Rysanek D. Multiplex PCR and RPLA Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic Strains from Bulk Tank Milk // *Zoonoses Public Health.* – 2008. – Vol. 55. – P. 313-319.
- 14 Abdullah S.N., You K.Y., Hisham Khamis N. et al. Modeling the Dielectric Properties of Cow's Raw Milk under Vat Pasteurization // *Prog. Electromagn. Res.* – 2019. – Vol. 84. – P. 157-166.
- 15 Jain N.C. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. Symposium: Bovine Mastitis // *J. Dairy Sci.* – 1979. – Vol. 62. – P. 128-134
- 16 Wellnitz O., Bruckmaier R.M. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection // *Vet. J.* – 2012. – Vol. 192. – P. 148-152.
- 17 Vakkamäki J., Taponen S., Heikkilä A.M. et al. Bacteriological etiology

and treatment of mastitis in Finnish dairy herds // *Acta Vet. Scand.* – 2017. – Vol. 59. – P. 33-1-33-11.

18 Idriss S.E., Foltys V. et al. Mastitis pathogens in milk of dairy cows in Slovakia // *Slovak J. Anim. Sci.* – 2013. – Vol. 46. – P. 115-119.

19 Holko I., Tanc̣in V., Vrškova M. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia // *J. Dairy Res.* – 2019. – Vol. 86. – P. 436-439.

20 Smith K.L., Todhunter D.A., Schoenberger P.S. Symposium: Environmental effects on cow health and Performance // *J. Dairy Sci.* – 1985. – Vol. 68. – P. 1531-1553.

21 Zehner M.M., Farnsworth R.J., Appleman R.D. et al. Growth of Environmental Mastitis Pathogens in Various Bedding Materials // *J. Dairy Sci.* – 1985. – Vol. 69. – P. 1932-1941.

22 Klaas I.C., Zadoks R.N. An update of environmental mastitis: Challenging perceptions // *Transbound Emerg. Dis.* – 2017. – Vol. 65. – P. 166-185

23 Jánosi S., Szigeti G., Rátz F. et al. *Prothotoca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions // *Vet. Quart.* – 2001. – Vol. 23. – P. 80-83.

24 Osumi T., Kishimoto Y., Kano R. et al. *Prothotoca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan // *Vet. Microbiol.* – 2008. – Vol. 131. – P. 419-423.

25 Eberhart R.J. Coliform mastitis // *Vet. Clin. N. Am.* – 1984. – Vol. 6. – P. 287-301.

26 Nemeth, J.; Muckle, C.A.; Gyles, C.L. In vitro comparison of bovine mastitis and fecal *Escherichia coli* isolates. *Vet. Microbiol.* 1994, 40, 231–238.

27 Jones G.M. Understanding the Basics of Mastitis // https://vtechworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/80744/VCE404_233.pdf?sequence.14.07.2021.

28 Tančín V., Kirchnerová K., Foltys V. et al. Microbial contamination and somatic cell count of bovine milk striped and after udder preparation for milking // *Slovak J. Anim. Sci.* – 2006. – Vol. 39. – P. 214-217.

29 King, J.S. *Streptococcus uberis*: A review of its role as a causative organism of bovine mastitis. II. Control of infection // *Br. Vet. J.* – 1981. – Vol. 137, Issue 2. – P. 160-165.

30 Natzke R.P. Elements of mastitis control // *J. Dairy Sci.* – 1981. – Vol. 64, Issue 6. – P. 1431-1442.

31 Sommerhäuser J., Kloppert B., Wolter W. et al. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme // *Vet. Microbiol.* – 2003. – Vol. 96. – P. 91-102.

32 Sharif A., Umer M., Muhammad G. Mastitis control in dairy production // *J. Agric. Soc. Sci.* – 2009. – Vol. 5. – P. 102-105.

33 Petersson-Wolfe C.S., Mullarky I.K., Jones G.M. *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection, and Control // *VA Coop. Ext.* – 2010. – Vol. 404. – P. 1-7.

34 Hillerton J.E., Bramley R.T., Staker R.T. et al. Patterns of intramammary

infection and clinical mastitis over a 5-year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures // *J. Dairy Sci.* – 1995. – Vol. 62. – P. 39-50.

35 National Mastitis Council. National Mastitis Council Recommended Mastitis Control Program. 2001 // <http://www.nmconline.org>. 8.05.2020.

36 Gruet P., Maincent P., Berhelot X. et al. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: Review and perspectives // *Adv. Drug Deliver. Rev.* – 2001. – Vol. 50. – P. 245-259.

37 Ruegg P. 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention // *J. Dairy Sci.* – 2017. – Vol. 100. – P. 10381-10397.

38 Khan M.Z., Khan A. Basic facts of mastitis in dairy animals: Review // *Pak. Vet. J.* – 2006. – Vol. 26. – P. 204-208.

39 Tančin V., Uhrinc̣at' M. The effect of somatic cell on milk yield and milk flow at quarter level // *Vet. Zootec.* – 2014. – Vol. 66. – P. 69-72.

40 Shearer, J.K.; Harris, B., Jr. Mastitis in Dairy Goats // https://mysrf.org/pdf/pdf_dairy/goat_handbook/dg5.pdf. 10.04.2021.

41 Seegers H., Fourichon C., Beaudeau F. Review article: Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds // *Vet. Res.* – 2003. – Vol. 34. – P. 475-491.

42 Peeler E.J., Green M.J., Fitzpatrick J.L. et al. Study of clinical mastitis in British dairy herds with bulk milk somatic cell count less than 150,000 cells/ml // *Vet. Rec.* – 2002. – Vol. 10. – P. 170-176.

43 Barkema H.W., von Keyserlingk M.A., Kastelic J.P. et al. Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare // *J. Dairy Sci.* – 2015. – Vol. 98. – P. 7426-7445.

44 Ndahetuye J.B., Persson Y., Nyman A. et al. Aetiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in pre-urban areas of Kigali in Rwanda // *Trop. Anim. Health Prod.* – 2019. – Vol. 51. – P. 2037-2044.

45 Ganda E.K. et al. Evaluation of an On-Farm Culture System (Accumast) for Fast Identification of Milk Pathogens Associated with Clinical Mastitis in Dairy Cows // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11. – P. e0155314-1-e0155314-12.

46 Asmare A.A., Kassa F. Incidence of dairy cow mastitis and associated risk factors in Sodo town and its surroundings, Wolaila zone, Ethiopia // *Slovak J. Anim. Sci.* – 2017. – Vol. 50. – P. 77-89.

47 Heikkilä A.M., Liski E., Pyörälä S. et al. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis // *J. Dairy Sci.* – 2018. – Vol. 101. – P. 9493-9504.

48 Saidani M., Messadi L., Soudani A. et al. Epidemiology, antimicrobial resistance, and extended-spectrum Beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in clinical bovine mastitis in Tunisia // *Microb. Drug Resist.* – 2018. – Vol. 24. – P. 1242-1248.

49 Zi C., Zeng D., Ling N. et al. An improved assay for rapid detection of viable *Staphylococcus aureus* cells by incorporating surfactant and PMA treatments in qPCR // *BMC Microbiol.* – 2018. – Vol. 18. – P. 132-1-132-8.

50 Todhunter D.A., Smith K.L., Hogan J.S. Growth of Gram-negative bacteria

- in dry cow secretion // *J. Dairy Sci.* – 1990. – Vol. 73. – P. 363-372.
- 51 Fox L.K., Gay J.M. Contagious mastitis // *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* – 1993. – Vol. 9. – P. 475-487.
- 52 Zadoks R.N., Middleton J.R., McDougall S. et al. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans // *J. Mammary Gland Biol.* – 2011. – Vol. 164. – P. 357-372.
- 52 Burvenich C., van Merris V., Mehrzad J. et al. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors // *Vet. Res.* – 2003. – Vol. 34. – P. 521-564.
- 53 Menzies F.D., Bryson D.G., McCallion T. et al. A study of mortality among suckler and dairy cows in Northern Ireland in 1992 // *Vet. Rec.* – 1995. – Vol. 137. – P. 531-536.
- 54 Lehtolainen, T. *Escherichia Coli Mastitis: Bacterial Factors and Host Response: thes. ... PhD.* – Helsinki: University of Helsinki, 2004. – 62 p.
- 55 Suriyasathaporn W., Heuer C., Noordhuizen-Stassen E.N. et al. Hyperketonaemia and the impairment of udder defence: A review // *Vet. Res.* – 2000. – Vol. 31. – P. 397-412.
- 56 Leininger D.J., Roberson J.R., Elvinger F. et al. Evaluation of frequent milkout for treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* – 2003. – Vol. 222. – P. 63-66.
- 57 van Werven T., Noordhuizen-Stassen E.N., Daemen A.J.J.M. et al. Preinfection in vitro chemotaxis, phagocytosis, oxidative burst, and expression of CD11/CD18 receptors and their predictive capacity on the outcome of mastitis induced in dairy cows with *Escherichia coli* // *J. Dairy Sci.* – 1997. – Vol. 80. – P. 67-74.
- 58 Schukken Y.H., Bennett G.J., Zurakowski M.J. et al. Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis // *J. Dairy Sci.* – 2011. – Vol. 94. – P. 6203-6215.
- 59 Kehrli M.E.J., Harp J.A. Immunity in the mammary gland // *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* – 2001. – Vol. 17. – P. 495-516.
- 60 Hogan J., Smith K.L. Coliform mastitis // *Vet. Res.* – 2002. – Vol. 34. – P. 507-519.
- 61 Dosogne H., Meyer E., Sturk A. et al. Effect of enrofloxacin treatment on plasma endotoxin during bovine *Escherichia coli* mastitis // *Inflamm. Res.* – 2002. – Vol. 51. – P. 201-205.
- 62 Bradley A.J., Green M.J. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period // *J. Dairy Sci.* – 2000. – Vol. 83. – P. 1857-1965.
- 63 Tančin V., Mikláš Š., Macňuhová L. A review: Possible physiological and environmental factors affecting milk production and udder health of dairy cows // *Slov. J. Anim. Sci.* – 2018. – Vol. 51. – P. 32-40.
- 64 Ericsson Unnerstad H., Lindberg A. Persson Walker K. et al. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors // *Vet. Microbiol.* –

2009. – Vol. 137. – P. 90-97.

65 Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcli K.W. et al. Veterinary medicine: A textbook of diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats // *Can. Vet. J.* – 2007. – Vol. 10. – P. 673-762.

66 Ribeiro M.G., Motta R.G., Paes A.C. et al. Communication: Peracute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae* // *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* – 2008. – Vol. 60. – P. 485-488.

67 Schukken Y.H., Chu M., Moroni P. et al. The “other” gram-negative bacteria in mastitis: *Klebsiella*, *Serratia*, and more // *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* – 2012. – Vol. 28. – P. 239-256

68 Oliveira L., Hulland C., Ruegg P.L. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin // *J. Dairy Sci.* – 2013. – Vol. 96. – P. 7538-7549.

69 Wilson D.J., Gonzalez R.N., Case K.L. et al. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens // *J. Dairy Sci.* – 1999. – Vol. 82. – P. 1664-1670.

70 Hertl J.A., Schukken Y.H., Welcome F.L. et al. Pathogen-specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows // *J. Dairy Sci.* – 2014. – Vol. 97. – P. 1465-1480.

71 Bannerman D.D., Paape M.J., Hare W.R. et al. Characterization of bovine innate immune response to intramammary infection with *Klebsiella pneumoniae* // *J. Dairy Sci.* – 2014. – Vol. 87. – P. 2420-2432.

72 Zadoks R.N., Gillespie B.E., Barkema H.W. et al. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds // *Epidemiol. Infect.* – 2003. – Vol. 130. – P. 335-349

73 Davies P.L., Leigh J.A., Bradley A.J. et al. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* clinical mastitis in dairy herds: Strain heterogeneity and transmission // *J. Clin. Microbiol.* – 2016. – Vol. 54. – P. 68-74.

74 Cruz Colque J.I., Devriese L.A., Haesebrouck F. Streptococci and Enterococci associated with tonsils of cattle // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1993. – Vol. 16. – P. 72-74.

75 Lopez-Benavides M.G., Williamson J.H., Pullinger G.D. et al. Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in pasture-based dairy farm // *J. Dairy Sci.* – 2007. – Vol. 90. – P. 5558-5566.

76 Leach K.A., Archer S.C., Breen J.E. et al. Recycling manure as cow bedding: Potential benefits and risky for UK dairy farms // *Vet. J.* – 2015. – Vol. 206. – P. 123-130.

77 Tassi R., McNeilly N., Fitzpatrick J.L. et al. Strain-specific pathogenicity of putative host-adapted and nonadapted strains of *Streptococcus uberis* in dairy cattle // *J. Dairy Sci.* – 2013. – Vol. 96. – P. 5129-5145.

78 Hughes J. Bedding Systems and Mastitis // <http://www.britishmastitisconference.org.uk/BMC1999papers/Hughes.pdf>. 14.05.2020.

79 Bramley A.J., Dodd F.H. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis

- control—Progress and prospects // *J. Dairy Res.* – 1984. – Vol. 51. – P. 481-512.
- 80 Wilkinson A. To Seal or Not to Seal: Internal Teat Sealant Strategies // <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi.8.05.2020>.
- 81 Denis M., Parlane N.A., Lacy-Hulbert S.J. et al. Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying o cows // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2006. – Vol. 114. – P. 111-120.
- 82 Samson O., Gaudout N., Schmitt E. et al. Use of on-farm data to guide treatment and control mastitis caused by *Streptococcus uberis* // *J. Dairy Sci.* – 2016. – Vol. 99. – P. 7690-7699.
- 83 Milne M.H., Biggs A.M., Barrett D.C. et al. Treatment of perzistent intramammary infections with *Streptococcus uberis* in dairy cows // *Vet. Rec.* – 2005. – Vol. 157. – P. 245-250.
- 84 Pyörälä S. Treatment of mastitis during lactation // *Ir. Vet. J.* – 2009. – Vol. 62. – P. 40-44.
- 85 Todhunter D.A., Smith K.L., Hogan J.S. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland // *J. Dairy Sci.* – 1995. – Vol. 78. – P. 2366-2374.
- 86 McDougall S., Parkinson T.J., Leyland M. et al. Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows' milk // *J. Dairy Sci.* – 2004. – Vol. 87. – P. 2062-2072.
- 87 Lam T.J.G.M. Dynamics of Bovine Mastitis: A Field Study in Low Somatic Cell Count Herds: thes. .. doc. PhD. – Utrecht: Utrecht University, 1996. – 419 p.
- 88 Watt C.J. The Epidemiology of Intramammary Infection in Dairy Cows, with Particular Reference to *Streptococcus Uberis*: thes. .. doc. PhD. – Oxford: University of Oxford, 1999. – 550 p.
- 89 Zadoks R.N., Allore H.G., Barkema H.W. et al. Cow-and quarter-level risk factors of *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis // *J. Dairy Sci.* – 2001. – Vol. 84. – P. 2649-2663.
- 90 Lyhs U., Kulkas L., Katholm J. et al. *Streptococcus agalactiae* serotype IV in humans and cattle, northen Europe // *Emerg. Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 22. – P. 2097-2103.
- 91 Martinez G., Harel J., Higgins R. et al. Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 30. – P. 71-78.
- 92 Jensen N.E. Experimenal bovine group-B streptococcal mastitis induced by strains of human and bovine origin // *Nord. Vet. Med.* – 1982. – Vol. 34. – P. 441-450.
- 93 Merl K., Abdulmawjood A., Lämmler C. et al. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2003. – Vol. 223. – P. 87-92.
- 94 Sandy C. Milk Quality Pays: *Streptococcus agalactiae* Mastitis // A review. *Vet. J.* – 2011. – Vol. 187. – P. 1-5.

95 Tolla T. Bovine Mastitis in Indigenous Zebu and Borona Holstein Crosses in Southern Wollo: thes. ... doc. PhD. – Debre Zeit: Addis Ababa University, 1996. – 371 p.

96 Kassa F., Ayano A.A., Abera M. et al. Longitudinal study of bovine mastitis in Hawassa and Wendo Genet Small Holder Dairy farms // Glob. J. Sci. Frontier Res. – 2014. – Vol. 14. – P. 33-41.

97 Lakew B.T., Fayera T., Ali Y.M. Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of Streptococcus agalactiae from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia // Trop. Anim. Health Prod. – 2019. – Vol. 51. – P. 1507-1513.

98 Tomazi T., de Souza Filho A.F., Heinemann M.B. et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of Streptococcus agalactiae isolated from clinical mastitis in dairy cattle // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13. – P. e0199561-1- e0199561-12.

99 Edmonson P. Blitz therapy for eradication of Streptococcus agalactiae infections in dairy cattle // Practice. – 2011. – Vol. 33. – P. 33-37.

100 Mullarky I.K., Su C., Frieze N. et al. Staphylococcus aureus agr genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity // Infect. Immun. – 2001. – Vol. 69. – P. 45-51.

101 Lammers A. Pathogenesis of Staphylococcus Aureus Mastitis. In Vitro Studies on Adhesion, Invasion and Gene Expression: thes. ... doc. PhD. – Utrecht: Utrecht University, 2000. – 487 p.

102 Erskine R.J., Wagner S.A., De Graves F.J. Mastitis therapy and pharmacology // Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. – 2003. – Vol. 19. – P. 109-138.

103 Zhao X., Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control // J. Dairy Sci. – 2008. – Vol. 86. – P. 57-65.

104 Trinidad P., Nickerson S.C., Alley T.K. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers // J. Dairy Sci. – 1990. – Vol. 73. – P. 107-114.

105 Tenhagen B.A., Hansen I., Reinecke A. et al. Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition // J. Dairy Sci. – 2009. – Vol. 73. – P. 639-647.

106 Barkema H.W., Schukken Y.H., Zadoks R.N. Invited review: The role of cow, pathogen and treatment regimen in therapeutic success of bovine Staphylococcus aureus mastitis // J. Dairy Sci. – 2006. – Vol. 89. – P. 1877-1895.

107 De Oliveira A.P., Watts J.L., Salmon S.L. et al. Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Europe and the United States // J. Dairy Sci. – 2000. – Vol. 83. – P. 855-862.

108 Erskine R.J., Walker R.D., Bolin C.A. et al. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period // J. Dairy Sci. – 2002. – Vol. 85. – P. 1111-1118.

109 Makovec J.A., Ruegg P.L. Antimicrobial resistance of bacteria isolated

from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8905 samples (1994-2001) // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* – 2003. – Vol. 222. – P. 1582-1589.

110 Tenhagen B.A., Köster G., Wallmann J. et al. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany // *J. Dairy Sci.* – 2006. – Vol. 89. – P. 2542-2551.

111 Laevens H., Deluyker H., Schukken Y.H. et al. Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows // *J. Dairy Sci.* – 1997. – Vol. 80. – P. 3219-3226.

112 Tančin V., Ipema A.H., Hogewerf P. Interaction of Somatic Cell Count and Quarter Milk Flow Patterns // *J. Dairy Sci.* – 2007. – Vol. 90. – P. 2223-2228.

113 Reksen O., Sølverød L., Østerås O. Relationships between milk culture results and milk yield in Norwegian dairy cattle // *J. Dairy Sci.* – 2007. – Vol. 90. – P. 4670-4678..

114 Schalm O.W., Carroll E.J., Jain N.C. *Bovine Mastitis.* – Philadelphia: Lea and Febiger, 1971. – 360 p.

115 Sampimon O.C., Zadoks R.N., De Vliegher S. et al. Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples // *Vet. Microbiol.* – 2009. – Vol. 136. – P. 300-305.

116 Lundberg A., Nyman A., Unnerstad H.E. et al. Prevalence of bacterial genotypes and outcome of bovine clinical mastitis due to *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* // *Acta Vet. Scand.* – 2014. – Vol. 56. – P. 56-80.

117 Rantamäki L.K., Müller H.-P. Phenotypic characterization of *Streptococcus dysgalactiae* isolates from bovine mastitis by their binding to host derived proteins // *Vet. Microbiol.* – 1995. – Vol. 46. – P. 415-426.

118 Yeruham I., Schimmer A., Bami Y. Epidemiological and bacteriological aspects of mastitis associated with yellow-jacket wasps (*Vespula germanica*) in dairy cattle herd // *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* – 2002. – Vol. 49. – P. 461-463.

119 Brubaker R.R. Mechanisms of bacterial virulence // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1985. – Vol. 39. – P. 21-50.

120 Capuco A.V., Bright S.A., Pankey J.W. et al. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin // *J. Dairy Sci.* – 1992. – Vol. 75. – P. 2126-2130.

121 Fernandes J.B.C., Zanardo L.G., Galvão N.N. et al. *Escherichia coli* from clinical mastitis: Serotypes and virulence factors // *J. Vet. Diagn. Investig.* – 2011. – Vol. 23. – P. 1146-1152.

122 Bradley A.J., Breen J.E., Payne B. et al. An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom // *J. Dairy Sci.* – 2015. – Vol. 98. – P. 1706-1720.

123 Schwarz D., Dueterbeck U.S., Failing K. et al. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany // *J. Dairy Sci.* – 2010. – Vol. 92. – P. 5716-5728.

124 Giraud J.A., Calzolari A., Rampone H. et al. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers // *J. Dairy Sci.* – 1997. – Vol. 80. – P. 845-853.

125 Schukken Y.H., Günter J., Fitzpatrick J. et al. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2011. – Vol. 144. – P. 270-289.

126 Aitken S.L., Coel C.M., Sordillo L.M. Immunopathology of mastitis: Insights into disease recognition and resolution // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* – 2011. – Vol. 16. – P. 291-304.

127 Bannerman D.D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows // *J. Anim. Sci.* -2009. – Vol. 87. – P. 10-25.

128 Hernández-Castellano L., Wall S.K., Stephan R. et al. Milk somatic cell count, lactate dehydrogenase activity, and immunoglobulin G concentration associated with mastitis caused by different pathogens: A field study // *Schweizer Archiv Tierheilkunde.* – 2017. – Vol. 159. – P. 283-290.

129 Sipka A.A., Gurjar A., Klaessig S. et al. Prednisolone and cefapirin act synergistically in resolving experimental *Escherichia coli* mastitis // *J. Dairy Sci.* – 2013. – Vol. 95. – P. 4406-4418.

130 Wall S.K., Hernández-Castellano E., Ahmadpour A. et al. Differential glucocorticoid-induced closure of the blood-milk barrier during lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced mastitis in dairy cows // *J. Dairy Sci.* – 2016. – Vol. 99. – P. 7544-7553.

131 Wall S.K., Wellnitz O., Hernández-Castellano L.E. et al. Supraphysiological oxytocin increases the transfer of immunoglobulins and other blood components to milk during lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced mastitis in dairy cows // *J. Dairy Sci.* – 2016. – Vol. 99. – P. 9165-9173.

132 Grohn Y.T., Rajala-Schultz P.J., Allore H.G. et al. Optimizing replacement of dairy cows: Modelling the effects of diseases // *Prev. Vet. Med.* – 2003. – Vol. 61. – P. 27-43.

133 Berry E.A., Hogeveen H., Hillerton J.E. Decision tree analysis to evaluate dry cow strategies // *J. Dairy Res.* – 2004. – Vol. 71. – P. 409-418.

134 Bar D., Tauer L.W., Bennet G. et al. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming // *J. Dairy Sci.* – 2008. – Vol. 91. – P. 2205-2214.

135 Cha E., Bar D., Hertl J.A., et al. The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming // *J. Dairy Sci.* – 2011. – Vol. 94. – P. 4476-4487.

136 Dahl M.O., De Vries A., Maunsell F.P. et al. Epidemiologic and economic analyses of pregnancy loss attributable to mastitis in primiparous Holstein cows // *J. Dairy Sci.* – 2018. – Vol. 101. – P. 10142-10150.

137 Coulon J.B., Gasqui P., Barnouin J. et al. Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in

dairy cows // *Anim. Res.* – 2002. – Vol. 51. – P. 383-393.

138 Halasa T., Nielen M., De Roos A.P.W. et al. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model // *J. Dairy Sci.* – 2009. – Vol. 92. – P. 599-606.

139 Gonçalves J.L., Tomazi T., Barreiro J.R. et al. Effects of bovine subclinical mastitis caused by *Corynebacterium* spp. On somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters // *Vet. J.* – 2016. – Vol. 209. – P. 87-92.

140 Bobbo T., Ruegg P.L., Stocco G. et al. Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows // *J. Dairy Sci.* – 2017. – Vol. 100. – P. 4868-4883.

141 Gonçalves J.L., Kamphuis C., Martins C.M.M.R. et al. Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return // *Livest. Sci.* – 2018. – Vol. 210. – P. 25-32.

142 Gussmann M., Steeneveld W., Kirkeby C. et al. Economic and epidemiological impact of different intervention strategies for clinical contagious mastitis // *J. Dairy Sci.* – 2018. – Vol. 102. – P. 1483-1493.

143 Hogeveen H., Huijps K., Lam T.J.G.M. Economic aspects of mastitis: New developments // *N. Z. Vet. J.* – 2011. – Vol. 59. – P. 16-23.

144 McInerney J.P., Howe K.S., Schepers J.A. A Framework for economic analysis of disease in farm livestock // *Prev. Vet. Med.* – 1992. – Vol. 13. – P. 137-154.

145 Yalcin C., Scott A.W., Logue D.N. et al. The economic impact of mastitis-control procedures used in scottish dairy herds with high bulk-tank somatic-cell counts // *Prev. Vet. Med.* – 1999. – Vol. 41. – P. 135-149.

146 Van Soest F.J.S., Santman-Berends I.M.G.A., Lam T.J.G.M. et al. Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms // *J. Dairy Sci.* – 2016. – Vol. 99. – P. 8365-8374.

147 Yalcin C., Scott A.W., Logue D.N. et al. The economic impact of mastitis-control procedures used in scottish dairy herds with high bulk-tank somatic-cell counts // *Prev. Vet. Med.* – 1999. – Vol. 41. – P. 135-149.

148 Van Soest F.J.S., Santman-Berends I.M.G.A., Lam T.J.G.M. et al. Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms // *J. Dairy Sci.* – 2016. – Vol. 99. – P. 8365-8374.

149 Weinstein R.A., Hota B. Contamination, Disinfection, and Cross-Colonization: Are Hospital Surfaces Reservoirs for Nosocomial Infection? // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 39. – P. 1182-1189.

150 Vandini A., Temmerman R., Frabetti A. et al. Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9. – P. 89-96.

151 Mann E.E., Manna D., Mettetal M.R. et al. Surface micropattern limits bacterial contamination // *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* – 2014. – Vol. 3. –

P. 28-39.

152 Mora M., Mahnert A., Koskinen K. et al. Microorganisms in confined habitats: Microbial monitoring and control of intensive care units, operating rooms, cleanrooms and the international space station // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 1573-1-1573-29.

153 Wand M.E., Bock L.J., Bonney L.C. et al. Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2017. – Vol. 61. – P. e01162-16-1- e01162-12.

154 Aslam B., Wang W., Arshad M.I. et al. Infection and Drug Resistance Dovepress Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis // *Infect. Drug Resist.* – 2018. – Vol. 66. – P. 99-108.

155 Health Care-Associated Infections Fact Sheet. – 2017 // http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf. 12.04.2018.

156 D'Accolti M., Soffritti I., Mazzacane S. et al. Fighting AMR in the healthcare environment: Microbiome-based sanitation approaches and monitoring tools // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20. – 20, – P.1535-1-1535-12.

157 Ventola C.L. The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats // *Pharm. Ther.* – 2015. – Vol. 40. – P. 277-283.

158 Поляков А.А., Куликовский А.В. Еще раз о теории и практике ветеринарной дезинфекции // *Ветеринария.* – 1989. – №2. – С. 19-23.

159 Bartha A. Practiche erfahrung in der prophylaxe und therapie der Wichtigsten kalbel und tierkonzentration // *Veterinär medizin.* – 1972. – Vol. 27. – P. S.23.

Stellmacher W. Einwirkungen verschidener Temperaturen auf Desinfektionsmittela sunger // *Arch. exper. veter. Med.* – 1973. – Vol. 27. – P. 341-347.

160 Попов Н.И., Григанова Н.В., Захарова Л.Л. и др. Результаты испытаний аламинола (дезинфицирующее средство) // *Ветеринария.* – 2004. – №7. – С. 13-15.

161 Николаенко В.П. Препарат бактерицид для птицеводства // *Матер. 6-го междунар. ветер. конгресса по птицеводству.* – М., 2010. – С. 184-187.

162 Равилов А.З., Угрюмова В.С., Савельчев А.П. и др. Натопен - дезинфектант широкого спектра антимикробного действия // *Ветеринария.* – 2010. – №12. – С. 8-11.

163 Угрюмова В.С., Равилов А.З., Фаткулова А.А. и др. Эффективность дезинфицирующего средства натопен в бролерном производстве птицеводства // *Ветеринария.* – 2012. – №6. – С. 15-17.

164 Худяков А.А. Эффективная дезинфекция и подбор дезинфектанта // *Ветеринария.* – 2010. – №2. – С. 18-22.

165 Попов Н.И., Григанова Н.В., Захарова Л.Л. и др. Результаты испытаний аламинола (дезинфицирующее средство) // *Ветеринария.* – 2004. – №7. – С. 13-15.

166 Kembel S.W., Jones E., Kline J. et al. Architectural design influences the diversity and structure of the built environment microbiome // *ISME J.* – 2012. – Vol. 6. – P. 1469-1479.

167 Berg G., Mahnert A., Moissl-Eichinger C. Beneficial effects of plant-associated microbes on indoor microbiomes and human health? // *Front. Microbiol.* – 2014. – Vol. 5 – P. 15-1-15-7.

168 Healthier hospitals // <http://www.healthierhospitals.org/>. 06.08.2019.

169 Health Care Without Harm // <https://noharm.org/>. 06.08.2019.

170 Practice Greenhealth // <https://practicegreenhealth.org/>. 06.08.2019.

171 Parat S., Perdrix A., Fricker-Hidalgo H. et al. Multivariate analysis comparing microbial air content of an air-conditioned building and a naturally ventilated building over one year // *Atmos. Environ.* – 1997. – Vol. 31. – P. 441-449.

172 Harrison J., Pickering C.A.C., Faragher E.B. et al. An investigation of the relationship between microbial and particulate indoor air pollution and the sick building syndrome // *Resp. Med.* – 1992. – Vol. 86. – P. 225-235.

173 Ronan E., Yeung C.W. et al. Interspecies interaction extends bacterial survival at solid-air interfaces // *Biofouling.* – 2013. – Vol. 29. – P. 1087-1096.

174 Cardinale M., Brusetti L., Quatrini P. et al. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70. – P. 6147-6156.

175 White T.J., Bruns T., Lee S.J.W.T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // In book: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* – NY., 1990. – P. 315-322.

176 De Waal G.M., Engelbrecht L., Davis T. et al. Correlative Light-Electron Microscopy detects lipopolysaccharide and its association with fibrin fibres in Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – P. 16798-1-16798-13.

177 La Duc M.T., Dekas A., Osman S. et al. Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – Vol. 73. – P. 2600-2611.

178 Palmer J., Flint S., Brooks J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 34. – P. 577-588.

179 Morgan T.D., Wilson M. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor // *J. Appl. Microbiol.* – 2001. – Vol. 91. – P. 47-53.

180 Gupta M., Bisesi M., Lee J. Comparison of survivability of *Staphylococcus aureus* and spores of *Aspergillus niger* on commonly used floor materials // *Am. J. Infect. Control.* – 2017. – Vol. 45. – P. 717-722.

181 Bergen L.K., Meyer M., Høg M. et al. Spread of bacteria on surfaces when cleaning with microfibre cloths // *J. Hosp. Infect.* – 2009. – Vol. 71. – P. 132-137.

182 Moeller R., Stackebrandt E., Reitz G. et al. Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation // *J. Bacteriol.* – 2007. –

Vol. 189. – P. 3306-3311.

183 Baron J.L., Vikram A., Duda S. et al. Shift in the microbial ecology of a hospital hot water system following the introduction of an on-site monochloramine disinfection system // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9. – P. e102679-1-e102679-13.

184 Pourhajibagher M., Bahador A. An in vivo evaluation of microbial diversity before and after the photo-activated disinfection in primary endodontic infections: Traditional phenotypic and molecular approaches // Photodiag. Photodyn. Ther. – 2018. – Vol. 22. – P. 19-25.

185 Tringe S.G., Zhang T., Liu X. et al. The airborne metagenome in an indoor urban environment // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, Issue 4. – P. e1862-1-e-1862-14.

186 Dillon R.J., Vennard C.T. et al. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion // Ecol. Lett. – 2005. – Vol. 8. – P. 1291-1298.

187 Counter Culture Clean // <https://countercultureclean.com>. 06.08.2019.

188 Probio clean // <https://www.probioclean.com/faq>. 06.08.2019.

189 Mrs Martin's Probiotic Surface Cleaner 500ml RTU // [https://mrsmartins.co.za/product/mrs-martins-probiotic-surface-soap-\\$500mL-aluminium](https://mrsmartins.co.za/product/mrs-martins-probiotic-surface-soap-$500mL-aluminium). 6.08.2019.

190 Pat. CA2983075A1. Product for cleaning, sanitizing and hygienization / A. Rodolfi, E. Caselli et al.; publ. 27.10.16. – 20 p.

191 Casell, E., Brusaferrero S. et al. Reducing healthcare-associated infections incidence by a probiotic-based sanitation system: A multicentre, prospective, intervention study // PLoS One. – 2018. – Vol. 13. – P. e0199616-1- e0199616-11.

192 Caselli E., Antonioli P., Mazzacane S. Safety of probiotics used for hospital environmental sanitation // J. Hosp. Infect. – 2016. – Vol. 94. – P. 193-201.

193 Caselli E., Arnoldo L., Rognoni C. et al. Impact of a probiotic-based hospital sanitation on antimicrobial resistance and HAI-associated antimicrobial consumption and costs: A multicenter study // Dovepress. – 2019. – Vol. 12. – P. 501-510.

194 Joubert L.M., Ferreira J.A., Stevens D.A. et al. Visualization of *Aspergillus fumigatus* biofilms with Scanning Electron Microscopy and Variable Pressure-Scanning Electron Microscopy: A comparison of processing techniques // J. Microbiol. Methods. – 2017. – Vol. 132. – P. 46-55.

195 Slabbert E., Van Heerden C.J., Jacobs K. Optimisation of automated ribosomal intergenic spacer analysis for the estimation of microbial diversity in fynbos soil // S. Afr. J. Sci. – 2010. – Vol. 106, Issue 7-8. – P. 1-4.

196 R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing // <https://www.gbif.org/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing>. 10.12.2019.

197 Разработка новых антибактериальных препаратов – проблемы и перспективы // <https://science-education.ru/ru/article/view?>. 10.12.2019.

198 Faye B., Esenov P. Productivity potential of camels. Desertification Combat and Food Safety: the Added Value of Camel Producers // Proc. of. Intern. Workshop. – 2004. – Vol. 362. – P.127-134.

199 Чижаева А.В., Тулемисова Ж.К., Дудикова Г.Н. и др. Физиолого-

биохимические свойства новых штаммов молочнокислых бактерий, перспективных для создания пробиотических препаратов // Биотехнология. Теория и практика. – 2002. – №2. – С.5-10.

200 Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 229 с.

201 Квасников Е.И., Нестеренко О.М. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1975. – 384 с.

202 Rogoza M., Buchanan R.E., Gibbons N.E. Williams and Wilkins Genus III. *Bifidobacterium* Orla-Jensen // In book: Bergey's manual of determinative bacteriology. – Baltimore, 1974. – P. 669-676.

203 Kailasapathy K., Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organism with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. // Immunology and Cell Biology. – 20007. – Vol. 78. – P. 80-88.

204 Лянная А.М., Интизаров М.М., Донских Е.Е. Биологические и экологические особенности микробов рода *Bifidobacterium* // В кн.: Бифидобактерии и их использование в клинике, медицинской промышленности и сельском хозяйстве – М.: Наука. – 1986. – С. 32-38.

205 Cai Y., Matsumoto M., Benno Y. et al. *Bifidobacterium lactis* is a subjective synonym of *Bifidobacterium animalis* // Microbiol. Immunol. – 2000. – Vol.44, Issue 6. – P. 815-820.

206 Le Leu R., Hu Y., Brown I. et al. Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats // Carcinogenesis. – 2010. – Vol. 31. – P. 246-251.

207 Laven R.A., Ashmore A., Stewart C.S. *Escherichia coli* in the rumen and colon of slaughter cattle, with particular reference to *E.coli* O157 // Veterinary Journal. – 2003. – Vol. 165. – P. 78-83.

208 Magjeed N. Corrective effect of milk camel on some cancer biomarkers in blood of rats intoxicated with aflatoxin B1 // Journal of the Saudi Chemical society. – 2005. – Vol. 9. – P. 253-263.

209 Тулемисова Ж.К., Абеуов Х.Б., Мыктыбаева Р.Ж. и др. Перспективы использования пробиотиков в лечении некробактериоза крупного рогатого скота // Перспективные пути развития научных знаний: матер. междунар. науч.-практ. конф.». – Киев, 2019. – С. 45-48.

210 Tulemisova Zh.K., Kasenova G.T., Muzapbarov B. et al. Probiotic Lactobacterin-Tk2 Therapeutic and Prophylactic Efficiency // International Journal of Natural Sciences Research. – 2018. – Vol. 6, Issue 1. – P. 1-5.

211 Төлемісова Ж.К., Кауменова А.Е., Сүлейменова Ж.М. и др. Разработка нормативно-технических документов производства пробиотических продуктов // Вестник КазНУ. – 2018. – №6. – С. 284-288.

212 Банникова Л.А., Королева Н.С., Семинихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.

213 Гаврилова Н.Н., Ратникова Р.П., Захаренко Л.И. и др. Профилактика

и лечение колиактериоза с помощью пробиотика на основе молочнокислых и пропионовокислых бактерий // Биотехнология. Теория и практика. – 2005. – №3. – С. 87-90.

214 Баркова А.С. Гиперкератоз сосков вымени и его осложнения у высокопродуктивных молочных коров: этиология, патогенез, диагностика, терапия, профилактика: дис. ... док. ветер. наук: 06.02.06. – Екатеринбург, 2018. – 289 с.

215 Гармаев М.Ц. Разработка новых дезинфицирующих средств в системе противозoonотических мероприятий: дис. ... док. биол. наук: 06.02.02. – Казань, 2014. – 282 с.

216 Омарова А.Б. Пробиотикалық препараттар өндірісінің технологиясын және нормативтік құжаттарын әзірлеу: док. PhD: 6D073200. – Алматы, 2019. – 188 б.

217 Плохушко Е.Н. Разработка нового пробиотика на основе бактерий видов *lactobacillus plantarum* и *bacillus subtilis*: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. – Казань, 2003. – 138 с.

218 Zhubatkanova A., Kurmanova G., Tleulesov R. et al. Efficiency of using probiotic «Chrisal» for mastitis prevention» // Eurasian Journal of Biosciences. – 2019. – Vol. 13, Issue 2. – P. 1841-1848.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Акты апробации

Акт № 3

От 9 июня 2017 г.

Мы, нижеподписавшиеся, главный ветеринарный врач АО «Астана Энилко» - Мухамеджанов Б.М., доцент кафедры Ветеринарная санитария КазАТУ Жумакаева А.Н., докторант 2 курса КазАТУ им. С.Сейфуллина, кафедры Ветеринарная санитария - Жубатканова А.Ж., студент 4 курса КазАТУ им. С.Сейфуллина, кафедры Ветеринарная санитария - Касымов Ж. составили настоящий акт, в том что в период с 1.06.2017 по 21.06.2017 г. нами было проведено аэробация бактериологическое свойства препарата Кристалл-900 1:100 (0,5%) концентрации при дезинфекции поверхностей объектов ветеринарного назначения (со стен и пола, кормушек, поилок, с железных перегородок) путем крупнокапельного орошения предприятия по производству и переработке молока АО «Астана Энилко»:

4. путем механической очистки;
5. путем однократного крупнокапельного орошения при расходах 0,3-0,5 л/м² при общей экспозиции 2 часа;
6. при следующих режимах: температура воздуха +15°С до +18°С и относительной влажности 60-65 %.

На что и составлен настоящий акт в 2-х экземплярах.

Подписи:

Главный вет. врач



Б.Мухамеджанов

Доцент кафедры
«Ветеринарная санитария»

Жумакаева - А.Н. Жумакаева

Докторант кафедры КазАТУ
им. С.Сейфуллина

Жубатканова А. Жубатканова

Студент кафедры КазАТУ
им. С.Сейфуллина

Касымов Ж. Касымов

Акт №7

От 14 июля 2017 г.

Мы, нижеподписавшиеся, главный ветеринарный врач АО «Астана-Өнім» - Мухамеджанов Б.М., доцент кафедры Ветеринарная санитария КазАТУ Жумакаева А.Н., докторант 2 курса КазАТУ им. С.Сейфуллина, кафедры Ветеринарная санитария - Жубаткынова А.Ж., студент 4 курса КазАТУ им. С.Сейфуллина, кафедры Ветеринарная санитария - Касымов Ж. составили настоящий акт, в том что в период с 10.07.2017 по 20.07.2017 г. нами было проведено апробация бактериологическое свойства пробиотического препарата Рир-Нуз Клинер (фирма Chiral) в 1:200 концентрации при дезинфекции поверхности объектов ветеринарного надзора (со стен и пола, кормушек, лотков, с желтых перегородок) путем крупнокапельного орошения предприятия по производству и переработке молока АО «Астана-Өнім»:

4. путем механической очистки;
5. путем однократного крупнокапельного орошения при расходах 0,3-0,5 л/м² при общей экспозиции 24 часа;
6. при следующих режимах: температура воздуха + 15 С до +18 С и относительной влажности 60-65 %.

На что и составлен настоящий акт в 2-х экземплярах.

Подписи:

Главный Вет. врач  Б. Мухамеджанов

Доцент кафедры «Ветеринарная санитария»  А.Н. Жумакаева

Докторант кафедры КазАТУ им. С.Сейфуллина  А. Жубаткынова

Студент кафедры КазАТУ им. С.Сейфуллина  Ж. Касымов

Акт № 5

От 16 июня 2017 г.

Мы, нижеподписавшиеся, главный ветеринарный врач АО «Астана Әліне» - Мухамеджанов Б.М., доцент кафедры Ветеринарная санитария КазАТУ Жумакаева А.Н., докторант 2 курса КазАТУ им. С.Сейфуллина, кафедры Ветеринарная санитария - Жубатканова А.Ж., студент 4 курса КазАТУ им. С.Сейфуллина, кафедры Ветеринарная санитария - Касымов Ж. составили настоящий акт, в том что в период с 1.06.2017 по 21.06.2017 г. нами было проведено апробация бактериологическое свойства препарата Кристалл-900 1:100 (1%) концентраций приdezинфекций поверхности объектов ветеринарного надзора (со стен и пола, кормушек, пивнок, с железных перетородос) путем крупнокапельного орошения предприятия по производству и переработке молока АО «Астана Әліне».

10. путем механической очистки;

11. путем однократного крупнокапельного орошения при расходах 0,3-0,5 л/м² при общей экспозиции 2 часа.

12. при следующих режимах: температура воздуха + 15 °С до +18 °С и относительной влажности 60-65 %.

На что и составлен настоящий акт в 2-х экземплярах.

Подписи:

Главный Вет. врач  Б. Мухамеджанов

Доцент кафедры
«Ветеринарная санитария»  А.Н. Жумакаева

Докторант кафедры КазАТУ
им. С.Сейфуллина  А. Жубатканова

Студент кафедры КазАТУ
им. С.Сейфуллина  Ж. Касымов

Акт № 4

От 12 июня 2017 г.

Мы, нижеподписавшиеся, главный ветеринарный врач АО «Астана Әнім» - Мухамеджанов Б.М., доцент кафедры Ветеринарная санитария КазАТУ Жумажаева А.Н., докторант 2 курса КазАТУ им. С.Сейфуллина, кафедры Ветеринарная санитария - Жубатканова А.Ж., студент 4 курса КазАТУ им. С.Сейфуллина, кафедры Ветеринарная санитария - Касымов Ж. составили настоящий акт, в том что в период с 1.06.2017 по 21.06.2017 г. нами было проведено апробация бактериологические свойства препарата Кристалл-900 1:100 (1%) концентрацией при дезинфекции поверхности объектов ветеринарного надзора (со стен и пола, кормушек, поилок, с железных перегородок) путем крупнокапельного орошения предприятия по производству и переработке молока АО «Астана Әнім».

7. путем механической очистки;
8. путем однократного крупнокапельного орошения при расходах 0,3-0,5 л/м² при общей экспозиции 30 минут;
9. при следующих режимах: температура воздуха + 15 С до +18 С и относительной влажности 60-65 %.

На что и составлен настоящий акт в 2-х экземплярах.

Подписи:

Главный Вет. врач



Б.Мухамеджанов

Доцент кафедры
«Ветеринарная санитария»

А.Н. Жумажаева - А.Н. Жумажаева

Докторант кафедры КазАТУ
им. С.Сейфуллина

А. Жубатканова - А. Жубатканова

Студент кафедры КазАТУ
им. С.Сейфуллина

Ж. Касымов - Ж. Касымов

Акт № 2

От 5 июня 2017 г.

Мы, нижеподписавшиеся, главный ветеринарный врач АО «Астана Эниш» - Мухамеджанов Б.М., доцент кафедры Ветеринарная санитария КазАТУ Жумакаева А.Н., докторант 2 курса КазАТУ им. С.Сейфуллина, кафедры Ветеринарная санитария - Жубатканова А.Ж., студент 4 курса КазАТУ им. С.Сейфуллина, кафедры Ветеринарная санитария - Касымов Ж. составили настоящий акт, в том что в период с 1.06.2017 по 21.06.2017 г. нами было проведено аэробация бактериологическое свойства препарата Кристалл-900 1:100 (0,5%) концентрацией при дезинфекции поверхности объектов ветеринарного надзора (со стен и пола, кормушек, поилок, с жидких перегородок) путем крупнокапельного орошения предприятия по производству и переработке молока АО «Астана Эниш»:

1. путем механической очистки;
2. путем однократного крупнокапельного орошения при расходах 0,3-0,5 л/м² при общей экспозиции 30 минут;
3. при следующих режимах: температура воздуха +15 С до +18 С и относительной влажности 60-65%.

На что и составлен настоящий акт в 2-х экземплярах.

Подписи:

Главный Вет. врач



Б.Мухамеджанов

Доцент кафедры
«Ветеринарная санитария»

Жумакаева А.Н. А.Н. Жумакаева

Докторант кафедры КазАТУ
им. С.Сейфуллина

Жубатканова А. А. Жубатканова

Студент кафедры КазАТУ
им. С.Сейфуллина

Касымов Ж. Ж. Касымов

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Заявление о выдаче патента

| | | | |
|---|--|------------------------|--|
| Дата поступления | (85) Дата перевода международной заявки на национальную фазу | (21) Регистрационный № | (22) Дата подачи |
| <input type="checkbox"/> (86) регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные получающим ведомством <input type="checkbox"/> (87) номер и дата международной публикации международной заявки <input type="checkbox"/> (96) номер евразийской заявки и дата подачи заявки, установленные получающим ведомством <input type="checkbox"/> (97) номер и дата публикации евразийской заявки | | | |
| ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Республики Казахстан на полезную модель | | | |
| Предоставляя указанные ниже документы, прошу (просим) выдать патент Республики Казахстан на имя заявителя(ей) (71) Заявитель(и): 1. Жубатканова айгерим Жандарбековна Zhubatkanova Aigerim Zhandarbekovna улица Алии Молдагуловой 29 А, комната 406, Нур-Султан, 010000 010000 (указывается полное имя или наименование и местожительство или местонахождение. Данные о местожительстве авторов-заявителей приводятся в графе, рядом с графой с кодом(72)) | | | Код страны по стандарту ВОИС ST 3 (если он установлен) KZ |
| Заполняется только при испрашивании приоритета по дате, более ранней, чем дата подачи заявки в РПТ «Национальный институт интеллектуальной собственности» Прочую (просим) установить приоритет полезной модели по дате: <input type="checkbox"/> подачи первой(ых) заявки(ок) в государстве-участнике Парижской конвенции (пунктом 2 статьи 20 Закона) <input type="checkbox"/> подачи более ранней заявки в РПТ «Национальный институт интеллектуальной собственности» в соответствии с пунктом 4 статьи 20 Закона <input type="checkbox"/> подачи первоначальной заявки в РПТ «Национальный институт интеллектуальной собственности» в соответствии с пунктом 5 статьи 20 Закона приоритета первоначальной заявки (пунктом 5 статьи 20 Закона) (номер заявки _____, дата подачи _____) <input type="checkbox"/> поступления дополнительных материалов к более ранней заявке (пунктом 3 статьи 20 Закона) (31) № первой, более ранней, первоначальной заявки (32) Дата испрашиваемого приоритета (33) Код страны подачи по ST 3 (при испрашивании конвенционного приоритета) | | | |
| (34) Название полезной модели Изучение эффективности комплексных мероприятий при использовании консорциума для профилактики мастита на ферме фермада маститтин алдын алу үшін консорциумды пайдалану кезіндегі кешенді шаралардың тиімділігін зерттеу Адрес для переписки (полный почтовый адрес и имя адресата) ЖУБАТКАНОВА АИГЕРИМ ЖАНДАРБЕКОВНА, улица Алии Молдагуловой 29А, комната 406, Нур-Султан, Республика Казахстан, 010000 Телефон: 87016829727 Мобильный тел. 87016829727 Факс: Адрес электронной почты zhubatkanova91@mail.ru | | | |
| (74) Патентный поверенный (полное имя, регистрационный номер) или представитель заявителя(ей) (полное имя или наименование) | | | |

| Перечень прилагаемых документов | Количество листов в 1 экземпляре | Количество экземпляров |
|--|----------------------------------|------------------------|
| <input type="checkbox"/> приложение к заявлению | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> описание полезной модели | 7 | 1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> формула полезной модели | 1 | 1 |
| <input type="checkbox"/> чертеж(и) и иные материалы | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> реферат | 17 | 1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> документ об оплате подачи заявки | | 1 |
| <input type="checkbox"/> документ, подтверждающий наличие оснований для уменьшения размера оплаты | | |
| <input type="checkbox"/> копия(и) первой(ых) заявки(ок) (при испрашивании конвенционного приоритета) | | |
| <input type="checkbox"/> документы заявки на иностранном языке | | |
| <input type="checkbox"/> достоверность, удостоверяющая полномочия патентного поверенного или представителя | | |
| <input type="checkbox"/> другой документ (указать) | | |

(место для штампа РПТ «Национальный институт интеллектуальной собственности»)

№ фигуры чертежей, предлагаемой для публикации с формулой(рефератом)

| (72) Автор(ы) (указывается полное имя) | Полный почтовый адрес местожительства, включая наименование страны и ее код по стандарту ВОИС ST 3, если он установлен |
|---|--|
| 1. ЖУБАТКАНОВА АИГЕРИМ ЖАНДАРБЕКОВНА | улица Алии Молдагуловой 29А, комната 406, Нур-Султан, KZ, 010000 |
| 2. Жубатканова Айгерим Жандарбековна Zhubatkanova Aigerim Zhandarbekovna | улица Алии Молдагуловой 29 А, комната 406, Нур-Султан, KZ, 010000 |

Я (мы) прошу (просим) не упоминать меня (нас) как автора(ов) при публикации сведений о выдаче патента на полезную модель

Подпись(и) автора(ов):

Согласен на использование сведений, составляющих охраняемую законом тайну, содержащуюся в информационных системах

Подпись

Подписано с помощью ЭЦП.
Роль 0

Подпись(и) заявителя(ей) (при подписании от имени юридического лица подпись руководителя скрепляется печатью)



ПРИЛОЖЕНИЕ В

Фотографии из личного архива



Рисунок В.1 – Осмотр крупного рогатого скота



Рисунок В.2 – Пальпация вымени крупного рогатого скота